

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

STEPHANIE CANAVARRO DE SOUZA

**Desenvolvimento de diagnóstico rápido para SARS-CoV-2 por
detecção da proteína da espícula**

RIBEIRÃO PRETO

2022

STEPHANIE CANAVARRO DE SOUZA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP
como requisito básico para a Conclusão do Curso
de Ciências Biomédicas com ênfase em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Co-Orientador: Dr. Daniel Macedo de Melo Jorge

RIBEIRÃO PRETO

2022

STEPHANIE CANAVARRO DE SOUZA

Desenvolvimento de diagnóstico rápido para SARS-CoV-2 por detecção da proteína da espícula

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP como requisito básico para a conclusão do Curso de Ciências Biomédicas.

Data de aprovação: 12/12/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Prof. Dr. Rodrigo de Carvalho Santana

Profa. Dra. Alline Cristina de Campos

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que me acompanharam na trajetória e contribuíram de alguma forma para que eu pudesse concluir esse trabalho. Ao meu namorado, meus amigos da faculdade, aos meus amigos do trabalho , minha família e a todos que me auxiliaram no laboratório de patogênese viral.

AGRADECIMENTO A AGÊNCIA FINANCIADORA

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do projeto Iniciação Científica no edital MCTI/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/Decit N° 07/2020 - Número do processo: 117909/2021-1

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A emergência de infecção por um novo coronavírus humano (HCoV) na China em dezembro de 2019 resultou em uma pandemia que se tornou um dos mais significantes problemas de saúde da história da humanidade. O surto epidemiológico continua a gerar grandes preocupações em todo o mundo. Devido a emergência de patógenos que causam graves problemas na área da saúde pública no âmbito mundial, é notória a necessidade de estudos que auxiliem na detecção e controle da propagação da doença. Pensando nisso, o desenvolvimento de técnicas de diagnósticos mais eficientes, rápidas, de baixo custo e de fácil acesso se tornaram extremamente necessárias, para que a infecção pudesse ser rapidamente identificada e tomada as devidas providências para evitar a transmissão do vírus. Dessa forma, o objetivo desse projeto é a padronização de uma metodologia de diagnóstico rápido para SARS-CoV-2 capaz de identificar as partículas virais na fase aguda da doença em amostras de secreção respiratória e saliva por teste de aglutinação. Durante o desenvolvimento do teste, foram usados estoques de variantes de SARS-CoV-2 para padronização do teste de aglutinação de Látex usando anticorpo policlonal produzido *in house* contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ). Os experimentos foram realizados no laboratório de Biossegurança nível III (BSL3) do Centro de Pesquisa em Virologia - CPV/USP. Os estoques virais das variantes de SARS-CoV-2 foram produzidos e titulados em ensaio de placa ou TCID₅₀ na linhagem celular imortalizada da Vero E6. Inicialmente foi realizada a padronização da metodologia de sensibilização das *beads* de látex azuis de diâmetro 0.80 µm da MERCK. O anticorpo anti-espícula foi avaliado inicialmente nas concentrações finais de 1 e 10% em relação ao volume final das *beads* utilizadas. Após a sensibilização das *beads*, foi realizado o teste de detecção de antígeno viral com diferentes estoques virais presentes no laboratório, como diferentes cepas de SARS-CoV-2 (Delta, Ômicron, P1 e Wuhan ativos e inativos) e como controle negativo também testamos outros vírus respiratórios (RSV e H1N1). Amostras de sobrenadante celular sem a presença de vírus também foram utilizadas como controle experimental para identificação de interações inespecíficas. Estoques com quantidade de vírus conhecidos foram submetidos a diluições seriadas para determinar a quantidade mínima de vírus detectável. Além disso, estoques das variantes de SARS-CoV-2 foram utilizados para avaliar a aglutinação na presença das *beads* sensibilizadas nas concentrações de 1:1. Laminas de 12 poços foram utilizadas para incubar o vírus por 15 minutos e apresentaram aglutinação observada sem auxílio do microscópio nas amostras em que sensibilizamos as *beads* na concentração de 1% de anticorpo. Foram observadas aglutinações inespecíficas nos controles experimentais e modificações foram realizadas para diminuir a inespecificidade. Uma das modificações foi alterar o *phosphate-buffered saline* (PBS) utilizado na lavagem e armazenamento das *beads*, adicionando 0.1% *bovine serum albumin* (BSA) a sua composição, no entanto, essa modificação resultou em nenhuma aglutinação em todas as amostras. Dessa forma, buscamos trabalhar com as mudanças de concentrações de anticorpo e quantidade de *beads* para então minimizar as aglutinações inespecíficas da nossa primeira metodologia. Os primeiros experimentos realizados permitiram observar a aglutinação das *beads* de látex (sensibilizadas com 1% de anticorpo), para todas as variantes avaliadas, apesar das variações proteicas nos estoques das diferentes variantes. Realizamos várias modificações nos protocolos para diminuir a inespecificidade que levaram a inibição da aglutinação nos experimentos subsequentes, entretanto a metodologia ainda precisa ser aperfeiçoada para que possa ser determinada como um teste padronizado. O teste por aglutinação possui baixo custo e é acessível para

laboratórios de diagnósticos com estrutura variada, podendo auxiliar muitos pacientes que não têm acesso aos testes convencionais.

ABSTRACT

The infection emergency by a new human coronavirus (HCoV) in China on december of 2019 resulted in a pandemic that has become one of the most significant health issues in human history. The epidemiological outbreak continues to generate a major concern around the world. Due to the emergency of pathogens that cause serious problems in public health worldwide, there is a clear need for studies that help detect and control the spread of the disease. With that in mind, the development of more efficient, faster low-cost and easily accessible diagnostic techniques has become extremely necessary, so that the infection could be quickly identified and taken the appropriate precautions to prevent the transmission of the virus. Thus, the goal of this project is the standardization of a rapid diagnosis methodology for SARS-coV-2 capable of identifying viral particles in the acute phase of the disease in samples of respiratory secretions and saliva by agglutination test. During the development of the test, stocks of Sars-CoV-2 variants will be used to standardize the Latex agglutination test using polyclonal antibody produced in house against the viral surface protein (spike) in collaboration with Prof. Leda Castilho (UFRJ). The experiments were carried out in the Biosafety Level 3 laboratory of the Virology Research Center - CPV/USP. Viral stocks of Sars-CoV-2 variants were produced and titrated in plaque/TCID assay in Vero E6. Initially, the methodology for sensitization of MERCK blue latex *beads* with a diameter of 0.80 µm was standardized. The anti-spike antibody was initially evaluated in the final contractions of 1 and 10% in relation to the *beads* used. After sensitization of the *beads*, the viral antigen detection test was performed with different viral stocks present in the laboratory, such as different strains of Sars-coV-2 (Delta, Omicron, P1 and Wuhan active and inactive) and as a negative control we will also test other respiratory viruses (RSV and H1N1). Samples of cell supernatant without the presence of virus were also used as an experimental control to identify nonspecific interactions. Stocks with known amounts of virus were subjected to serial dilutions to determine the minimum amount of detectable virus. In addition, stocks of Sars-CoV-2 variants were used to assess agglutination in the presence of sensitized *beads* at 1:1 concentrations. In addition, 12-well slides were used to incubate the virus for 15 minutes and showed agglutination observed without the aid of a microscope in the samples in which we sensitized the *beads* at a concentration of 1% antibody. Nonspecific agglutinations were observed in experimental controls and modifications were performed to decrease nonspecificity. One of the modifications was to change the PBS used for washing and storing the *beads*, adding 0.1% BSA to its composition, however, we noticed that this modification resulted in no agglutination. Thus, we sought to work with changes in antibody concentrations and number of *beads* in order to minimize the nonspecific agglutinations of our first methodology. The first experiments carried out allowed observing the agglutination of the latex *beads* (sensitized with 1% antibody), for all the evaluated variants, despite the protein variations in the stocks of the different variants. We made several modifications to the protocols to decrease the nonspecificity that led to inhibition of agglutination in subsequent experiments, however the methodology still needs to be improved so that it can be determined as a standardized test. The agglutination test has a low cost and is accessible to diagnostic laboratories with a varied structure, and can help many patients who do not have access to conventional tests.

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63ª Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do genoma do SARS-CoV-2. Estão detalhadas as 3 principais regiões: as ORFs 1a e 1b que vão originar as proteínas não estruturais, e as regiões de codificação de proteínas estruturais, como a região S que vai codificar a proteína spike, a M que codifica a proteína de membrana, a E de proteínas do envelope e a N que codifica proteínas do nucleocapsídeo. Em baixo um esquema da estrutura do SARS-CoV-2.

Figura 2: Esquema representativo de um ensaio de imunoaglutinação com beads de látex revestidas de anticorpos, denominado teste direto, ou com antígenos, denominado teste indireto.

Figura 3: Figura esquemática das diluições que foram realizadas.

Figura 4: Esquema das diluições na primeira fase do processo de sensibilização das *beads* de látex com os anticorpos.

Figura 5: Figura esquemática dos tubos finais com as respectivas concentrações de beads com anticorpos antes do processo de incubação.

Figura 6: Curva padrão da concentração de proteína/absorbância do BSA dos valores obtidos no experimento de quantificação por BRADFORD

Figura 7: Tubos com beads sensibilizadas com anticorpo nas concentrações de 1% e 10%, após uma lavagem com PBS 1X

Figura 8: Lâmina de 12 poços com beads sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal de cavalo contra a proteína de superfície viral (espícula). As amostras testadas seguem a seguinte ordem da esquerda para a direita: Mock; P1; Delta; Ômicron e Wuhan.

Figura 9: Maior aumento dos resultados observados com as beads que foram sensibilizadas com 1% de anticorpo. As amostras testadas estão na mesma ordem da figura 8: Mock; P1; Delta; Ômicron e Wuhan.

Figura 10: Lâminas examinadas ao microscópio com objetiva 10X mostrando aglutinação das beads que foram sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal.

Figura 11: Lâminas examinadas ao microscópio com objetiva 10X mostrando aglutinação das beads que foram sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal.

Figura 12: Esquema ilustrativo dos testes de aglutinação realizados. Cél (Mock); Δ (Delta); Om ou Omic (Ômicron) Wu (Wuhan).

Figura 13: Lâmina de 12 poços com beads sensibilizadas (1% AC) e amostras testadas na

seguinte ordem (Mock;PBS;RSV; H1N1)

Figura 14: Lâmina de 12 poços com beads sensibilizadas (0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (Mock;PBS;RSV; H1N1)

Figura 15: Lâminas de 12 poços com beads sensibilizadas (1% e 0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (Ômicron 1:1; Ômicron 1:10 ; Ômicron 1:100 ; Wuhan 1:1 ; Wuhan 1:10 ; Wuhan 1:100)

Figura 16: Lâminas de 12 poços com beads sensibilizadas (1% e 0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 1:1; P1 1:10 ; P1 1:100 ; Delta 1:1 ; Delta 1:10 ; Delta 1:100) em duplicata

Figura 17: Lâmina de 12 poços com beads sensibilizadas (1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 inativo 1:1; P1 inativo 1:10 ; P1 inativo 1:100 ; Wuhan inativo 1:1 ; Wuhan inativo 1:10 ; Wuhan inativo 1:100)

Figura 18: Lâmina de 12 poços com beads sensibilizadas (0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 inativo 1:1; P1 inativo 1:10 ; P1 inativo 1:100 ; Wuhan inativo 1:1 ; Wuhan inativo 1:10 ; Wuhan inativo 1:100)

Figura 19: Resultado do teste de aglutinação realizado com as beads a 1%. As amostras estão na seguinte ordem: UV1 (Wuhan inativa), UV2 (P1 inativa), Mock, PBS, H1N1 e RSV.

Figura 20: Teste de aglutinação em 4 lâminas. Na primeira temos as beads sensibilizadas com 0,5% de anticorpo e as amostras testadas estão na seguinte sequência: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo); Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%. Na segunda lâmina temos as beads sensibilizadas com 0,5% de anticorpo e as amostras testadas em 1 e 2 são respectivamente H1N1 e RSV e em 12 e 11 são as beads sem AC com as respectivas amostras: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo). Na terceira temos as beads sensibilizadas com 1% AC e as amostras testadas estão na seguinte sequência: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo); Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%. Na quarta temos as beads sensibilizadas com 1% AC e as amostras testadas em 1 e 2 são respectivamente H1N1 e RSV e em 12 e 11 são as beads sem AC com as respectivas amostras: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo)

Figura 21: Esquema da disposição das amostras nas lâminas

Figura 22 : As lâminas da direita mostram resultados 6 minutos após a mistura beads + amostra, e as da esquerda aos 12 minutos.

Figura 23 : A figura A (à direita) apresenta o resultado das 4 lâminas 18 minutos após a mistura beads + amostra. A figura B (à esquerda) apresenta o resultado das 4 lâminas 50 minutos após a mistura beads + amostra

Figura 24: Esquema representativo das 5 situações de sensibilizações de beads

Figura 25: Teste de aglutinação com beads sensibilizadas com anticorpo policlonal de cavalo (lâminas da esquerda) sendo a 1ª e 2ª lâminas com 1% de anticorpo e a 3ª e 4ª com 0,5% de anticorpo, com as seguintes amostras, da esquerda para a direita: Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%; RSV; UV1 (Wuhan inativo) e UV2 (P1 inativo). À direita temos as lâminas de aglutinação usando beads sensibilizadas com anticorpo comercial de coelho.

Figura 26: Nos resultados dessa figura temos os controles negativos do experimento. Do lado esquerdo temos as lâminas 1 e 2 com as beads sensibilizadas com anticorpo comercial monoclonal produzido em coelho a 1% e 0,5% com as amostras de RSV UV1 e UV2. A lâmina 3 com as beads sem anticorpo e as amostras de RSV UV1 e UV2. As lâminas 4 e 5 com as beads sensibilizadas com anticorpo policlonal produzido in house contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ), com as amostras de RSV, UV1 e UV2. Do lado direito temos as lâminas 6 e 7 com as beads sensibilizadas com anticorpo policlonal produzido in house contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ) a 1 e 0,5% de anticorpo e as lâminas 8 e 9 com as beads sensibilizadas com anticorpo comercial monoclonal produzido em coelho com as seguintes amostras: Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%; RSV; UV1 (Wuhan inativo) e UV2 (P1 inativo). Essas fotos foram tiradas após 10 minutos de reação dos testes.

Figura 27: Controles positivos na seguinte ordem: 1ª lâmina temos as beads com 1% de AC de soro de cavalo; na 2ª lâmina temos as beads com 0,5% de AC de soro de cavalo; na 3ª lâmina temos as beads com 1% de AC de anticorpo comercial feito em coelho; na 4ª lâmina temos as beads com 0,5% de AC de anticorpo comercial feito em coelho. Na 5ª e última lâmina temos beads que não foram sensibilizadas com nenhum anticorpo. Nessas 5 lâminas foram testadas as seguintes amostras na ordem a seguir: P1; Wuhan; Ômicron; Delta em duplicata. Nos dois últimos poços de cada lâmina testamos amostras clínicas com SARS-CoV-2, a de cima datada de 19/02/2021 e a do poço de baixo datada de 14/12/2021.

Figura 28: Amostras de sobrenadante do processo de sensibilização das beads com reagente de BRADFORD

Figura 29: Sequência das amostras de sobrenadante do processo de sensibilização das beads com reagente de BRADFORD na seguinte ordem: Puro (anticorpo puro); 2 (sobrenadante do primeiro experimento); 4 (sobrenadante do segundo experimento) ; B (branco)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Controles negativos e positivos que utilizamos no teste de aglutinação

Quadro 2: Resultados das titulações obtidas por ensaio de placa e $TCID_{50}$

Quadro 3: Quantidade de vírus utilizado em 10 μ L cada amostra

Quadro 4: Concentração/absorbância de BSA obtida no experimento de quantificação por BRADFORD

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UV: Ultravioleta

µl: microlitros

AC: Anticorpo

MES: ácido 2-etanossulfônico

RSV: Vírus Sincicial Respiratório

H1N1: Nova influenza A

DMEM: Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium

BSL3: laboratório de Biossegurança nível III

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15 à 18
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS GERAIS.....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. METODOLOGIA.....	18 à 25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25 à 46
7. CONCLUSÃO.....	46 e 47
8. REFERÊNCIAS.....	47 e 48

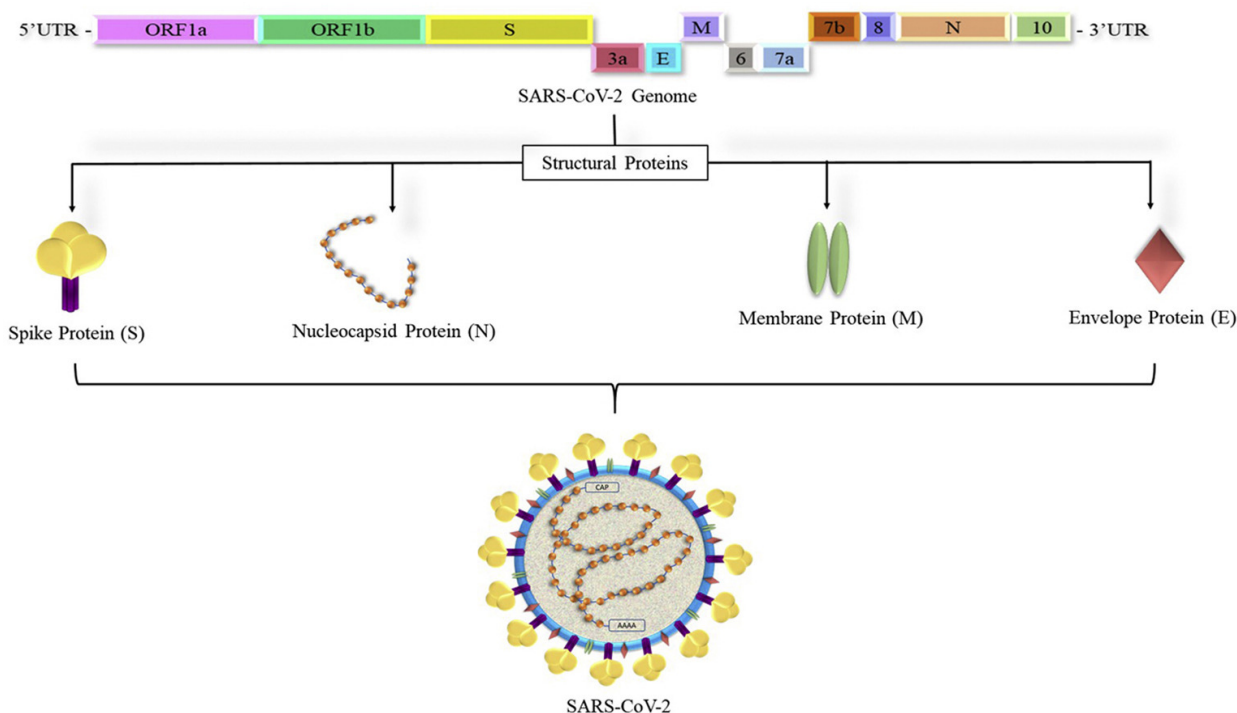
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Coronavírus SARS-CoV-2

Os coronavírus humanos são vírus respiratórios, conhecidos por terem alta patogenicidade e potencial pandêmico. O coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2), foi identificado na China, no final de 2019, como agente causador da doença respiratória denominada Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Huang et al., 2020). Pacientes infectados com SARS-coV-19 podem apresentar quadros clínicos que variam de leves a graves, e há alta frequência de portadores assintomáticos do vírus, colaborando para a alta transmissibilidade (Marco Ciotti et al., 2020). Dessa forma, a COVID-19 se espalhou rapidamente por todo o mundo, gerando grandes impactos sociais, inclusive no Brasil, onde causou mais de 34.999.495 casos confirmados e cerca de 688.907 óbitos (<https://covid.saude.gov.br/>) até 20 de novembro de 2022.

O SARS-CoV-2 é envelopado com as características típicas da família *Coronaviridae*, com genoma de RNA de fita simples positiva com 29,8 Kb. O genoma (Figura 1) é dividido em dois terços de genes de proteínas não estruturais e um terço de proteínas estruturais. A região codificadora de proteínas não estrutural corresponde às ORFs1a e 1b que se sobrepõem parcialmente no início da ORF1b, com alteração do *frame* de leitura ribossomal, resultando na tradução de dois grandes polipeptídeos, que por clivagens proteolíticas originam as proteínas não estruturais virais. A porção proximal à terminação 3' codifica proteínas estruturais, incluindo proteínas da superfície (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Figura 1) (Wu et al., 2020). O envelope viral contém projeções em sua superfície constituídas por glicoproteína da espícula, ou *spike* (S), que se liga ao receptor do hospedeiro, permitindo sua ligação e entrada. Estudos apontam que, por mais que os coronavírus apresentem mutações, a proteína S apresenta alto grau de conservação de estrutura, mesmo entre suas variantes (Sairaj Satarker et al., 2020).

Figura 1: Esquema representativo do genoma do SARS-CoV-2. Estão detalhadas as 3 principais regiões: as ORFs 1a e 1b que vão originar as proteínas não estruturais, e as regiões de codificação de proteínas estruturais, como a região S que vai codificar a proteína *spike*, a M que codifica a proteína de membrana, a E de proteínas do envelope e a N que codifica proteínas do nucleocapsídeo. Em baixo um esquema da estrutura do SARS-CoV-2.



Fonte: Sairaj Satarker et al., 2020.

1.2. Diversidade de testes para detecção do SARS-CoV-2

A alta taxa de transmissibilidade do SARS-CoV-2 gerou uma pandemia com muitas perdas e dificuldades de conter a expansão viral no mundo. Devido a isso, houve a necessidade em investir na produção de diferentes métodos diagnósticos para que os pacientes infectados fossem diagnosticados o mais rápido possível.

O teste considerado como padrão ouro pelo Disease Control and Prevention (CDC) e World Health Organization (WHO) para identificação é o teste molecular, que pode ser feito inclusive de modo quantitativo, de *reverse transcription real-time polymerase chain reaction* (RT-qPCR) (Oliveira, Beatriz Araujo et al., 2020). Esse teste consiste em amplificar o material genético do vírus a partir de uma amostra coletada, preferencialmente de *swab* de nasofaringe ou secreção respiratória. A coleta deve ser realizada entre o terceiro e o décimo dias após o início dos sintomas, período de maior carga viral. O RT-qPCR é um método diagnóstico muito específico e sensível (Marco Ciotti et al., 2020). No entanto, o resultado pode demorar de 1h a 2h, requerendo equipamento específico de alto custo, que não está disponível em qualquer laboratório ou posto de saúde do Brasil, mas sim restrito a centros de referência.

Além do teste de PCR, há testes sorológicos para anticorpos produzidos durante a infecção por SARS-CoV-2. Muitos ensaios sorológicos foram desenvolvidos desde o início da pandemia, como os imunoenzimáticos (ELISA), quimioluminescência (CLIA) e de fluxo lateral (*lateral flow assays* - LFAs) (World Health Organization et al., 2021). O teste é

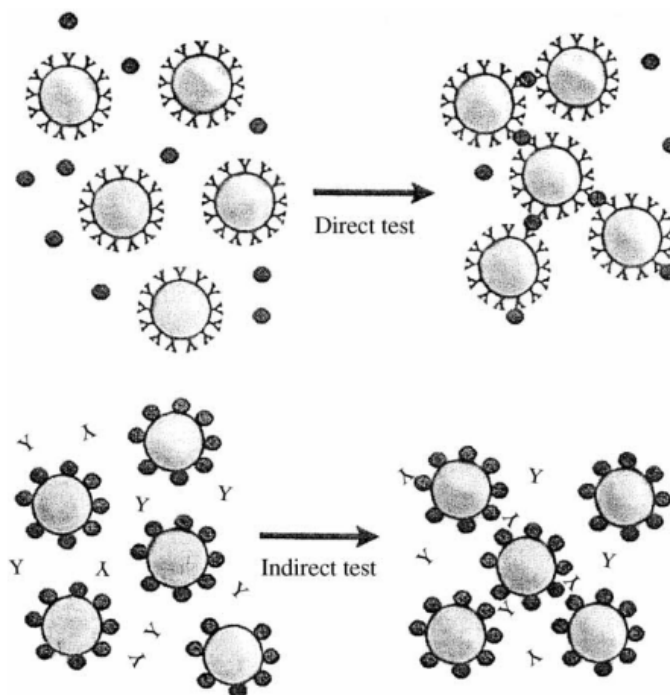
realizado em amostras de soro ou sangue coletadas preferencialmente no período de sete a dez dias após o início dos sintomas, para detectar anticorpos IgA, IgG e/ou IgM (Marco Ciotti et al., 2020). Esse método diagnóstico pode ser amplamente utilizado devido ao baixo custo, mas não é eficiente para uso na fase aguda, e pode ser positivo em vacinados.

Há ainda os testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral (LFAs), que podem ser usados para detectar o antígeno do SARS-CoV-2 ou anticorpos. Esta estratégia consiste em imobilizar em uma membrana antígenos aos quais vão se ligar anticorpos, ou anticorpos que capturam antígenos presentes na amostra testada. Os testes de detecção de antígenos podem identificar pacientes na fase aguda, de alta transmissibilidade. Por outro lado, os testes rápidos que vão detectar os anticorpos, vão reconhecer a resposta imunológica do paciente por meio da identificação de IgM e/ou IgG (Marco Ciotti et al., 2020). A vantagem desses testes é a obtenção do resultado rápido, a praticidade de aplicação do método e seu baixo custo quando comparados a outros métodos.

1.3. Método de aglutinação

O teste de aglutinação é uma metodologia que pode ser utilizada para detectar antígenos virais, ainda pouco explorada, que envolve a agregação de partículas microscópicas, usualmente esférulas (*beads*) de látex, que vão ser interligadas pela reação entre anticorpo e antígeno, tornando esta aglutinação visível a olho nu, ou com auxílio de lupa. Em geral ancoram-se anticorpos nas esférulas, que vão reagir com antígenos virais presentes na amostra, produzindo aglutinação (Figura 2) (Molina-Bolívar et al., 2005).

Figura 2: Esquema representativo de um ensaio de imunoaglutinação com *beads* de látex revestidas de anticorpos, denominado teste direto, ou com antígenos, denominado teste indireto.



Fonte: Molina-Bolívar et al., 2005.

O método de aglutinação tem algumas vantagens quando comparado a outros métodos diagnósticos. Primeiramente, os procedimentos são simples e amplamente aplicáveis

(Molina-Bolívar et al., 2005) em qualquer laboratório ou posto de saúde, pois não precisa de equipamentos especializados nem técnico especialista, e os resultados são obtidos rapidamente. Estudos mais recentes buscaram aplicar essa técnica para a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 (Kruse, Robert L., et al., 2021). Pensando no contexto da pandemia, um diagnóstico prático, rápido, de baixo custo e poderia ser amplamente usado.

2. JUSTIFICATIVA

Devido à situação pandêmica gerada em todo mundo, em razão do surgimento do SARS-CoV-2, um patógeno com alto potencial de transmissibilidade, muitos estudos buscaram formas de detectar o vírus de forma mais rápida e eficientemente com o objetivo de restringir a expansão do vírus. O uso de *beads* para aglutinação é uma metodologia diagnóstica alternativa para SARS-CoV-2, pois é um método prático e de baixo custo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Padronizar um ensaio de diagnóstico rápido para SARS-CoV-2, por sensibilização de *beads* de látex com anticorpos para detectar antígeno na fase aguda da doença em amostras de secreção respiratória e saliva por aglutinação.

3.2. Objetivos específicos

- Ligar anticorpos capazes de reconhecer um antígeno do SARS-CoV-2 em *beads* de látex.
- Testar diferentes concentrações de anticorpos produzidos em cavalo ou coelho para a imobilização nas *beads*.
- Testar as *beads* recobertas com anticorpos na detecção de SARS-CoV-2

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células e propagação viral

As linhagens de células Vero E6 e Vero CCL81 (rim de macaco), foram cultivadas em garrafas com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% soro fetal bovino (SBF) e 1% de antibiótico e antimicótico em estufa a 37°C, 5% de CO₂ até a realização dos experimentos. Durante a infecção por SARS-CoV-2 o meio foi substituído por um meio com 2% de SBF. Os estoques das variantes virais de SARS-CoV-2 utilizados foram propagados em culturas de células Vero E6 ou CCL81. Alíquotas dos estoques de Sars-CoV-2 foram adicionadas em garrafas com confluência aproximada de 70 a 80% e incubadas na estufa de 3 a 5 dias. Após surgimento de efeitos citopáticos (mudança detectável na célula hospedeira devido à infecção) de 70 a 80%, as células foram coletadas. As células com o sobrenadante foram centrifugadas a 300 g por 5 min para retirada de restos celulares. Posteriormente foram alíquotadas em tubos de 2ml e mantidas no freezer -80°C até o dia do

USO.

4.2. Titulação viral

A titulação viral foi realizada por ensaio de placa em células Vero E6 ou por TCID₅₀ em células Vero CCL81 para quantificar partículas infecciosas conforme métodos publicados (Youil et al., 2004). No caso do ensaio de placas células Vero E6 foram cultivadas em placas de 12 ou 24 poços e infectadas com o sobrenadante viral. As células foram infectadas com diluições decimais do vírus e após adsorção foi adicionada carboximetilcelulose (CMC) na concentração final de 1.5% em meio de cultura. As placas foram observadas para determinar a diluição máxima em que se viam placas de lise e quantificar essas placas,

Alternativamente, foi realizada quantificação por TCID₅₀ em células Vero CCL81 em placas de 96 poços, na confluência aproximada de 70 a 80%, usando diluições decimais do vírus. Após 72h foi verificado o efeito citopático das células e determinada a diluição máxima em que havia efeito em 50% dos poços. Os poços positivos para o vírus foram contados e utilizados para cálculo da quantidade de partículas infecciosas por ml.

4.3. Inativação Viral

Os estoques virais clarificados sem restos celulares foram adicionados em placas de Petri e expostos à luz ultravioleta por 1 hora para inativação viral. Por fim, para verificar se esses vírus estavam realmente inativados, foi realizado um ensaio de placa ou TCID₅₀ com células Vero E6 ou CCL81 cultivadas em placas conforme descrito anteriormente (Durchschlag, H. et al., 2004).

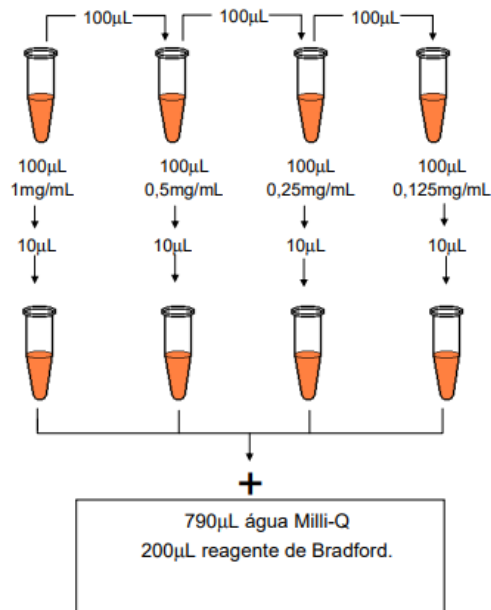
4.4. Produção do anticorpo policlonal em cavalo

Foi realizada a produção da proteína S recombinante do vírus SARS-Cov-2 da variante Wuhan, em sistema heterólogo no laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) da Coppe/UFRJ, sob a coordenação da professora Leda Castilho. Os equinos foram imunizados com a proteína S e foram coletados soros com anticorpos policlonais anti-SARS-CoV-2, que foram utilizados para a sensibilização de *beads* neste projeto. Os soros foram gentilmente cedidos pela Profa. Leda Castilho.

4.5. Quantificação por BRADFORD

A curva padrão foi preparada em 200 µL da solução de BSA a 1mg/mL. A partir dessa solução, foram realizadas as diluições seriadas em água Milli-Q, para a obtenção das outras concentrações (0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) (Figura 3). O branco utilizado foi preparado em um tubo de 1,5 mL em 800 µL de água Milli-Q e 200µL de reagente de Bradford. A diluição da amostra foi realizada em tubos de 1,5ml, usando 10µL da amostra em 790 µL de água Milli-Q e 200 µL reagente de Bradford para fazer diluições decimais. Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro DU 800 (Beckman) e cubetas de plástico.

Figura 3: Figura esquemática das diluições que foram realizadas.



Fonte: Protocolo de Bradford realizado pelo Laboratório do Prof. Dr. Sandro Valentini, UNESP.

4.6. Sensibilização das *beads*

4.6.1. Materiais necessários:

- *Beads* de látex azuis de tamanho 0,80 µm
- MES buffer (ácido 2-etanossulfônico)
- Tampão de lavagem (Phosphate-Buffered Saline (PBS): PBS em pH 7.4.
- Tampão de armazenamento: Storage Buffer (Phosphate-Buffered Saline - PBS): PBS da mesma fórmula descrita no ítem "3" à 1X = 0,1 M e pH 7,4 com 0.1% glicina e 0.1% NaN₃.
- Anticorpo (cavalo - Spike)
Puro : 1% de anticorpo
Diluído: 0,5% de anticorpo
- Anticorpo comercial produzido em coelho
Puro : 1% de anticorpo
Diluído: 0,5% de anticorpo
- Amostras:

Quadro 1: Controles negativos e positivos que utilizamos no teste de aglutinação

Amostras para teste	
Controle Positivo	Controle negativo
P1	Mock: Células sem vírus
Delta	PBS
Omicron	DMEN 0%
Wuhan	DMEN 2%
Omicron	Estoque de RSV
P1 inativo (UV2)	Estoque de H1N1
Wuhan inativo (UV1)	

Fonte: Quadro do autor

4.6.2. Preparação dos materiais

- Protocolo de preparação do MES Buffer:

pH = 6

Cálculo da concentração: 0,25M (concentração 10X)

$M = n / V_{\text{solução}}$

$n = 0,25 \times 1(L)$

$n = 0,25 \text{ mol}$

$n = m / M$

$0,25 = m \text{ soluto} / M \text{ molar}$

$0,25 = m \text{ soluto} / 217,22$

$m \text{ soluto} = 54,305g \text{ para } 1L \text{ de solução}$

→ $54,305/2 = 27,1525g \text{ para } 500mL \text{ de solução}$

→ Para 250 mL = 13,58g

Dissolvemos 13,58g de MES em 250 mL de água Milli-Q, ou 2,716g de MES em 50mL de água Milli-Q.

- Protocolo de preparação do Storage Buffer:

Phosphate-Buffered Saline (PBS): 1X

pH = 7,2

0.1% glycine

0.1% NaN₃

Para uma solução de 100 mL adicionar 0,1g de cada reagente

4.6.3. Protocolo de preparação das *Beads*

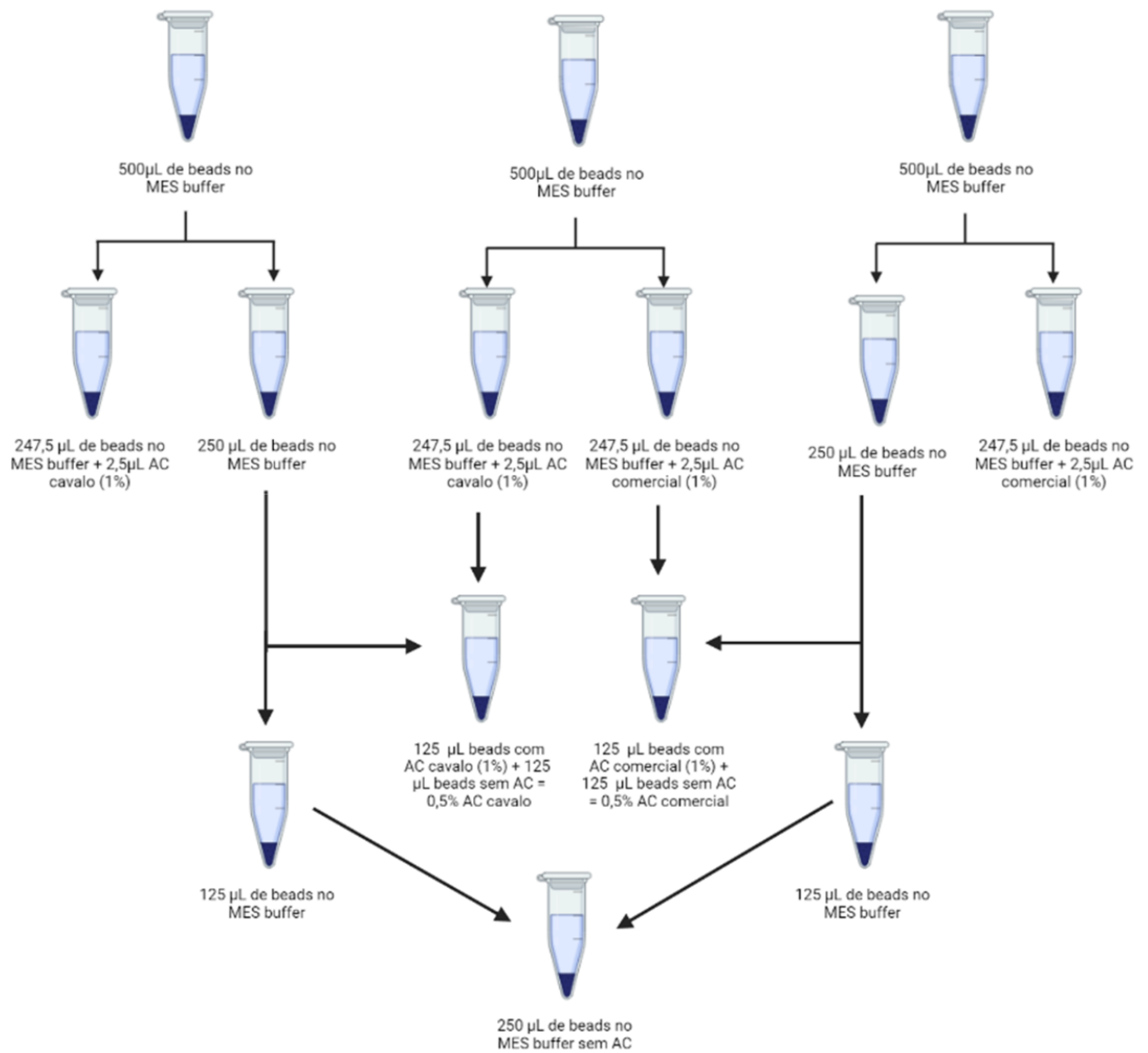
- Em 3 tubos de 1,5 mL, pipetar 250 µL das *beads* (quantidade recomendada pela Thermo, dividida por 10) e diluir em 1 mL de buffer MES (250 mg de *beads* por 1 mL de MES)
- Centrifugar os tubos a 3000 x g por 20 min, na temperatura de 4 °C
- Descartar os sobrenadantes
- Ressuspender os pellets em 1 mL de buffer MES
- Colocar as amostras no vortex para que os pellets soltem totalmente
- Dar um spin nos tubos
- Centrifugar novamente a 3000g em 20 min, na temperatura de 4°C
- Descartar os sobrenadantes
- Ressuspender novamente os pellets em 500 µL de buffer MES (250 µL de *beads* por 500 µL de MES)

4.6.4. Sensibilização das *Beads* com o anticorpo (Figura 4)

Em tubos de ensaio com 500µL de *beads* no MES, usamos as seguintes concentrações de anticorpos:

- 1) Diluição seriada de anticorpo 1:100 (1%) → 2,5 µL de anticorpo em 247,5 µL de *beads* com buffer MES
- 2) Diluição seriada de anticorpo 1:500 (0,5%) → Pegamos 247,5 µL de um dos tubos e misturamos 2,5µL de anticorpo (1%), dessa mistura de 1% de anticorpo, tiramos 125 µL e misturamos com 125 µL da mistura primária (*beads* e MES). Dessa forma, obtivemos 250 µL com 0,5% de anticorpo.

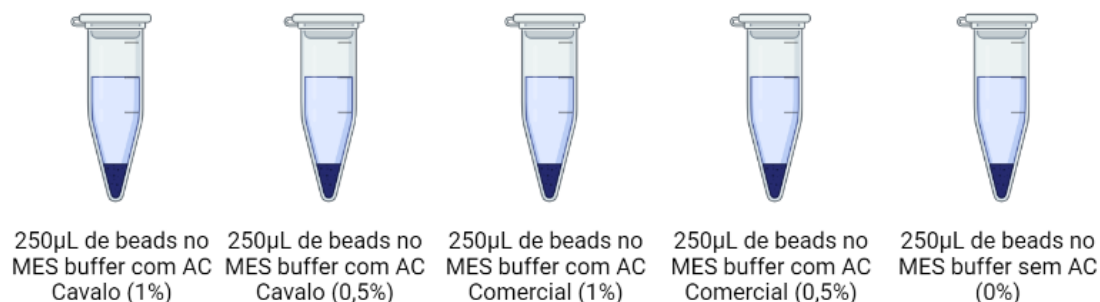
Figura 4: Esquema das diluições na primeira fase do processo de sensibilização das *beads* de látex com os anticorpos.



Fonte: Esquema do autor

Assim, usamos os tubos com as concentrações finais (Figura 5):

Figura 5: Figura esquemática dos tubos finais com as respectivas concentrações de *beads* com anticorpos antes do processo de incubação.



Fonte: Esquema do autor

- Incubar a mistura anticorpo/*beads* dos 5 tubos em rotação lenta *overnight* (15h) à 25°C.
- Vortexar os 5 tubos
- Dar um SPIN nas amostras
- Centrifugar para separar as *beads* de látex que estão com a proteína acoplada das proteínas soltas a 14.000g a 10 min, em uma temperatura de 4°C
- Remover e guardar o sobrenadante para retenção das proteínas (para depois realizar o cálculo de proteínas/anticorpos) que não se fixaram nas *beads*
- Ressuspender o pellet em 1 mL de PBS 1X
- Homogeneizar
- Vortexar por alguns segundos
- Dar um spin
- Centrifugar novamente para sedimentar as partículas à 14.000g por 10 min, em uma temperatura de 4°C
- Remover o sobrenadante
- Ressuspender o pellet em 1 mL de PBS 1X
- Homogeneizar
- Vortexar por alguns segundos
- Dar um spin
- Repetir os 5 passos anteriores mais 4 vezes para lavagem
- Ressuspender a *beads* em 1 mL de tampão de armazenamento

4.6.5. Testagem das amostras nas *beads* sensibilizadas

Em lâminas com 12 poços, colocar 10 µL de *beads* sensibilizadas mais 10µL de amostra

Os testes de aglutinação foram realizados no BSL III (laboratório de Biossegurança nível III).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estoques virais e titulação viral

Garrafas da célula Vero CCL81 com confluência de 70 a 80% foram inoculadas com alíquotas das variantes Wuhan, P1, Delta e Ômicron do vírus Sars-CoV-2. Após 3 a 4 dias de infecção o sobrenadantes juntamente com as células foram coletados. O conteúdo celular foi removido por centrifugação e o sobrenadante dividido em alíquotas e congelado. Uma das alíquotas foi descongelada e utilizada para titulação viral por ensaio de placa e TCID₅₀.

Obtivemos como resultado as seguintes titulações (Quadro 2):

Quadro 2: Resultados das titulações obtidas por ensaio de placa e TCID₅₀

Titulações	
Amostra	Titulações obtidas
SARS-CoV-2 variante Delta	3,16 x 10 ⁷ por mL
SARS-CoV-2 variante P1	3,16 x 10 ⁶ por mL
SARS-CoV-2 variante Wuhan	4,64 x 10 ⁵ por mL
SARS-CoV-2 variante Ômicron	2,15 x 10 ⁷ por mL

Fonte: Quadro do autor

Dessa forma, se utilizarmos 10 µL do vírus, estaremos utilizando as seguintes quantidades (Quadro 3):

Quadro 3: Quantidade de vírus utilizado em 10 µL cada amostra

Titulações	
Amostra	Titulações obtidas
SARS-CoV-2 variante Delta	3,16 x 10 ⁵ por mL
SARS-CoV-2 variante P1	3,16 x 10 ⁴ por mL
SARS-CoV-2 variante Wuhan	4,64 x 10 ³ por mL
SARS-CoV-2 variante Ômicron	2,15 x 10 ⁵ por mL

Fonte: Quadro do autor

5.2. Inativação Viral

Foi realizada a inativação por UV de estoques virais de SARS-CoV-2 das cepas de P1 e Wuhan. A inativação foi comprovada por meio de ensaio de placa ou TCID₅₀, no qual não foi verificada a formação de unidades formadoras de placas ou efeito citopático nas células. Esse resultado indica a ausência de partículas infecciosas.

5.3. Quantificação por BRADFORD

Primeiramente realizamos a quantificação das amostras de BSA para a formação da curva padrão e obtivemos os seguintes resultados (Quadro 4).

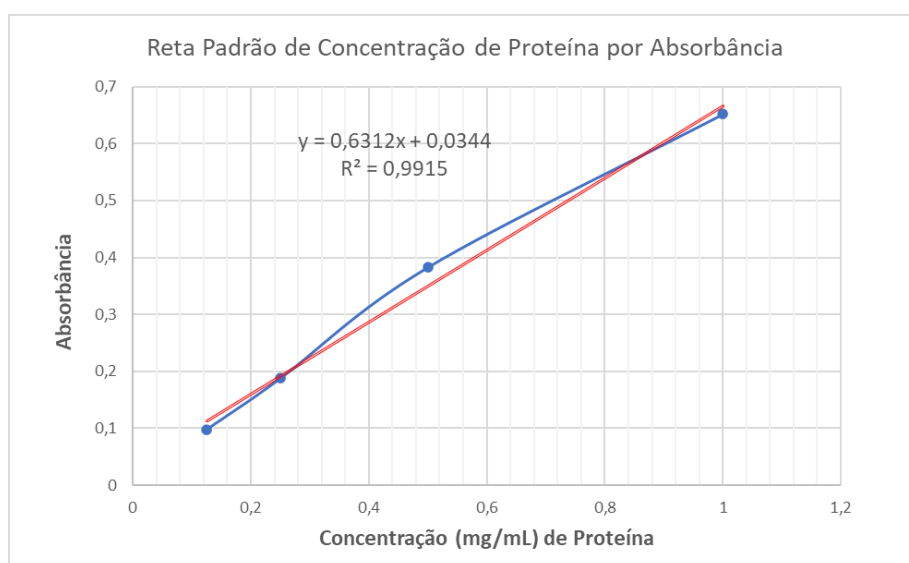
Quadro 4: Concentração/absorbância de BSA obtida no experimento de quantificação por BRADFORD

Tabela de Concentração/Absorbância BSA		
Amostra	Concentração	Absorbância
Branco	1	0,652
A1	0,5	0,383
A2	0,25	0,188
A3	0,125	0,098

Fonte: Quadro do autor

A partir dos valores obtidos, pudemos realizar o gráfico da nossa curva padrão e a equação da reta na qual podemos encontrar as concentrações respectivas de acordo com valores de absorbância obtidos (Figura 6):

Figura 6: Curva padrão da concentração de proteína/absorbância do BSA dos valores obtidos no experimento de quantificação por BRADFORD



Fonte: Gráfico do autor realizado no excel

A partir do gráfico obtido, temos a equação de reta $y = 0,6312x + 0,0344$ sendo que y é a absorbância e x é a concentração de proteína/anticorpo em mg/ml.

Pensando nisso, também calculamos a absorbância do anticorpo policlonal produzido em cavalo que foi utilizado neste projeto para verificar a concentração. Obtivemos a absorbância do anticorpo puro no valor de 2,517. Sendo assim, podemos aplicar na fórmula:

$$y = 0,6312x + 0,0344$$

$$2,517 = 0,6312x + 0,0344$$

$$x = (2,517 - 0,0344) \div 0,6312$$

$$x = 3,9331 \text{ mg/mL}$$

Dessa forma, podemos nos certificar que a concentração do anticorpo policlonal foi de 3,9 mg/mL.

5.4. Protocolo de sensibilização das *beads*

Usamos *beads* de latex (Xinglin, Jia .et al., 2002) de cor azul para visualização mais fácil (Xu, Xiaojuan .et al., 2005).

A sensibilização das *beads* de latex foi feita com base em protocolos já existentes: o protocolo de absorção passiva de *beads* de latex da Thermo Fisher, E o método publicado previamente para detecção de influenza aviária H5N1 (Chen, 2007).

O primeiro protocolo que delineamos teve várias modificações e adaptações para chegar no que foi finalmente usado, conforme os passos a seguir.

1) Problemas na centrifugação na etapa de lavagem

Na primeira tentativa de testagem do protocolo, as *beads* não formaram um o pellet, e foi necessário aumentar muito a velocidade de centrifugação de 3000 x g para 14000 x g, a 4°C e diluir as *beads* em PBS 1X, e não 10X, o que resultou em formação de pellet bem firme (Figura 7):

Figura 7: Tubos com *beads* sensibilizadas com anticorpo nas concentrações de 1% e 10%, após uma lavagem com PBS 1X



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

No primeiro protocolo, foram testadas duas concentrações de anticorpo nas *beads*: 1% e 10% e as variantes P1, Delta; Ômicron e Wuhan. Sendo assim, tivemos 5 fatores em 2 concentrações de anticorpo para analisar, um total de 10 amostras. Foram testadas diferentes bases para observar a aglutinação: papel não absorvente e placas de 96 poços, que não permitiram boa visualização da aglutinação, e as lâminas de 12 poços, que foram as escolhidas. Não foi possível observar a aglutinação das *beads* com 10% de anticorpo, mas alguma aglutinação foi visível com as *beads* tratadas com 1% de anticorpo (Figura 8 e 9).

Figura 8: Lâmina de 12 poços com *beads* sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal de cavalo contra a proteína de superfície viral (espícula). As amostras testadas seguem a seguinte ordem da esquerda para a direita: Mock; P1; Delta; Ômicron e Wuhan.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 9: Maior aumento dos resultados observados com as *beads* que foram sensibilizadas com 1% de anticorpo. As amostras testadas estão na mesma ordem da figura 8: Mock; P1; Delta; Ômicron e Wuhan.

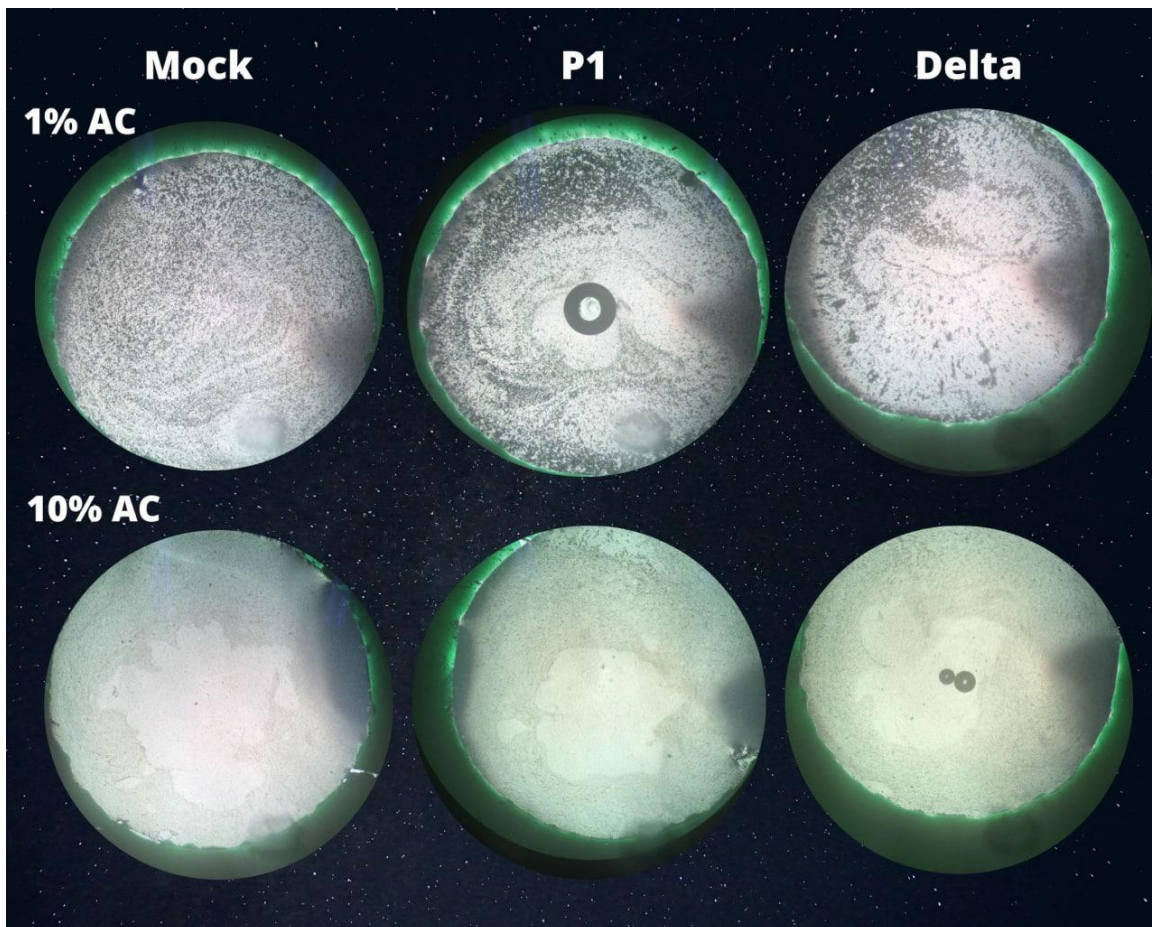


Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Não obtivemos o resultado esperado nas amostras com as *beads* sensibilizadas com 10%, possivelmente porque a concentração do anticorpo estava muito alta e atrapalhou de modo estérico a sensibilização das *beads*. No entanto, quando observamos as amostras com *beads* sensibilizados a 1%, encontramos um resultado bem parecido com o que esperávamos encontrar em um teste de aglutinação. Os resultados das *bead* com 1% de anticorpo pareceu promissor, pois foi possível ser observado a olho nu, o que era nosso objetivo principal. Além disso, não houve aglutinação com o mock contendo apenas sobrenadante de cultura da mesma linhagem celular usada para propagar os vírus, e houve aglutinação com as quatro variantes testadas, mesmo usando um anticorpo produzido contra a proteína S de uma só variante de SARS-CoV-2.

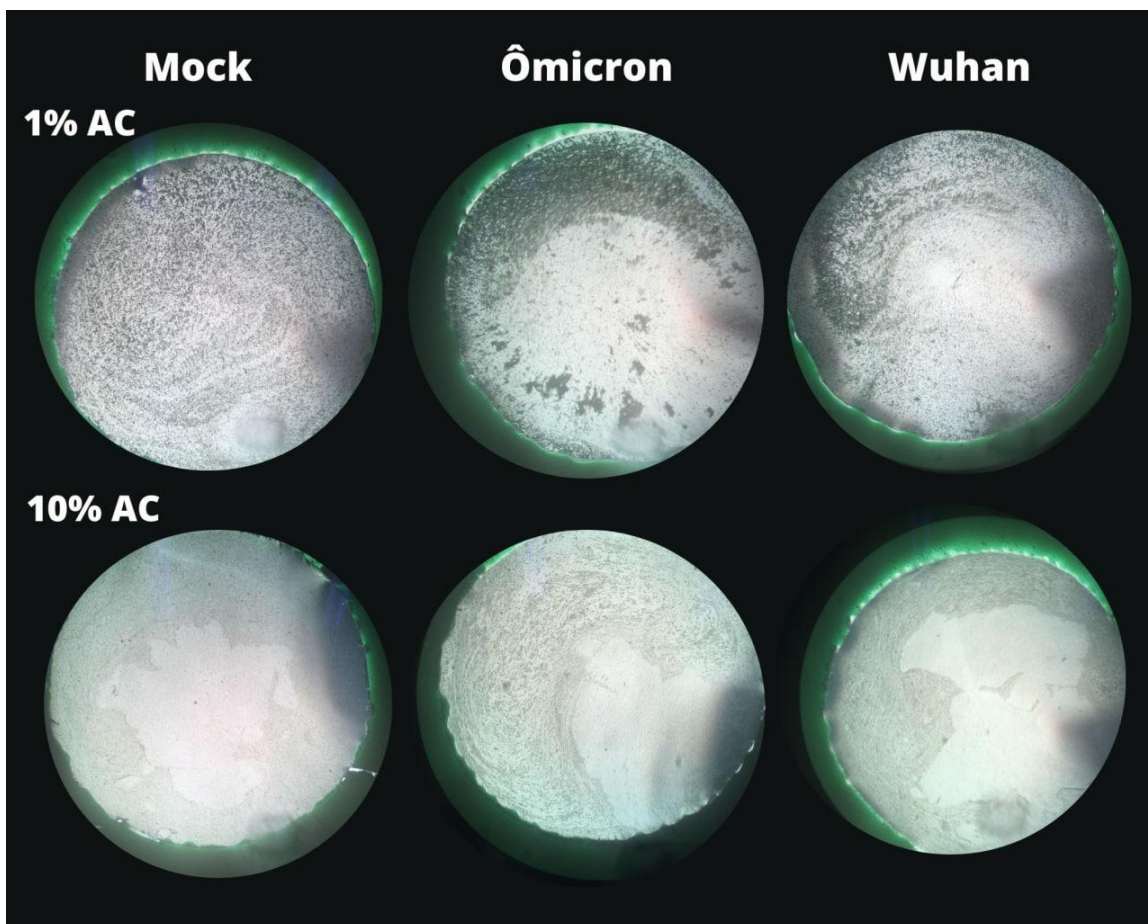
Quando observamos as lâminas ao microscópio com objetiva 10X, e obtivemos os seguintes resultados apresentados nas fotos abaixo tiradas com o celular (Figuras 10 e 11):

Figura 10: Lâminas examinadas ao microscópio com objetiva 10X mostrando aglutinação das *beads* que foram sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal.



Fonte: Compilação de fotos do microscópio pelo autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 11: Lâminas examinadas ao microscópio com objetiva 10X mostrando aglutinação das *beads* que foram sensibilizadas com 1% e 10% de anticorpo policlonal.



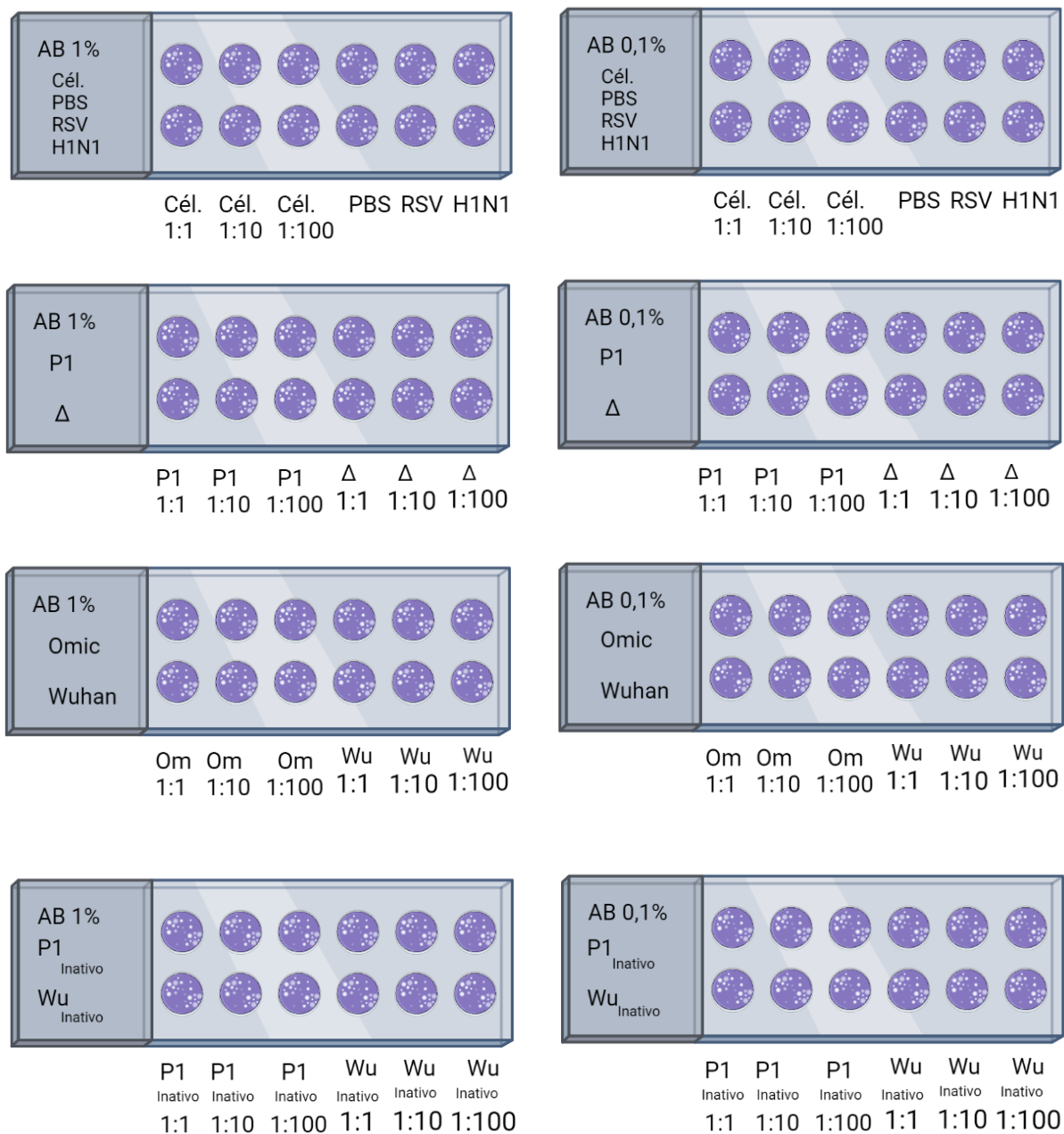
Fonte: Compilação de fotos do microscópio pelo autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

A presença de um pouco de aglutinação visível ao microscópio no Mock 1% foi preocupante, já que indica que há algum grau de reação inespecífica. Por isso resolvemos usar BSA (bovine serum albumin), para tentar minimizar a inespecificidade.

Dessa forma, utilizamos a receita de storage buffer previamente publicada (Chen, 2007). Além disso, também modificamos as concentrações de anticorpo usadas nas *beads* para 1% e 0,1%.

Para a testagem da aglutinação acrescentamos diluições seriadas das amostras: Controles negativos: Mock (de cultura de células), PBS; e vírus heterólogos RSV e influenza A H1N1; e controles positivos: P1, Delta (Δ), Ômicron (Om) e Wuhan (Wu) (Figuras 12 a 18).

Figura 12: Esquema ilustrativo dos testes de aglutinação realizados. Cél (Mock); Δ (Delta); Om ou Omic (Ômicron) Wu (Wuhan).

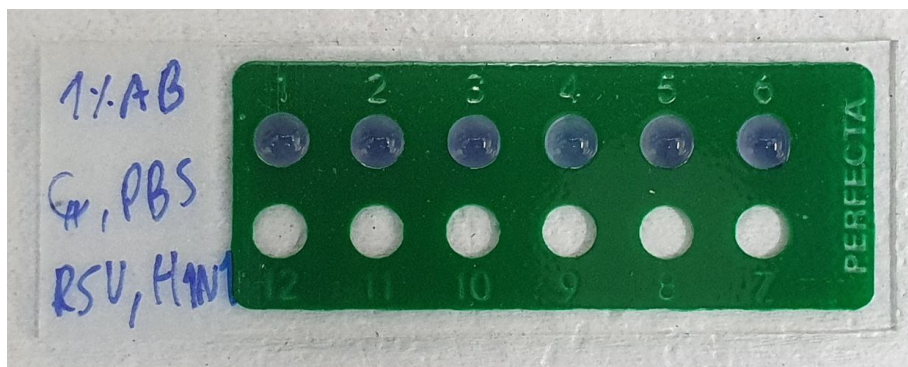


Fonte: Esquema do autor

Na primeira vez que realizamos esse delineamento experimental primeiro colocamos as *beads* em todos os poços e depois as amostras. Entretanto, percebemos que as amostras secaram antes que pudéssemos analisar. Pensando nisso, fizemos novamente o delineamento experimental, mas montando duas lâminas por vez e analisando ela.

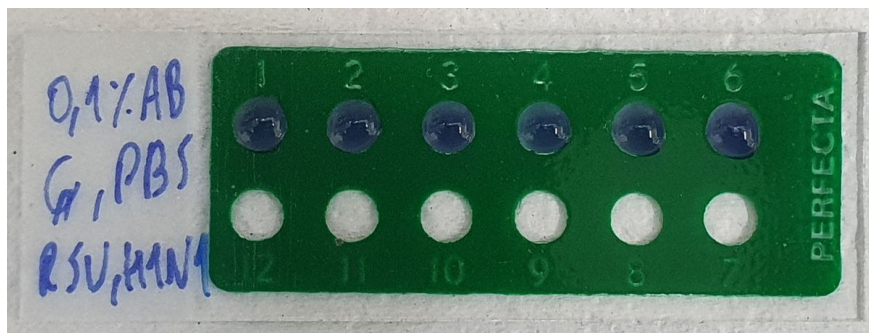
Obtivemos os seguintes resultados (Figura 13 à 18):

Figura 13: Lâmina de 12 poços com *beads* sensibilizadas (1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (Mock;PBS;RSV; H1N1)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 14: Lâmina de 12 poços com *beads* sensibilizadas (0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (Mock;PBS;RSV; H1N1)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 15: Lâminas de 12 poços com *beads* sensibilizadas (1% e 0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (Ômicron 1:1; Ômicron 1:10 ; Ômicron 1:100 ; Wuhan 1:1 ; Wuhan 1:10 ; Wuhan 1:100)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 16: Lâminas de 12 poços com *beads* sensibilizadas (1% e 0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 1:1; P1 1:10 ; P1 1:100 ; Delta 1:1 ; Delta 1:10 ; Delta 1:100) em duplicata



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 17: Lâmina de 12 poços com *beads* sensibilizadas (1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 inativo 1:1; P1 inativo 1:10 ; P1 inativo 1:100 ; Wuhan inativo 1:1 ; Wuhan inativo 1:10 ; Wuhan inativo 1:100)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

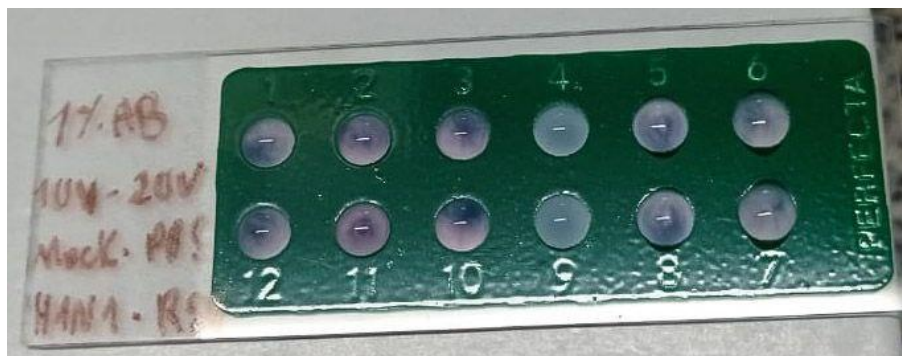
Figura 18: Lâmina de 12 poços com *beads* sensibilizadas (0,1% AC) e amostras testadas na seguinte ordem (P1 inativo 1:1; P1 inativo 1:10 ; P1 inativo 1:100 ; Wuhan inativo 1:1 ; Wuhan inativo 1:10 ; Wuhan inativo 1:100)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Os experimentos não produziram resultados satisfatórios, já que não pudemos observar. Possivelmente o acréscimo de BSA e a concentração de glicina muito alta interferiram negativamente, impedindo o processo de interação entre o anticorpo da *bead* sensibilizada e os antígenos. Os poços também foram analisados em microscópio e não foi possível observar nenhuma aglutinação. Sendo assim, voltamos a utilizar o PBS 1X sem BSA, e sensibilizamos as *beads* com o anticorpo a 1% e 0,5%. Decidimos trabalhar com as variantes P1 e Wuhan inativas por UV para facilitar a execução dos testes fora do BSL3. Nesse momento queríamos ver apenas se o processo de aglutinação estava ocorrendo. (Figura 19).

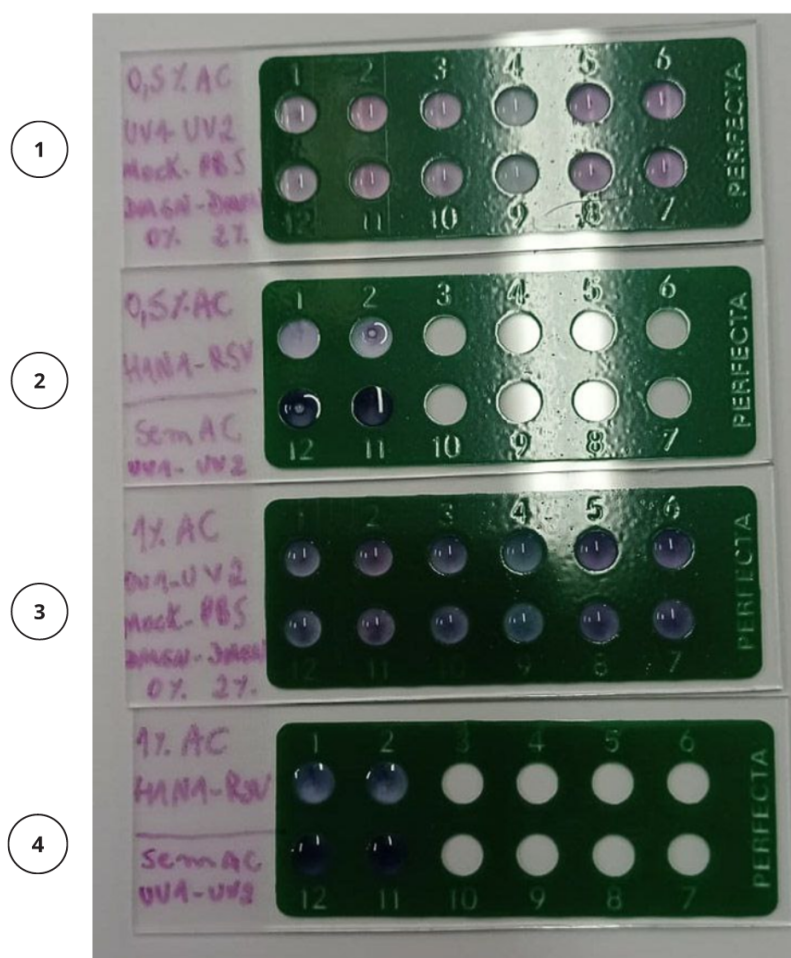
Figura 19: Resultado do teste de aglutinação realizado com as *beads* a 1%. As amostras estão na seguinte ordem: UV1 (Wuhan inativa), UV2 (P1 inativa), Mock, PBS, H1N1 e RSV.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Como observado, o procedimento não funcionou. Houve aglutinação em todos os testes, menos no controle de PBS. Verificamos posteriormente que o tampão MES estava com pH acima de 8, quando na primeira fase de sensibilização das *beads* o correto seria pH= 6, segundo protocolo do fabricante (Thermo). Outra possibilidade seria a interferência do soro fetal bovino presente no sobrenadante de células. Refizemos todas as soluções no pH correto e testamos a presença de aglutinação com DMEM 0%; DMEM 2% e também fizemos o processo de sensibilização de *beads* sem anticorpo (0%) para nos certificarmos que as *beads* não estão se ligando a outros fatores inespecificamente (Figura 20):

Figura 20: Teste de aglutinação em 4 lâminas. Na primeira temos as *beads* sensibilizadas com 0,5% de anticorpo e as amostras testadas estão na seguinte sequência: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo); Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%. Na segunda lâmina temos as *beads* sensibilizadas com 0,5% de anticorpo e as amostras testadas em 1 e 2 são respectivamente H1N1 e RSV e em 12 e 11 são as *beads* sem AC com as respectivas amostras: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo). Na terceira temos as *beads* sensibilizadas com 1% AC e as amostras testadas estão na seguinte sequência: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo); Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%. Na quarta temos as *beads* sensibilizadas com 1% AC e as amostras testadas em 1 e 2 são respectivamente H1N1 e RSV e em 12 e 11 são as *beads* sem AC com as respectivas amostras: UV1 (Wuhan inativo); UV2 (P1 inativo)

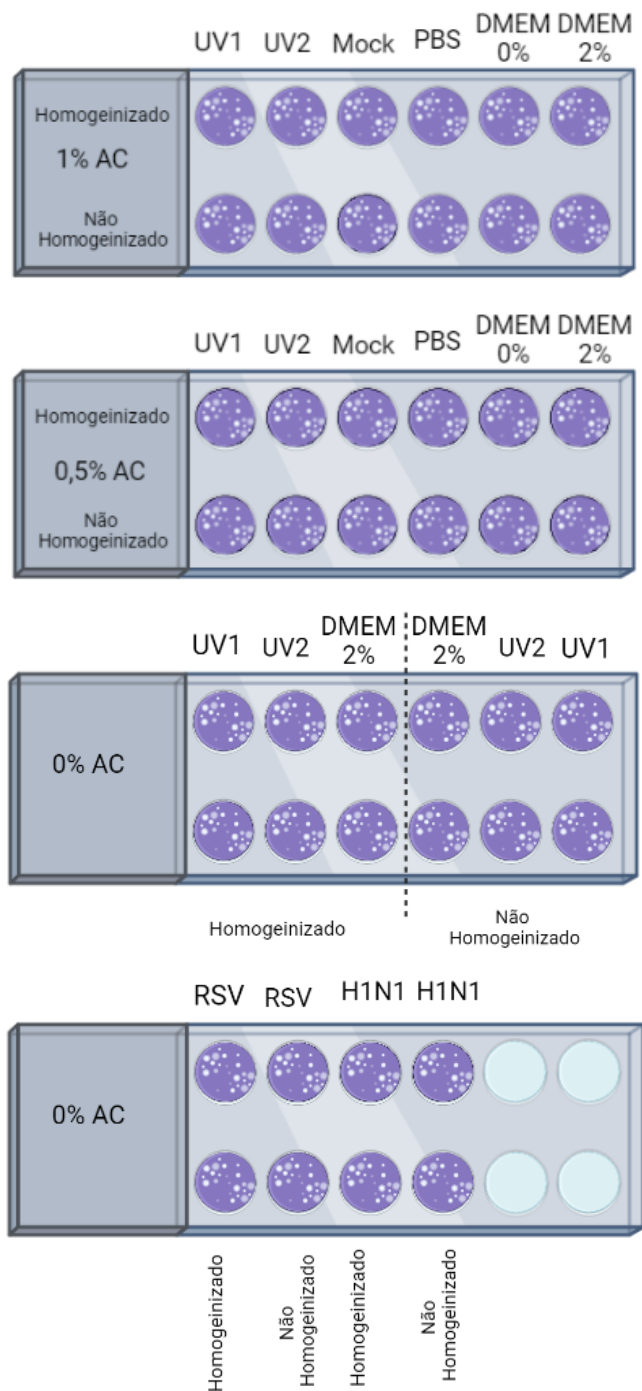


Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Percebemos que ocorre precipitação inespecífica das *beads*, que é bem diferente da aglutinação, que ocorre mais na periferia e em forma de um crescente. Podemos observar que o DMEM 0% e o DMEM 2% apresentavam resultados semelhantes, caso estivéssemos encontrando uma aglutinação inespecífica com a proteína do soro fetal bovino teríamos visto aglutinação somente no meio com 2% e não com 0%. No entanto, se estivéssemos vendo somente a precipitação das *beads*, esse resultado também teria sido encontrado nos poços que tinham somente as *beads* sem anticorpo. Sendo assim, passamos a verificar se esse agrupamento das *beads* no centro é aglutinação ou somente precipitação.

Realizamos o procedimento como foi descrito anteriormente, no entanto, também observamos se a homogeneização teria alteração na forma como as *beads* se comportavam. Além disso, acrescentamos o fator tempo, para verificar se o que observamos anteriormente era aglutinação ou precipitação. Dessa forma, como controle negativo tínhamos Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%, RSV, H1N1 e *beads* sem anticorpo; e como controles positivos UV1 (Wuhan inativado); UV2 (P1 inativado) (Figuras 21-23).

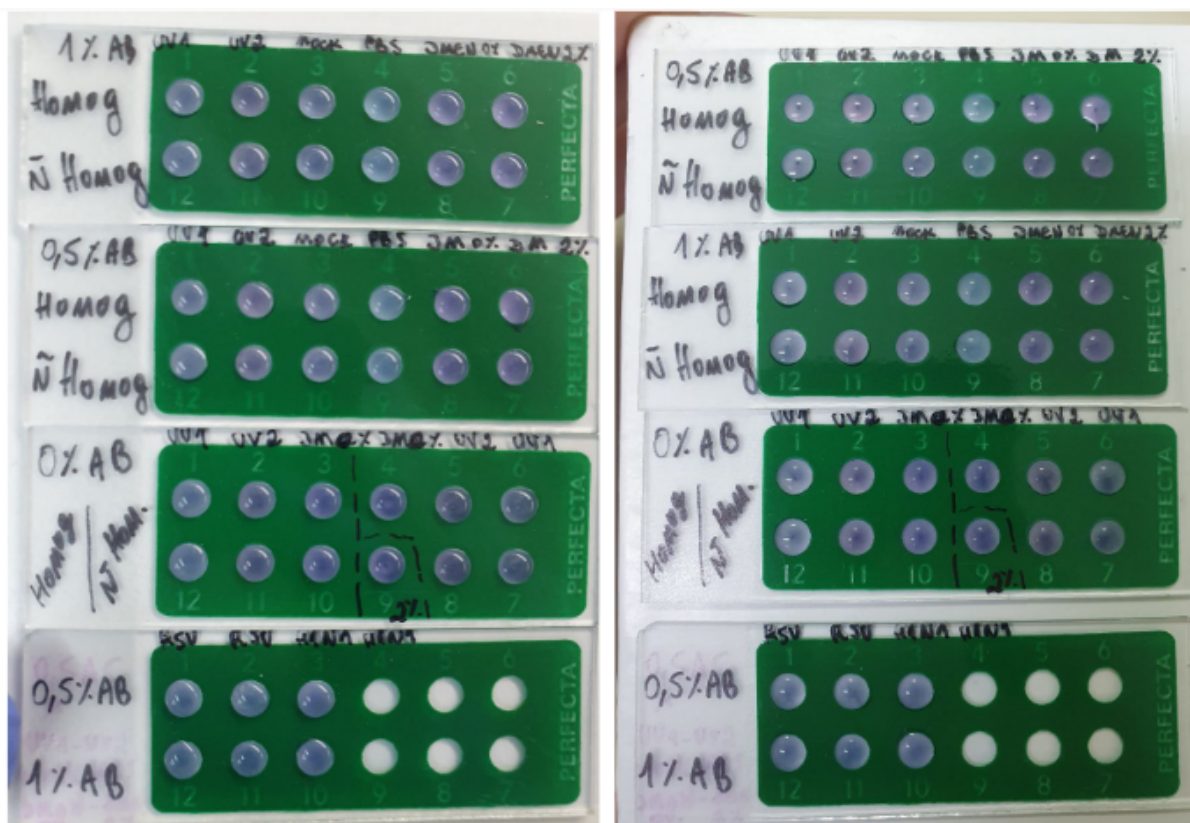
Figura 21: Esquema da disposição das amostras nas lâminas



Fonte: Esquema do autor

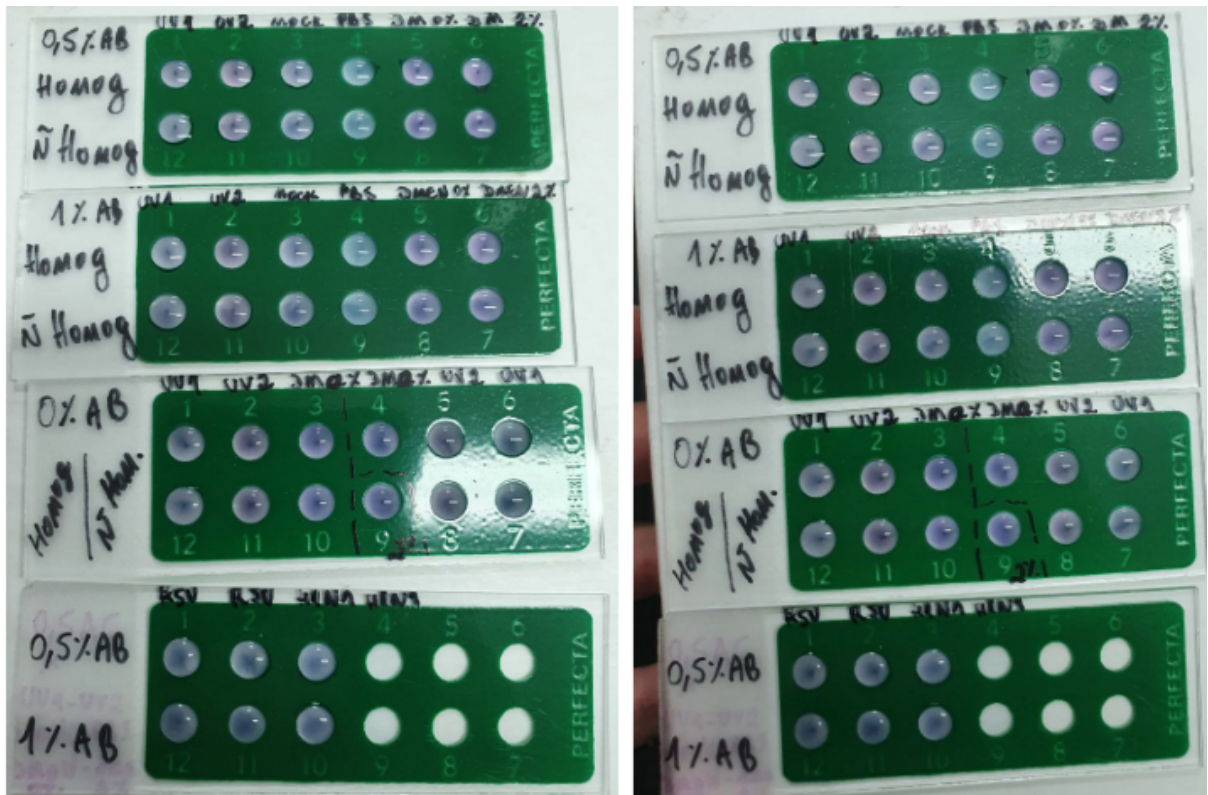
Tendo em vista o esquema de como foi delineado os testes de aglutinação nas 4 lâminas, segue abaixo os resultados do teste com o decorrer do tempo.

Figura 22 : As lâminas da direita mostram resultados 6 minutos após a mistura *beads* + amostra, e as da esquerda aos 12 minutos.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 23 : A figura A (à direita) apresenta o resultado das 4 lâminas 18 minutos após a mistura *beads* + amostra. A figura B (à esquerda) apresenta o resultado das 4 lâminas 50 minutos após a mistura *beads* + amostra



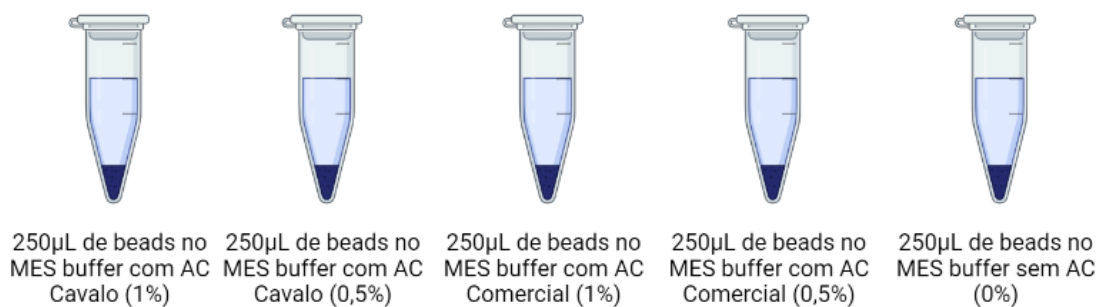
Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Percebemos que todas as amostras apresentavam imagem de precipitação das *beads* no centro do poço com o passar do tempo, inclusive nos mocks de PBS e com *beads* sem anticorpos, o que difere de aglutinação.

Pensando em aprimorar o teste, seria interessante testar outros anticorpos ou fazer um processo de refinamento no soro que estamos utilizando, como por exemplo, um processo de cromatografia para selecionar apenas os anticorpos alvo que são dirigidos para a proteína S do SARS-CoV-2. Há também a possibilidade dos nossos controles positivos não estarem sendo reconhecidos por alteração da estrutura da proteína S pela inativação por UV (H. Durchschlag, et al., 2020). Fizemos então o teste usando anticorpo comercial feito em coelho, com os controles positivos: P1; Delta; Ômicron; Wuhan, P1 inativo; Wuhan inativo, e controles negativos: Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%; RSV.

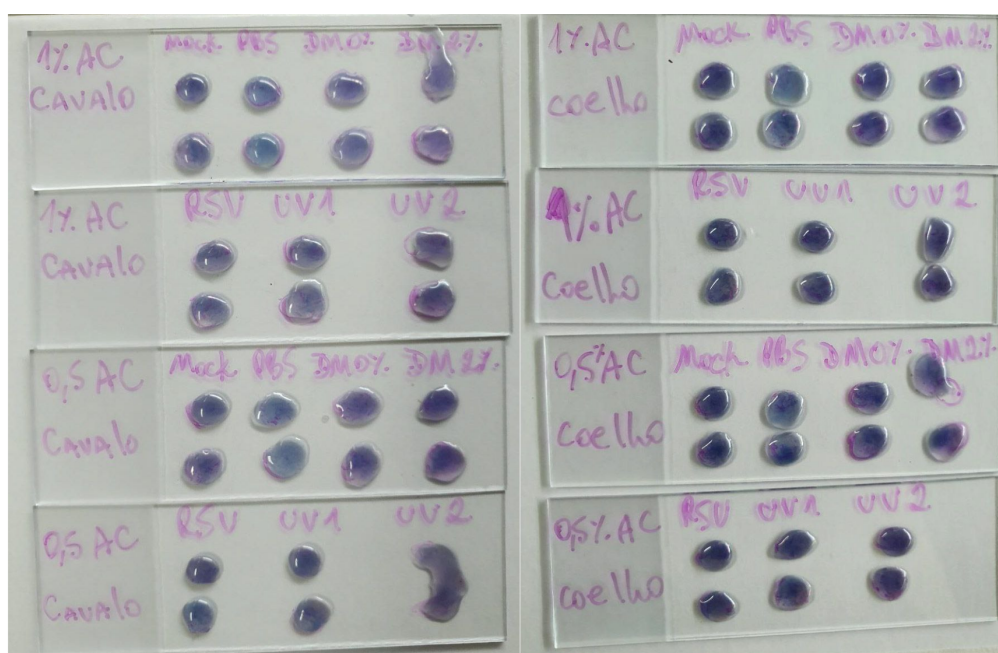
Assim, tínhamos 5 situações finais (Figuras 24 a 26).

Figura 24: Esquema representativo das 5 situações de sensibilizações de *beads*



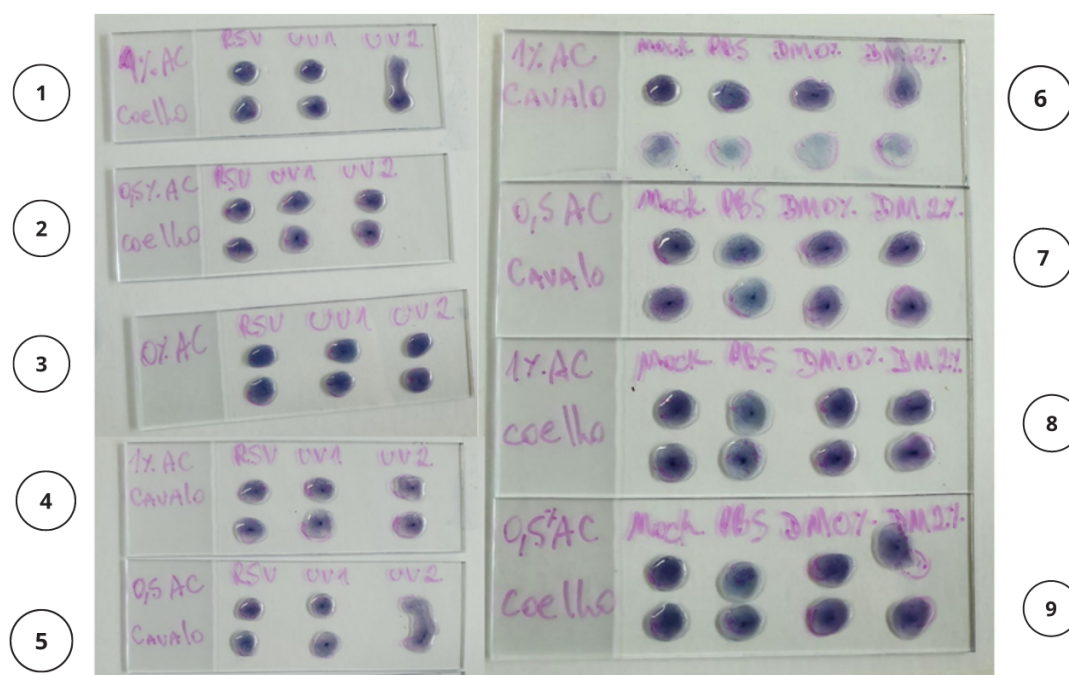
Fonte: Esquema do autor

Figura 25: Teste de aglutinação com *beads* sensibilizadas com anticorpo policlonal de cavalo (lâminas da esquerda) sendo a 1ª e 2ª lâminas com 1% de anticorpo e a 3ª e 4ª com 0,5% de anticorpo, com as seguintes amostras, da esquerda para a direita: Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%; RSV; UV1 (Wuhan inativo) e UV2 (P1 inativo). À direita temos as lâminas de aglutinação usando *beads* sensibilizadas com anticorpo comercial de coelho.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 26: Nos resultados dessa figura temos os controles negativos do experimento. Do lado esquerdo temos as lâminas 1 e 2 com as *beads* sensibilizadas com anticorpo comercial monoclonal produzido em coelho a 1% e 0,5% com as amostras de RSV UV1 e UV2. A lâmina 3 com as *beads* sem anticorpo e as amostras de RSV UV1 e UV2. As lâminas 4 e 5 com as *beads* sensibilizadas com anticorpo policlonal produzido *in house* contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ), com as amostras de RSV, UV1 e UV2. Do lado direito temos as lâminas 6 e 7 com as *beads* sensibilizadas com anticorpo policlonal produzido *in house* contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ) a 1 e 0,5% de anticorpo e as lâminas 8 e 9 com as *beads* sensibilizadas com anticorpo comercial monoclonal produzido em coelho com as seguintes amostras: Mock; PBS; DMEM 0%; DMEM 2%; RSV; UV1 (Wuhan inativo) e UV2 (P1 inativo). Essas fotos foram tiradas após 10 minutos de reação dos testes.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Pudemos observar que as *beads* que foram sensibilizadas com algum anticorpo ficam dispostas no centro da amostra depois de alguns minutos. Essa resposta foi menos observada nas lâminas que continham *beads* sem anticorpo. Pensando nisso, podemos dizer que deve estar havendo alguma interação inespecífica aqui, que esteja induzindo as *beads* a se agruparem no centro, mas não podemos identificar isso como um processo de aglutinação como verificamos nos resultados do nosso primeiro experimento.

Figura 27: Controles positivos na seguinte ordem: 1ª lâmina temos as *beads* com 1% de AC de soro de cavalo; na 2ª lâmina temos as *beads* com 0,5% de AC de soro de cavalo; na 3ª lâmina temos as *beads* com 1% de AC de anticorpo comercial feito em coelho; na 4ª lâmina temos as *beads* com 0,5% de AC de anticorpo comercial feito em coelho. Na 5ª e última lâmina temos *beads* que não foram sensibilizadas com nenhum anticorpo. Nessas 5 lâminas foram testadas as seguintes amostras na ordem a seguir: P1; Wuhan; Ômicron; Delta em duplicata. Nos dois últimos poços de cada lâmina testamos amostras clínicas com SARS-CoV-2, a de cima datada de 19/02/2021 e a do poço debaixo datada de 14/12/2021.



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Os resultados apresentados demonstraram que as *beads* não aglutinaram na presença de nossos controles positivos. No entanto, elas também não apresentaram o mesmo comportamento dos controles negativos, de se aglomerarem no meio da amostra.

5.5. Quantificação por BRADFORD dos sobrenadantes que foram retidos durante a produção de *beads* sensibilizadas.

Em alguns dos experimentos em que realizamos o protocolo de metodologia de sensibilização das *beads*, no momento em que íamos da primeira fase do protocolo para a segunda (depois de deixar as *beads* incubando *overnight*) retiramos e guardamos alguns sobrenadantes para a quantificação de proteínas (anticorpos). Dessa forma, podemos analisar de forma quantitativa, o quanto de anticorpo que não se ligou às *beads* quando comparados ao valor inicial de anticorpo. Lembrando que no tópico 5 “e” tínhamos quantificado por BRADFORD por meio da equação da reta, o valor da concentração do soro de anticorpo policlonal realizado em cavalo (3,9 mg/mL). Da mesma forma, fizemos a quantificação por BRADFORD da absorbância do sobrenadante do primeiro experimento realizado com as *beads* sensibilizadas a 1%, no qual conseguimos observar a aglutinação. Obtivemos os seguintes resultados:

- Valor da absorbância do anticorpo a 1% do primeiro experimento: 0,120

Esse valor podemos aplicar na equação da reta que encontramos no tópico 5 “e”:

$$y = 0,6312x + 0,0344$$

$$0,120 = 0,6312x + 0,0344$$

$$x = (0,120 - 0,0344) \div 0,6312$$

$$x = 0,136 \text{ mg/mL}$$

Dessa forma, podemos observar que tanto a absorbância, quanto a concentração diminuíram consideravelmente. O que pode ser um indicativo de que os anticorpos realmente se ligaram às *beads*, restando apenas 0,136 mg/mL de proteína/anticorpo no sobrenadante. Além disso, também fizemos a quantificação do sobrenadante das *beads* sensibilizadas a 1% no segundo experimento (no qual não foi possível observar a aglutinação)

- Valor da absorbância do anticorpo a 1% do segundo experimento: 0,140

Esse valor podemos aplicar na equação da reta que encontramos no tópico 5 “e”:

$$y = 0,6312x + 0,0344$$

$$0,140 = 0,6312x + 0,0344$$

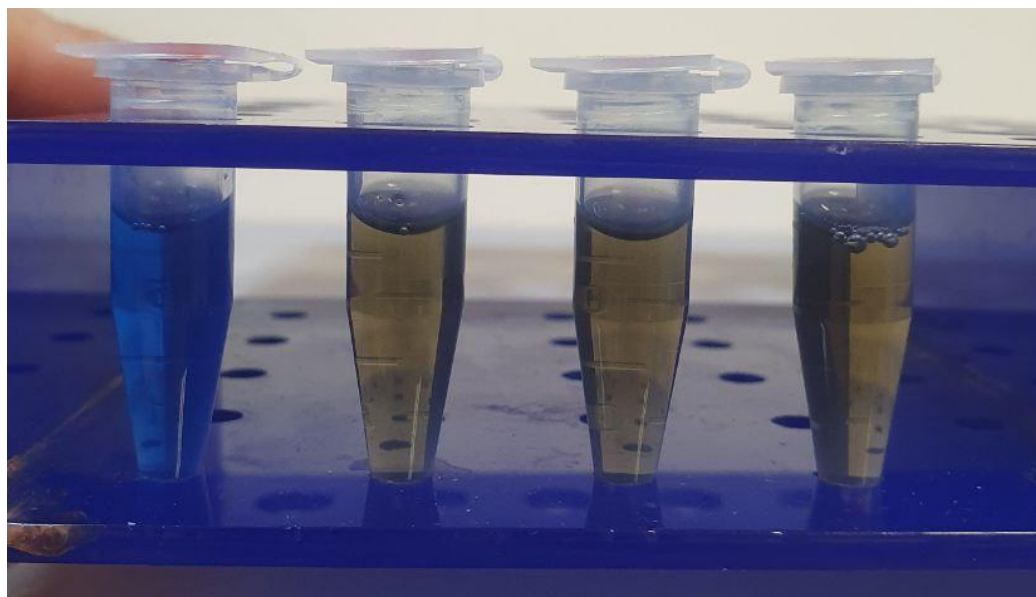
$$x = (0,140 - 0,0344) \div 0,6312$$

$$x = 0,167 \text{ mg/mL}$$

Sendo assim, podemos observar que tanto a absorbância, quanto a concentração das proteínas no sobrenadante também diminuíram. Os valores foram um pouco maiores que no do primeiro experimento, mas não teve muita divergência. Esse resultado pode indicar que os anticorpos também se ligaram às *beads* no segundo experimento e que provavelmente o que pode ter dado errado no protocolo não foi na primeira etapa da

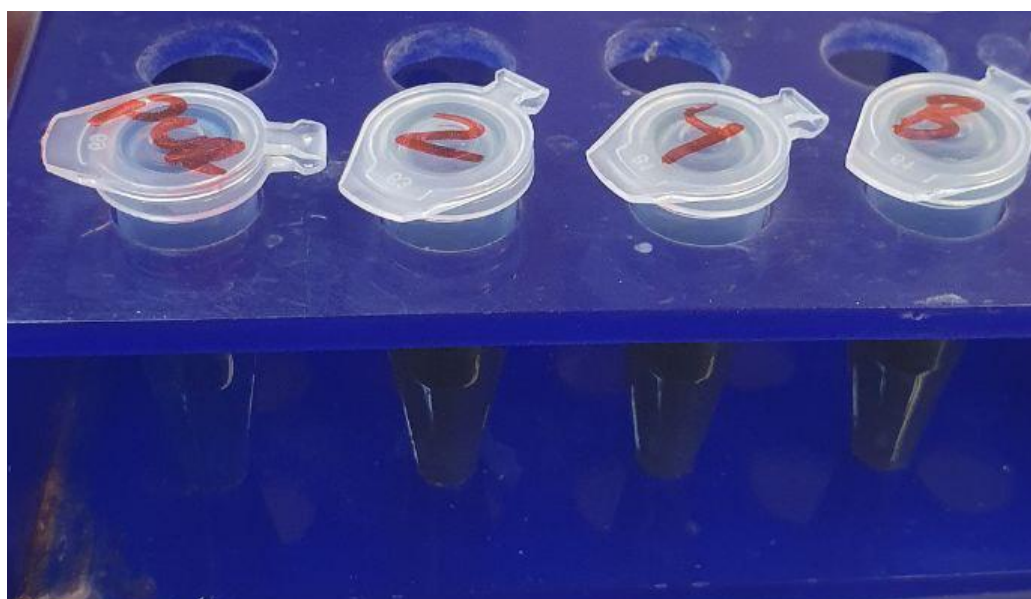
metodologia. Uma outra forma de perceber o quanto diminuiu a concentração de proteína nos sobrenadantes quando comparados a concentração de anticorpo inicial é pela cor das amostras dos sobrenadantes com relação amostra pura com o reagente de BRADFORD, que indica que quanto mais azul, maior a quantidade de proteínas, como podemos observar nas imagens abaixo (Figura 27 e 28):

Figura 28: Amostras de sobrenadante do processo de sensibilização das *beads* com reagente de BRADFORD



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Figura 29: Sequência das amostras de sobrenadante do processo de sensibilização das *beads* com reagente de BRADFORD na seguinte ordem: Puro (anticorpo puro); 2 (sobrenadante do primeiro experimento); 4 (sobrenadante do segundo experimento) ; B (branco)



Fonte: Foto do autor tirada no laboratório de patogênese viral na USP-RP

Dessa forma, podemos observar que a diferença de coloração é bem marcante da amostra pura quando comparada aos sobrenadantes, mas que os sobrenadantes apresentam colorações parecidas. Entretanto, um fator que precisa ser levado em consideração nesse experimento é se os anticorpos são estáveis a 4°C, pois estes sobrenadantes foram armazenados na geladeira e estudos indicam que a melhor forma de armazenar os anticorpos é congelando-os para que eles não desnaturem. Pensando nisso, pode ser que tenhamos encontrado uma quantidade baixa de absorvância e concentração porque as proteínas estavam degradadas. Sendo assim, realizamos novamente essa quantificação com um terceiro experimento, no qual o sobrenadante foi mantido a -70°C congelado.

- Valor da absorvância do anticorpo a 1% do terceiro experimento: 0,092

Esse valor podemos aplicar na equação da reta que encontramos no tópico 5 “e”:

$$y = 0,6312x + 0,0344$$

$$0,092 = 0,6312x + 0,0344$$

$$x = (0,092 - 0,0344) \div 0,6312$$

$$x = 0,091 \text{ mg/mL}$$

Dessa forma, observamos que encontramos concentrações parecidas de proteína nas quantificações dos 3 experimentos. Observamos novamente que a concentração diminuiu consideravelmente quando comparada ao valor puro do soro, o que indica que a sensibilização das *beads* ocorreu. Além disso, a concentração e absorvância do terceiro experimento não modificou muito quando comparada ao primeiro e segundo, o que indica que o anticorpo aparenta ser estável a temperatura de 4°C.

6. CONCLUSÃO

O processo de padronização deste método diagnóstico tem sido complexo, e requer cuidadosa atenção a muitos detalhes, desde variações pequenas de pH nos tampões, a qualidade das *beads*, concentrações de anticorpos, entre outros. Os nossos resultados indicam que a metodologia de aglutinação para reconhecimento de antígenos de SARS-CoV-2 pode funcionar, como observamos no resultado do primeiro experimento, nas amostras em que as *beads* foram sensibilizadas com anticorpo policlonal produzido in house contra a proteína de superfície viral (espícula) em colaboração com a Profa Leda Castilho (UFRJ). Talvez a pouca aglutinação inespecífica vista ao microscópio seja negligível, mas experimentos adicionais precisariam ser feitos para estipular-se um tempo definido para a observação da presença de aglutinação, visto que com o passar do tempo pode haver imagens equívocas que confundam o observador. Assim, o teste ainda não é reproduzível o suficiente para aplicação clínica.

Já que os dados de concentração de proteínas dos sobrenadantes guardados após o período de incubação das *beads* com os anticorpos indicaram que houve ligação dos anticorpos às *beads*, podemos pensar em outras razões para nossos resultados, o posicionamento dos anticorpos na *beads*, já que a porção Fab precisa estar livre para se

ligar ao antígeno, o que pode ser resolvido com o uso de proteína A ligante de porção Fc. Outro possível problema é a produção da proteína que foi utilizada para sensibilizar os cavalos e produzir o anticorpo contra SARS-CoV-2, que foi feita em procarionte, incapaz portanto de modificações pós-traducionais, e assim gerar proteína estruturalmente diferente da proteína nativa. Por fim, como trabalhamos com anticorpos policlonais, é provável que as *beads* estejam recobertas com anticorpos de diferentes especificidades, o que requereria o uso de anticorpo monoclonais ou purificação de anticorpos anti-S a partir do soro.

7. REFERÊNCIAS

1. Alves, Diana, et al. Rapid gel card agglutination assays for serological analysis following SARS-CoV-2 infection in humans. *ACS sensors*. 2020; 5.8: 2596-2603.
2. Chen, Jianfeng, et al. A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007; 19.2 : 155-160.
3. Durchschlag, H., et al. Effects of X-and UV-irradiation on proteins. *Radiation Physics and Chemistry*. 1996; 47.3: 501-505.
4. Esmail, Sally, et al. Rapid and accurate agglutination-based testing for SARS-CoV-2 antibodies. *Cell reports methods*. 2021; 1.2: 100011.
5. Huang, Chaolin, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*. 2020; 395(10223): 497-506.
6. Kasempimolporn, S., et al. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38.8: 3098-3099.
7. Kesarwani, Vidhishri, et al. Column Agglutination Assay Using Polystyrene Microbeads for Rapid Detection of Antibodies against SARS-CoV-2. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022; 14.2: 2501-2509.
8. Kruse, Robert L., et al. A rapid, point-of-care red blood cell agglutination assay detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2021; 553: 165-171.
9. Luppino, Plinio Luis. Detecção do vírus dengue pela técnica de aglutinação do látex modelo experimental. 2007.
10. Marco Ciotti, Massimo Ciccozzi, Alessandro Terrinoni, Wen-Can Jiang, Cheng-Bin Wang & Sergio Bernardini. The COVID-19 pandemic. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2020; 57.6: 365-388.
11. Molina-Bolívar, J. A., and F. Galisteo-González. Latex immunoagglutination assays. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 2005; 45.1: 59-98.
12. Oliveira, Beatriz Araujo, et al. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2020; 62.

13. Protocolo de Absorção Passiva em beads de Latex da Thermo retirado no site :
<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/qdots-microspheres-nanospheres/idc-surfactant-free-latex-beads/latex-bead-protein-coupling-protocols/passive-adsorption-protocol.html> >
14. Protocolo de Bradford Realizado pelo Laboratório do Prof. Dr. Sandro Valentini na UNESP retirado do seguinte link:
<http://www.fcfar.unesp.br/laboratorio_sandro_valentini/pdf/P10-%20QUANTIFICACAO%20DE%20PROTEINA%20-%20METODO%20BRADFORD.pdf >
15. Satarker, Sairaj, and Madhavan Nampoothiri. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Archives of medical research*. 2020; 51.6: 482-491.
16. Townsend, Alain, et al. A haemagglutination test for rapid detection of antibodies to SARS-CoV-2. *Nature communications*. 2021; 12.1: 1-12.
17. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities: interim guidance, 25 June 2021. World Health Organization, 2021.
18. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265–269.
19. Xinglin, Jia, et al. The development and application of the latex agglutination test to detect serum antibodies against Japanese encephalitis virus. *Veterinary research communications*. 2002; 26.6: 495-503.
20. Xu, Xiaojuan, et al. Latex agglutination test for monitoring antibodies to avian influenza virus subtype H5N1. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43.4 : 1953-1955.
21. Youil, R., et al. Phenotypic and genetic analyses of the heterogeneous population present in the cold-adapted master donor strain: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virus research*. 2004; 102.2: 165-176.