

CAMILA PEREIRA SOARES

Padronização da técnica SHERLOCK (*Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) utilizando a proteína Cas13a para diagnóstico do Vírus Respiratório Sincicial em pacientes pediátricos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo

2023

CAMILA PEREIRA SOARES

Padronização da técnica SHERLOCK (*Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) utilizando a proteína Cas13a para diagnóstico do Vírus Respiratório Sincicial em pacientes pediátricos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon
Versão Original

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Soares, Camila Pereira
Padronização da técnica SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) utilizando a proteína Cas13a para diagnóstico do Vírus Respiratório Sincicial em pacientes pediátricos / Camila Pereira Soares; orientador Edison Luiz Durigon. -- São Paulo, 2023.
97 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diagnóstico Molecular. 2. CRISPR-Cas. 3. Vírus Respiratório Sincicial Humano. 4. Diagnóstico sorológico. 5. Covid-19. I. Durigon, Edison Luiz, orientador. II. Título.



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padronização da técnica SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) utilizando a proteína Cas13a para diagnóstico do Vírus Respiratório Sincicial em pacientes pediátricos.

Pesquisador: CAMILA PEREIRA SOARES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64118722.1.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.748.217

Apresentação do Projeto:

O texto a seguir foi extraído de "Informações básicas" do protejo_1253089: O VRS é um vírus amplamente distribuído no mundo e é o principal vírus envolvido em infecções respiratórias do trato inferior. A população de risco dessas infecções são crianças menores de 5 anos, pacientes imunocomprometidos e idosos. O VRS pertence à família Pneumoviridae, seu genoma é composto por uma molécula de RNA fita simples e codifica 11 proteínas. Dividido em 2 grupos antigênicos com base na genotipagem da proteína G (A e B), possui diversos genótipos bem caracterizados dentro de cada grupo. A similaridade entre os sintomas causados pela infecção do VRS com outros vírus respiratórios inviabiliza o diagnóstico clínico preciso. Nesse contexto, os métodos de diagnósticos laboratoriais se apresentam extremamente importantes. Primeiramente, porque impedem a prática comum de prescrição de antibióticos e porque medidas de isolamento de pacientes podem ser aplicadas diminuindo o grau de disseminação viral. Algumas novidades têm surgido nos últimos anos no que se refere à diagnóstico molecular, no entanto, uma têm se apresentado de forma bastante promissora: a técnica de edição gênica CRISPR-Cas. A técnica que utiliza a endonuclease de origem bacteriana Cas9 para editar sequências de DNA já tem seu estudo bastante difundido, e agora novas proteínas começaram a competir pelos holofotes. Dois artigos publicados no início de 2018 mostraram o sucesso de duas técnicas que utilizaram proteínas como a Cas13 e a Cas12 no diagnóstico de vírus como Zika e HPV. A técnica SHERLOCK

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.748.217

(Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) conseguiu detectar com alta sensibilidade e especificidade o RNA viral de amostras em poucos minutos utilizando a proteína Cas13a. Uma característica dessa técnica que a torna simples e rápida é a utilização da técnica RPA (Reaction Polymerase Amplification) como método de amplificação do material genético que, diferentemente do PCR é isotermal, e dispensa o uso de aparelhos termociladores. Nosso objetivo nesse trabalho é padronizar a técnica SHERLOCK, utilizando a proteína Cas13a de *Leptotrichia wadeii* para detectar o Vírus Respiratório Sincicial Humano em amostras de crianças com doença respiratória aguda e comparar com a técnica padrão de Real Time PCR

Objetivo da Pesquisa:

O texto a seguir foi extraído de "Informações básicas" do projeto_1253089:

Objetivo Primário:

Esse trabalho tem por objetivo padronizar a técnica SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) utilizando a proteína Cas13a de *Leptotrichia wadeii* para detectar o Vírus Respiratório Sincicial VRS diretamente de material clínico de crianças com doença respiratória aguda e comparar com a técnica padrão de Real Time PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos, uma vez que utilizarão amostras do biorepositório CEPISH 028.2016, autorizado e atualizado por esse CEP. A autora do projeto, ainda reforça que utilizara todas as medidas de biossegurança para evitar contaminação.

Os benefícios são inúmeros desde a utilização de uma técnica promissora e com aplicabilidades múltiplas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma resposta de pendência

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora alterou corretamente o PB de informações básicas e o documento de justificativa para dispensa de TCLE foram atualizados, bem como ainda apresentou uma carta de resposta a pendência.

Recomendações:

Não há

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.748.217

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram respondidos e atualizados no o PB de informações básicas.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1253089.pdf	26/10/2022 11:27:36		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	26/10/2022 11:27:23	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_Biorrepositorio_2022.pdf	26/10/2022 11:24:46	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Ausencia_TCLE.pdf	26/10/2022 11:16:01	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
Cronograma	Cronograma_2022.pdf	26/10/2022 10:55:39	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Adendo_Biorrepositorio_Durigon_Parecer_Consubstanciado_5856486_Erika_Donizetti.pdf	11/10/2022 15:09:16	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	Autorizacao_Biorrepositorio_2016_Durigon_OfCEPSH_028_2016.pdf	11/10/2022 15:08:32	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.748.217

Biobanco	Autorizacao_Biorrepositorio_2016_Durigon_ORCEPSH_028_2016.pdf	11/10/2022 15:08:32	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	11/10/2022 10:50:45	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Orcamento.pdf	11/10/2022 10:42:00	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	08/07/2022 15:22:30	CAMILA PEREIRA SOARES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Novembro de 2022

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é fruto da minha dedicação, mas também de colaborações e do apoio de amigos de trabalho e familiares. Boa parte deste trabalho foi desenvolvido durante a pandemia da Covid-19 e poder concluí-lo é de enorme gratificação. Aos que contribuíram para a conclusão desta etapa dedico os meus sinceros agradecimentos:

Professor Edison, por ter me recebido em seu laboratório em 2016 como aluna de iniciação científica e me agraciou com inúmeras oportunidades de aprendizado, sempre confiando no meu trabalho.

Danielle, por ter me acolhido com tanto carinho ao grupo, ensinado com muita paciência como se trabalha com amostras clínicas e como construir um ambiente feliz de trabalho valorizando os jovens cientistas

Flávio, pela amizade construída na graduação e estreitada no laboratório, mesmo distante teve uma contribuição enorme para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Vanessa, Érika, Erick, Ralyria, Rafael, Cairo, Bruna e Thais, pelo incentivo, pelas conversas científicas e pelos ótimos momentos compartilhados durante o almoço e comemorações de aniversário.

Aos colegas de trabalho que realizam a rotina clínica de vírus respiratório, Luciano, Erick, Vanessa, Bruna e Camila

Luciano e Zé pelo apoio técnico

Professora Andrea Balan, Professor Enrique e Dra. Viviane Botosso pelas ideias para solucionar os problemas que enfrentei

Victor pelo incentivo, ideias e pela parceria nas etapas de purificação de proteína

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas e ao Prof. Luís Carlos pela disponibilização de diversos equipamentos

Aos hospitais parceiros e suas equipes

A minha amiga Gabriela com quem morei durante os anos de mestrado, pelo companheirismo, paciência e disposição para me ajudar sempre que precisei.

Eduardo, por todo amor, paciência, apoio emocional e por acreditar que eu conseguiria realizar todo o trabalho

Aos meu pais, Raquel e Antonio, pelo incentivo, amor e compreensão na ausência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida, processo nº 2018/23680-0

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Soares CP. Padronização da técnica SHERLOCK (*Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) utilizando a proteína Cas13a para diagnóstico do Vírus Respiratório Sincicial em pacientes pediátricos. Mestrado em Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2023.

Este trabalho foi dividido em 2 capítulos, sendo o segundo capítulo destinado aos trabalhos com SARS-CoV-2 realizados durante o período da pandemia. O título não contempla este capítulo.

O RSV é um vírus amplamente distribuído no mundo e é o principal vírus envolvido em infecções respiratórias do trato inferior. A principal população de risco dessas infecções são crianças menores de 5 anos. Nesse contexto, os métodos de diagnósticos laboratoriais se apresentam extremamente importantes devido a similaridade entre os sintomas causados pela infecção do RSV com outros vírus respiratórios. Esse trabalho propôs utilizar a enzima LwCas13a como detectora do RSV em amostras de pacientes pediátricos tendo como base a técnica SHERLOCK. A proteína recombinante foi obtida utilizando cromatografia de afinidade e gel filtração para purificação. O RNA alvo foi desenhado com base em uma região conservada no gene *M* do RSV. Em amostras clínicas previamente amplificadas por PCR convencional, 100% foram detectadas pela enzima e em amostras sem amplificação prévia 45,3% foram detectadas. Não houve reação cruzada em nenhum dos testes com outros vírus de importância respiratória.

Durante o enfrentamento à Covid-19 em 2020 e 2021, produzimos um teste de ELISA para detectar anticorpos IgG/IgA/IgM contra duas nucleoproteínas recombinantes, uma comercial e uma produzida *in house*. O teste foi padronizado em comparação ao ensaio padrão ouro de neutralização viral (VNT₁₀₀). Para todas as três imunoglobulinas obtivemos valores acima de 88% de sensibilidade e 94% de especificidade. O ensaio foi empregado na triagem de doadores e receptores de plasma convalescente, no diagnóstico fornecido para 7 hospitais público da cidade de São Paulo. Além disso, padronizamos um ensaio ELISA para IgG utilizando sangue capilar seco coletado em papel de filtro. Na tentativa de facilitar a coleta de amostras em um cenário de pandemia.

Palavras-chave: RSV. CRISPR-Cas. Diagnóstico. SARS-CoV-2. ELISA

ABSTRACT

Soares CP. Standardization of SHERLOCK technique (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) using the Cas13a protein for the diagnosis of Respiratory Syncytial Virus in pediatric patients. (Masters thesis Microbiology - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2023.

This work was divided into 2 chapters, the second chapter being devoted to work with SARS-CoV-2 carried out during the pandemic period. The title does not include this chapter.

RSV is a widely distributed virus worldwide and is the main virus involved in lower respiratory tract infections. The main population at risk for these infections are children under 5 years of age. In this context, laboratory diagnostic methods are extremely important due to the similarity between the symptoms caused by RSV infection and other respiratory viruses. This work proposed to use the enzyme LwCas13a as a detector of RSV in samples from pediatric patients based on the SHERLOCK technique. Recombinant protein was obtained using affinity chromatography and gel filtration for purification. The target RNA was designed based on a conserved region in the RSV M gene. In clinical samples previously amplified by conventional PCR, 100% were detected by the enzyme and in samples without prior amplification 45.3% were detected. There was no cross-reaction in any of the tests with other viruses of respiratory importance.

During the Covid-19 pandemic in 2020 and 2021 we produced an ELISA test to detect IgG/IgA/IgM antibodies against two recombinant nucleoproteins, one commercial and one produced in house. The test was standardized against the gold standard viral neutralization assay (VNT100). For all three immunoglobulins we obtained values above 88% sensitivity and 94% specificity. The assay was used in the screening of convalescent plasma donors and recipients, in the diagnosis provided to 7 public hospitals in the city of São Paulo. In addition, we have standardized an ELISA assay for IgG using dried capillary blood collected on filter paper. To facilitate sample collection in a pandemic scenario.

Keywords: RSV. CRISPR-Cas. Diagnosis. SARS-CoV-2. ELISA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus celsius

%: porcentagem

(+) ssRNA: RNA de simples fita de polaridade positiva

(-) ssRNA: RNA de simples fita de polaridade negativa

ACE2: *angiotensin converting enzyme 2* (enzima conversora de angiotensina 2)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA: *complementary Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

CPI: Comissão Parlamentar de Inquérito

crRNA: *CRISPR derived RNA*

CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CV: coeficiente de variação

DMEM: *meio de Eagle modificado por Dulbeccos*

DO: densidade ótica

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA: Estados Unidos da América

FAM: *Fluorescein amidite* (Amidita de Fluoreceína)

FDA: *Food and Drug Administration* (Agência regulatória dos EUA)

h: hora

HU: Hospital Universitário

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IPTG: *isopropyl β -D-1-thiogalacpyranoside*

IRA: infecção respiratória aguda

kDa: quilodalton

LAMP: *loop-mediated isothermal amplification* (amplificação isotermica medida por loop)

L: litro

LB: meio Luria-Bertani

LVCM: laboratório de virologia clínica e molecular

M: proteína de matriz do vírus respiratório sincicial humano

MEGA: *molecular evolutionary genetics analysis*

MERS: *Middle East Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória do Oriente Médio)

MERS-CoV: Coronavírus associado a MERS

mL: mililitro

mg: miligrama

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

N: nucleoproteína

NTD: N-terminal

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

PBS: phosphate-buffered saline (tampão fosfato salina)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial de hidrogênio

RBD: *receptor Binding Domain* (domínio de ligação ao receptor)

RNA: ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RNase A: ribonuclease pancreática bovina A

rpm: rotação por minuto

RSV: *Respiratory Syncytial Virus* (Vírus Respiratório Sincicial Humano)

RSVA: *Respiratory Syncytial Virus type A* (Vírus Respiratório Sincicial Humano grupo A)

RSVB: *Respiratory Syncytial Virus Type B* (Vírus Respiratório Sincicial Humano grupo B)

RT-qPCR: *real time reverse transcription polymerase chain reaction* (transcrição reversa seguida de PCR em tempo real)

SARS: *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória Aguda Grave)

SARS-CoV: Coronavírus associado a SARS

SARS-CoV-2: Coronavírus 2 associado a SARS

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (sódio dodecil sulfato)

μL: microlitro

μg: micrograma

μM: micromolar

USP: Universidade de São Paulo

TB: Terrific Broth

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da partícula viral do RSV..	21
Figura 2- Esquema simplificado do funcionamento do sistema CRISPR-CAS9 em célula procariótica.	27
Figura 3- Divisão do sistema CRISPR-CAS e seus tipos	28
Figura 4- Mapa do vetor PC013-LwCas13a utilizado para expressão da proteína recombinante.	35
Figura 5- Esquema da organização do genome do RSV com destaque para o gene <i>M</i>	38
Figura 6- Teste para avaliação da expressão da LwCas13a na linhagem celular BL21 (DE3) PLYS.	43
Figura 7- Purificação proteína recombinante LwCas13a na linhagem celular pLYS.	44
Figura 8- Imagem esquemática da obtenção da sequência para produção do crRNA	45
Figura 9- Imagem da cultura celular 5 após a infecção com RSV (A e B) e controle negativo.	46
Figura 10- Resultado da eletroforese em gel de agarose 2%.	47
Figura 11- Valores de fluorescência obtidos após 1h de reação à 37°C, para 25ng/ugL, 50ng/μL e 100ng/μL de ssRNA alvo.	48
Figura 12- Comparação entre RT-PCR em tempo.	49
Figura 13- A) Médias da fluorescência das amostras testadas usando a enzima LwCas13a com amplificação por PCR convencional.	51
Figura 14- Representação esquemática da partícula viral do SARS-CoV-2.	66
Figura 15- Estrutura da proteína Spike do SARS-CoV-2	67
Figura 16- Distribuição da amostragem utilizada.	73
Figura 17- Distribuição do painel controle.	74
Figura 18- Avaliação da quantidade de antígeno e diluição do soro	79
Figura 19- Curvas Roc obtidas da comparação entre o teste <i>gold standart</i> VNT ₁₀₀ e o ELISA IgM, IgA e IgG e índice de reatividade.	81
Figura 20- Comparação do índice de reatividade entre as amostras de soro (azul) e coletas em papel filtro (verde)	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequencias sintéticas completas do RNA guia (crRNA) e do RNA repórter	38
Tabela 2- Sequencias de primers utilizados para amplificação do gene <i>M</i>	40
Tabela 3- Sensibilidade e especificidade detecção LwCas13a com amplificação prévia por PCR convencional comparado com teste padrão de RT-PCR em tempo real. ..	50
Tabela 4- Sensibilidade e especificidade detecção LwCas13a sem amplificação prévia por PCR convencional comparado com teste padrão de RT-PCR em tempo real. ..	50
Tabela 5- Parâmetros utilizados para o teste ELISA com antígeno Ag7 Nucleoproteína SARS-COV2	79
Tabela 6- Sensibilidade e especificidade do ELISA IgM, IgA e IgG comparados com o teste VNT100	82
Tabela 7- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgG no soro.....	82
Tabela 8- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgA no soro	83
Tabela 9- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgM no soro.....	84
Tabela 10- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgG no soro. .	84
Tabela 11- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgA no soro ..	85
Tabela 12- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgM no soro. .	86
Tabela 13- Sensibilidade e especificidade para o teste ELISA IgG no papel filtro em comparação ao teste ELISA no soro.	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 OBJETIVO	31
1.2.1 Objetivos Específicos.....	31
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
1.3.1 Amostragem.....	32
1.3.3 Fluxograma	33
1.3.4 Teste de expressão da proteína recombinante LwCas13a	33
1.3.5 Purificação da proteína recombinante LwCas13a	36
1.3.6 Análise por Western Blot	37
1.3.7 Seleção da região alvo para detecção e produção do RNA guia (crRNA).....	37
1.3.8 Crescimento viral e extração de RNA.	39
1.3.9 Produção do ssRNA alvo RSVA e RSVB.....	39
1.3.10 Teste de atividade proteína recombinante LwCas13a.....	40
1.3.11 Sensibilidade da enzima LwCas13a em comparação com a reação <i>two-step</i> RT-PCR em tempo real.	41
1.3.12 Ensaio de detecção LwCas13a utilizando amostras clínicas.....	42
1.4 RESULTADOS	42
1.4.1 Obtenção da proteína recombinante LwCas13a	42
1.4.2 Obtenção da região alvo para detecção e produção do crRNA	44
1.4.3 Produção do ssRNA alvo RSVA e RSVB.....	45
1.4.4 Teste de atividade proteína recombinante Cas13a.....	47
1.4.5 Comparação entre o ensaio de RT-PCR em tempo real e detecção utilizando a enzima LwCas13a.	48
1.4.6 Sensibilidade do ensaio de detecção LwCas13a em amostras de aspirado de nasofaringe.	49
1.5 DISCUSSÃO.....	51
1.6 CONCLUSÕES	53
1.7 REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 2.....	63
2.1 INTRODUÇÃO.....	64
2.2 OBJETIVO	70
2.3 MATERIAIS E METODOS	71
2.3.1 Amostragem.....	71

2.3.2	Padronização do teste de ELISA qualitativo no soro humano utilizando o antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 (Fapon Biotech Inc., Dongguan, China), que corresponde a nucleoproteína viral, para detecção de anticorpos das classes IgM, IgA e IgG.	74
2.3.3	Determinação da Sensibilidade e Especificidade do Teste de ELISA utilizando antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 (Fapon Biotech Inc., Dongguan, China) em soro humano para detecção de anticorpos IgM, IgA e IgG contra SARS-CoV-2.	76
2.3.4	Ensaio de Repetibilidade e Reprodutibilidade Intraensaio do teste de ELISA	76
2.3.5	Padronização ELISA utilizando sangue seco coletado em papel filtro contra o antígeno recombinante XYZ para detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2.....	77
2.3.6	Diagnóstico clínico e triagem de pacientes utilizando o método de ELISA indireto contra o antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 para detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA.....	77
2.4	RESULTADOS	78
2.4.1	Resultado Padronização das condições do ELISA antinucleoproteína (nCoV-PS-Ag7) para detecção dos anticorpos da classe IgM, IgA e IgG.	78
2.4.2	Resultados de sensibilidade, especificidade e ponto de corte (<i>cut off</i>) para o teste de ELISA indireto contra SARS-CoV-2 no soro utilizando o antígeno.....	80
2.4.3	Resultado ensaio de reprodutibilidade e repetibilidade	82
2.4.4	Padronização ELISA utilizando sangue seco coletado em papel filtro contra o antígeno recombinante XYZ para detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2.....	88
2.5	DISCUSSÃO.....	89
2.6	CONCLUSSÕES	91
2.7	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE.....	96

1 INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho foi realizado sob orientação do Professor Dr. Edison Luiz Durigon, no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM), com apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). O trabalho será apresentado em dois capítulos. O primeiro é destinado ao tema proposto ao programa de pós-graduação em 2019. O capítulo 2 abordará os trabalhos realizados entre 2020 e 2021, período da pandemia de SARS-CoV-2 no qual o LVCM interrompeu suas atividades e todo o grupo se dedicou apenas ao estudo e diagnóstico do vírus emergente. O título da dissertação não engloba o capítulo 2, pois foi mantido o projeto original financiado pela FAPESP.

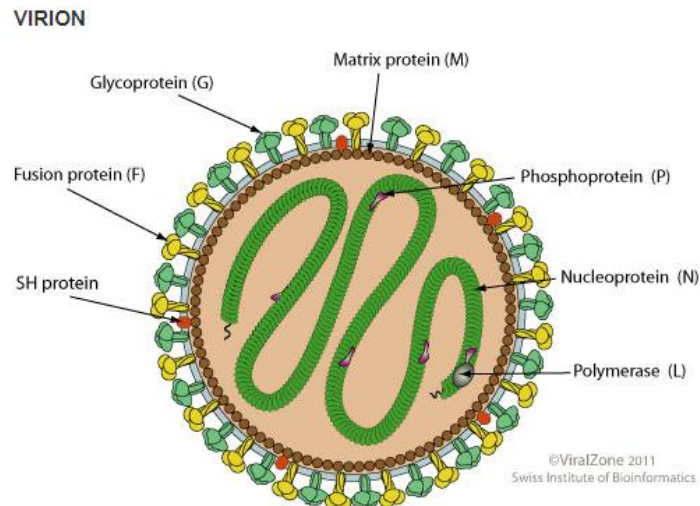
CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Segundo o programa de estratégia e vigilância para o Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV - Human Respiratory Syncytial Virus) da OMS de 2019, o número de casos de infecção respiratória do trato inferior associados ao RSV chega a 33 milhões anualmente o que resulta em 59.600 mortes de crianças menores de 5 anos, e 27.300 mortes de crianças menores de 6 meses de vida¹. Cinquenta a 70% das infecções infantis ocorrem nos primeiros anos de vida e estão relacionadas com asma e doenças respiratórias crônicas em vida adulta ². Estudos mais recentes têm apontado sua contribuição para a morbidade e mortalidade em idosos e pessoas imunocomprometidas, tais como transplantados e pacientes HIV positivos ³, sustentando o slogan “*An Illness for All Ages*” (Uma doença para todas as idades), na tentativa de chamar a atenção para ampliação de medidas preventivas, tratamentos e diagnóstico contra o RSV também para adultos ⁴.

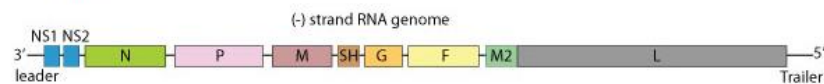
O vírus com a característica de fazer aglomerados celulares multinucleados denominados sincícios foi descoberto pelo médico e virologista Robert Chanock que o identificou em amostras humanas em 1956 ⁵. Um ano antes o RSV já havia sido isolado em chimpanzés com doença respiratória ⁶. O RSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e é classificado dentro do gênero *Orthopneumovirus* ^{7,8}. Em 2016 o vírus foi renomeado para Orthopneumovirus Humano pelo *Comitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Seu genoma é constituído por uma molécula de (-) ssRNA (RNA de fita simples polaridade negativa), tipo V da classificação de Baltimore, não possui segmentação e codifica 11 proteínas ⁹. O envelope do RSV é formado por 3 glicoproteínas de superfície: a proteína hidrofóbica SH, que confere alterações na permeabilidade das células¹⁰, a proteína G, responsável pelo ataque e ligação ao receptor celular ¹¹ e a proteína de fusão viral F ¹². Na face interna do envelope encontra-se a proteína de matriz M, importante para a estruturação de novas partículas virais ¹³. Também compõem o genoma, quatro proteínas do ribonucleocapsídeo (N, P, L e M2-1), uma proteína regulatória M2-2 e duas proteínas não estruturais, NS1 e NS2 ⁸. Ambas as proteínas, G e F são de extrema importância para compreensão do vírus, por estarem relacionadas a resposta imunológica, classificação de genótipos e alvos de antivirais e testes diagnósticos ^{11,12}

Figura 1- Representação esquemática da partícula viral do RSV. Figura retirado do Portal de Pesquisa Bioinformática ViralZone.



Enveloped, spherical. Diameter from about 150nm nm.

GENOME



Negative-stranded RNA linear genome, about 15 kb in size. Encodes for 11 proteins.

Fonte: <https://viralzone.expasy.org/90>

Dividido em 2 grupos com base na genotipagem da proteína G (RSVA e RSVB)¹⁴ o RSV apresenta variabilidade antigênica que lhe confere a capacidade de infectar indivíduos já expostos numa população¹⁵, além disso a resposta imune produzida parece não conferir proteção duradoura, sendo comum casos de reinfecção^{15,17}. A proteína G é produzida como um precursor de 300 aminoácidos, aproximadamente, que sofre intensa glicosilação na porção N-terminal, resultando em uma glicoproteína de tamanho entre 80 e 90 kDa^{13,18}. Três epítomos foram bem descritos com base em anticorpos murinos¹⁹. O primeiro, conserva 13 aminoácidos na região central não glicosilada e está presente em ambos os grupos. O segundo, compartilha parte da região central, mas apresenta já algumas variações e está presente em apenas cepas de um mesmo grupo antigênico. O terceiro e último compreende uma região hiper variável na porção C-terminal e está presente apenas em cepas de determinados grupos genotípicos^{18,20}.

No grupo A são descritos 11 genótipos (GA1-GA7, NA1, NA2, SAA1 e ON1) e no grupo B 23 genótipos (GB1-GB4, SAB1-SAB4, URU1, URU2, BA1-BA12 e THB)

²¹. Diferentes genótipos podem circular ao mesmo tempo durante uma epidemia e a predominância entre um e outro varia ao longo dos anos e da localidade ^{22,23,24}. O RSV apresenta distribuição uniforme no mundo todo e a sua sazonalidade parece apresentar um padrão exclusivo para cada localidade no globo ²⁵. No Brasil a sua circulação ocorre entre maio e setembro podendo variar para cada região ²⁶. Já foram identificados os genótipos NA1, NA2, NA3, ON1, GA1, GA2, GA5, GA7, SAA3, SAA1 GB3, SAB3, BA3 e BA4 circulando no país ^{27,28,29,30,31}.

A proteína F apresenta domínios mais conservados do que a proteína G, compartilhando regiões com outros vírus da família *Pneumoviridae* e *Paramyxoviridae* ^{32,33}. Sintetizada na forma de um precursor inativo F0, resulta em um heterodímero com duas subunidades, F1 e F2, ligadas por duas ligações dissulfeto após uma clivagem ^{12,34}. Ambas as subunidades são exploradas como candidatos a vacina por compartilharem sítios antigênicos, inclusive um deles é o alvo do anticorpo monoclonal terapêutico Palivizumab (PZ; Synagis®, MedImmune Inc., Gaithersburg, MD), licenciado em 2008 ³⁵. Este medicamento teve seu protocolo de uso aprovado pelo Ministério da Saúde em maio de 2013 para uso preventivo em crianças menores de 1 ano de idade que nasceram prematuras e como medida terapêutica para crianças com até 2 anos de idade com doença pulmonar crônica ³⁶. A efetividade da sua administração tem sido demonstrada ^{37,38}, no entanto é um medicamento de alto custo que inviabiliza o seu uso como medida profilática em outros países subdesenvolvidos ³⁹. Além disso, alguns trabalhos já encontraram cepas altamente resistentes ao Palivizumab ^{40,41}. No início de 2018 foi anunciado o começo dos ensaios de fase clínica de uma nova droga contra o RSV. A droga RV521, um inibidor da fusão viral, mostrou-se segura durante os ensaios pré-clínicos e foi capaz de reduzir a carga viral e os sintomas em comparação com o placebo ⁴².

Anne M. Hause et al demonstraram que a variabilidade que a sequência do gene da proteína F sofreu nos últimos 50 anos impactou de forma significativa o desenvolvimento de vacinas ⁴³, além disso é um enorme desafio obter uma vacina que confere imunidade protetora e que seja segura para gestantes e crianças menores de 2 anos de vida. No primeiro semestre de 2023 pela primeira vez na história duas vacinas foram aprovadas pela agência regulatória dos EUA (FDA) em pessoas com mais de 60 anos.

A transmissão do RSV se dá pelo contato direto de material contaminado com a mucosa dos olhos, da boca, do nariz e através de gotículas de tosse e espirro ^{1,8}. As partículas virais permanecem por mais tempo viáveis em meio abiótico do que na superfície das mãos, o que torna sua dispersão altamente eficiente. Pessoas de qualquer idade podem ser infectadas, embora, a infecção em crianças menores de 2 anos é muito mais severa ⁴⁴. Foi demonstrado que em crianças prematuras com Doença Pulmonar Crônica (DPCP), a susceptibilidade de se desenvolver infecção pelo RSV é mais alta, chegando a atingir 17% a taxa de internação hospitalar neste grupo ⁴⁵. Os sintomas clínicos incluem tosse, febre, cefaléia, rinorreia e faringite, podendo evoluir para casos de bronquite aguda e pneumonia ⁴⁶. A hospitalização de crianças menores de 6 meses de vida para suplementação de oxigênio ou ventilação mecânica devido a falha do sistema respiratório provocada pela infecção é comum, atingindo 30% das crianças infectadas em países desenvolvidos⁴⁷.

Esse painel de sintomas apresenta enorme similaridade com os sintomas de diversas outras doenças respiratórias sendo praticamente impossível a sua distinção de outros vírus respiratórios circulantes, tais como Influenza e Rinovírus ⁴⁸. Tendo em vista esse cenário, os métodos de diagnóstico laboratoriais são de extrema importância, pois podem impedir a disseminação do vírus em ambientes hospitalares. Já foi demonstrado que medidas de isolamento de pacientes infectados são altamente eficientes, além disso, um diagnóstico preciso pode impedir a administração desnecessária de antibióticos e melhorar o tempo de resposta para o paciente ⁴⁹. Os métodos laboratoriais de diagnóstico incluem imunofluorescência direta, cultivo celular, ensaios imunoenzimáticos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), imunocromatográficos como RADT e moleculares como RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) ⁵⁰.

Durante anos a cultura celular foi o método *gold standard* para o diagnóstico de RSV, mas com a implementação da técnica de PCR rapidamente foi substituída devido à alta sensibilidade, especificidade e menor tempo para se obter um resultado ⁵⁰. No entanto, a técnica de PCR, principalmente o PCR em tempo real, ainda é cara e exige uma instalação especializada para sua execução dos quais a maioria dos laboratórios e hospitais brasileiros não dispõem. O mesmo acontece com a imunofluorescência, que além de necessitar de microscópio de fluorescência, apresenta menor sensibilidade do que o PCR em tempo real e depende da interpretação visual de um operador.

Os testes imunoenzimáticos por outro lado, apresentam uma maior simplicidade de execução quando comparados às técnicas descritas até o momento, mas são passíveis de alta variabilidade de resultados. Além disso, os melhores testes disponíveis apresentaram sensibilidade entre 69% e 88%, quando comparados com o PCR em tempo real ^{52, 53}. Dessa forma, essas técnicas acabam ficando restritas a grandes centros hospitalares e laboratórios privados ⁵¹.

Atualmente existem diversos testes rápidos (RADT) disponíveis comercialmente. Esses testes apresentam baixa complexidade, pois não exigem equipamentos auxiliares, fornecem o resultado em até 20 minutos e atuam como um rápido método de triagem ⁵⁰. No entanto, o estudo de Chartrand et al de 2015 de meta-análise mostrou que a sensibilidade dos testes contra RSV cai drasticamente com o aumento da idade do paciente, apresentando sensibilidade de 81% em crianças contra 29% em adultos, além de identificar problemas de reprodutibilidade, o trabalho também detectou a superestimação dos valores de sensibilidade em estudos patrocinados por empresas. Esses dados suscitam diversos questionamentos sobre esses métodos diagnósticos, desde sua vantagem de utilização em adultos até qual a confiabilidade de seus resultados ⁵⁴.

São diversas as técnicas de diagnóstico molecular sendo desenvolvidas e outras já disponíveis no mercado, principalmente em países desenvolvidos. Inclui-se nesse cenário tecnologias baseadas em PCR em tempo real, mas extremamente automatizadas como o *bioMérieux BioFire FilmArray*, um multiplex para 18 vírus respiratórios, incluindo RSV, e 4 espécies bacterianas que libera o resultado em até 45 minutos ⁵⁵. Outros testes, envolvem técnicas de amplificação isothermal, como o *Alere iRSV test*, baseado na tecnologia NEAR (*Nicking Enzyme Amplification Reaction*) ⁵⁶ e o RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*), que em poucos minutos fornece um resultado com alta sensibilidade. A velocidade com que essas técnicas evoluem é impressionante e infelizmente demoram muito para chegar no Brasil e em outros países subdesenvolvidos, no entanto, quem tem protagonizado o cenário de novidades na área de diagnóstico molecular é a técnica CRISPR-Cas que tem seu conceito já bastante difundido no meio acadêmico-científica brasileiro.

A técnica de edição de genes chamada CRISPR-Cas que segundo alguns autores irá revolucionar o modo como se faz ciência na área médica e biológica assim como aconteceu com a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)⁶⁶, trouxe grandes perspectivas para o campo de diagnóstico molecular de doenças infecciosas.

Dois artigos publicados na revista *Science* em fevereiro de 2018 apresentaram de forma promissora a aplicabilidade da técnica para o diagnóstico de vírus como Zika, Dengue e HPV. O primeiro descreve o trabalho do grupo da pesquisadora norte americana Jennifer Doudna da Universidade da Califórnia. O grupo desenvolveu um sistema chamado DETECTOR (*Detection Method Termed DNA endonuclease-targeted CRISPR Trans Reporter*) que utiliza o sistema CRISPR associado a proteína Cas12a. Esse sistema foi capaz de detectar com 100% de precisão o vírus HPV16 em células humanas infectadas e com 92% de precisão o vírus HPV18 ⁵⁷. Segundo o estudo, a detecção foi possível graças à capacidade da proteína Cas12a da bactéria do gênero *Lachnospiraceae* de clivar de forma inespecífica moléculas de DNA simples fita após clivar de forma específica moléculas alvo de DNA dupla fita. O sistema atua por meio de uma sequência guia de RNA complementar a uma sequência de 20 nucleotídeo do genoma viral dos dois tipos de HPV associada a proteína Cas12a. Como detector o grupo utilizou sequências de DNA simples fita conjugados com fluoróforos.

O segundo trabalho do grupo do pesquisador Feng Zhang, descreveu o sistema SHERLOCK do inglês *Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking* já descrito um ano antes, mas agora utilizado como um multiplex. O sistema foi capaz de detectar com alta sensibilidade numa mesma amostra o vírus Zika, utilizando a proteína Cas13a de *Leptotrichia wadeii*, o vírus da Dengue, utilizando a proteína Cas13b de *Capnocytophaga canimorsu* e sequências de DNA dupla fita, utilizando a Cas12a de *Acidaminococcus sp.* Também foi comprovada a atividade de clivagem colateral para essas proteínas, ou seja, a sua ativação induz um estado de clivagem aleatório. Além da detecção por sequências conjugadas com fluoróforos, como o DETECTOR, o trabalho também apresentou uma alternativa de detecção que utiliza o método *lateral flow*, que consiste em impregnar numa membrana de nitrocelulose anticorpos marcados capazes de visualmente comunicar um resultado positivo ou negativo em poucos minutos. Ambas as técnicas fornecem ferramentas para detecção de vírus e outros patógenos com alta sensibilidade e especificidade, com pouca manipulação das amostras, à baixo custo e de forma rápida ^{58, 59}.

O sistema CRISPR do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas) foi identificado primeiramente em 1987 pelo grupo do pesquisador japonês Yoshizumi Ishino em bactérias *Escherichia coli* ⁶⁰. Nesse primeiro momento

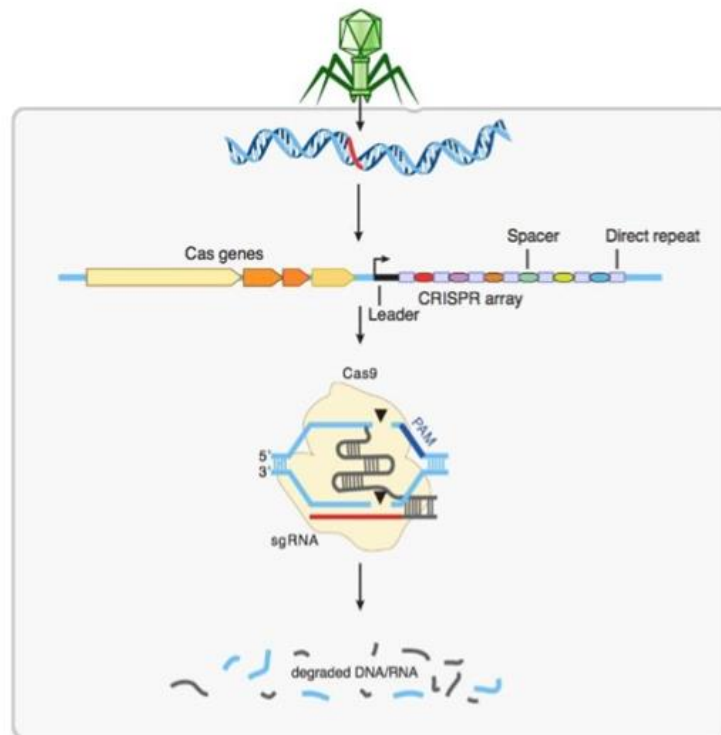
apenas o *locus*, ou seja, uma região no genoma com sequências repetidas e espaçadas foi descrito. Em 1993 algumas funções começaram a ser atribuídas e em 2002 o sistema ganhou esse nome ⁶¹. Apenas em 2005 o sistema CRISPR foi descrito como um tipo de sistema imune adaptativo de procaríotos, sendo identificado em vários gêneros de bactérias e em arqueas ⁶². Marakova et al propuseram com base na análise filogenética da polimerase do sistema CRISPR-Cas que primeiramente o sistema tenha surgido em arqueas termófilas e foi então posteriormente adquirido pelas bactérias por transferência horizontal ^{63,64}.

O *locus* CRISPR é composto por sequências repetidas intercaladas por espaçadores. Esses espaçadores são pequenas sequências extracromossômicas que originam RNAs complementares ao genoma dos patógenos, como vírus e ou elementos genéticos móveis invasores ^{65,66}. Associado ao *locus* CRISPR encontra-se o gene *Cas* (*CRISPR associated*) que codifica nucleases, polimerases e helicases que são elementos centrais no funcionamento do *locus*. Essa maquinaria permite a clivagem de um alvo de DNA ou RNA quando guiadas. Dessa forma bactérias e arqueas são capazes de armazenar no *locus* CRISPR sequências de DNA invasores e, ao serem infectadas por uma segunda vez conseguem destruir o agente infeccioso. De forma simplificada o sistema pode ser descrito na natureza em três etapas. A primeira é chamada de adaptativa e é marcada pela atuação das enzimas Cas1 e Cas2 que clivam o material genético exógeno em pequenos segmentos e os inserem no *locus* CRISPR ⁶⁴. Na segunda fase, etapa efetora, ocorre a transcrição do *locus* inteiro, originando vários RNAs (*crRNA- CRISPR-derived RNA*) que se complexam com a nuclease *Cas* e atuam especificando o sítio de clivagem dentro do genoma invasor. Essa etapa não pode variar pois, alguns sistemas necessitam de um RNA chamado de *tracrRNA (trans activating crRNA)* que pareiam com os *crRNA* e então guiam as proteínas *Cas* ⁶⁷. No terceiro momento, os *crRNAs* maduros junto com as proteínas *Cas* formam complexos que reconhecem a sequência genética invasora e a destroem. Com base nesse mecanismo foi desenvolvido a técnica de CRISPR que envolve basicamente três moléculas: uma nuclease (a proteína *Cas* de interesse), um RNA guia (*crRNA*), e um alvo, que pode ser uma molécula de DNA ou RNA ^{65,66,67}.

Hoje o sistema CRISPR é dividido em duas classes, cinco tipos e 16 subtipos, determinadas pela conservação das sequências das proteínas *Cas* e organização do genoma no *locus* ⁶⁸. Essa divisão evidencia uma enorme variedade de características efetoras do sistema e é também o resultado da intensa pesquisa na área que cresceu

vertiginosamente a partir de 2012, consequência da publicação de um trabalho do grupo coordenado pela pesquisadora Jennifer A. Doudna que lançou as bases e evidenciou o potencial da técnica ⁶⁵. Esse feito rendeu a Jennifer A. Doudna e Emmanuelle Charpentier o prêmio Nobel de química de 2020, sendo a primeira vez que duas mulheres dividem um Nobel na história da premiação.

Figura 2- Esquema simplificado do funcionamento do sistema CRISPR-CAS9 em célula procariótica.



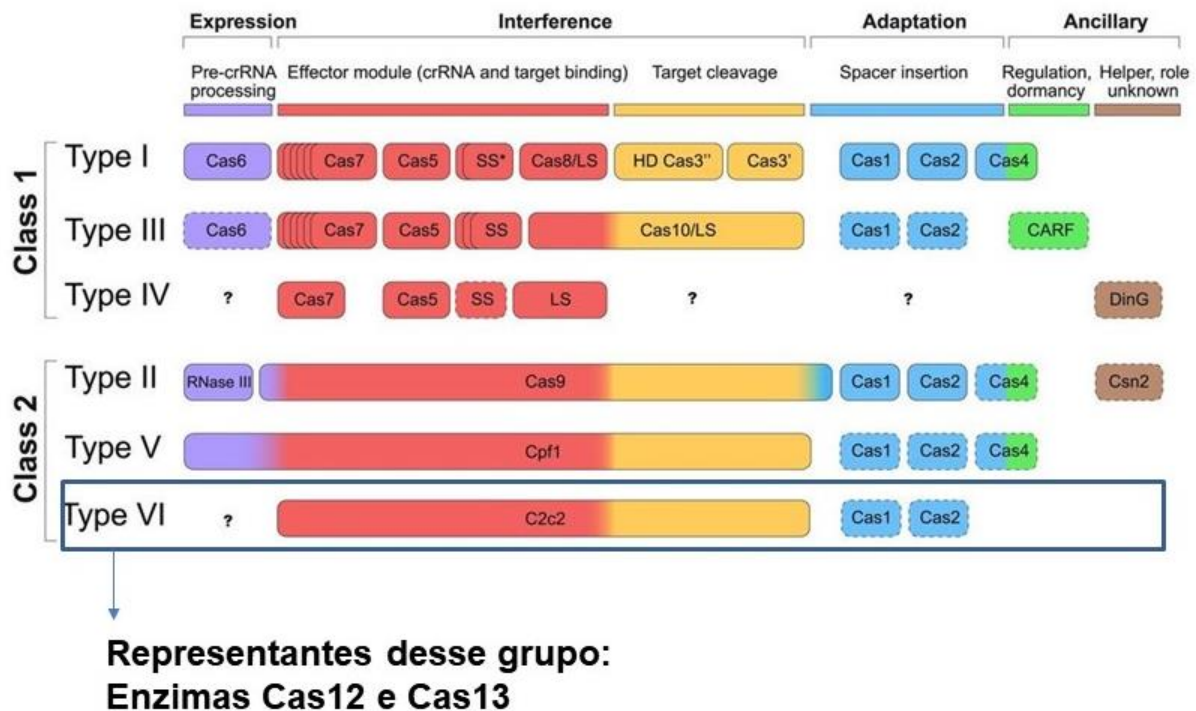
Fonte: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745249/>

O sistema CRISPR-Cas de classe 1 inclui os tipos I, III e IV que são os sistemas que apresentam múltiplas subunidades efetoras, e a classe 2, os tipos II, V e VI, que apresentam uma única unidade efetora ^{67,68}. É no sistema de classe 2, tipo II, que se encontra a proteína efetora Cas9, usada amplamente para edição de sequência nucleotídicas, nocauteamento, deleção gênica e inserção de genes. A mais utilizada é a Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que apresenta um domínio de reconhecimento chamado REC e um domínio com atividade nucleásica chamado NUC, neste último estão presentes dois sítios catalíticos RuvC e HNH que clivam a fita de DNA não complementar e complementar, respectivamente ⁶⁵. Além disso, o sítio NUC também

contém o domínio de interação com a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*)^{66,69}. A sequência PAM é a região na molécula alvo adjacente ao sítio de clivagem⁷⁰.

A partir do ano de 2015 Shmakov et al começaram a buscar por proteínas Cas de classe II baseando-se em sequências conservadas da proteína Cas9 e da família de proteínas Cpf1, que diferentemente da Cas9 só apresentam o domínio catalítico RuvC. O resultado dessa busca, baseada em metagenômica, foi de 53 achados que foram classificados em 3 grupo de proteínas: C2c1, C2c2 e C2c3⁷¹.

Figura 3- Divisão do sistema CRISPR-CAS e seus tipos. No sistema de classe 2 estão representados os grupos de enzimas mais conhecidas de cada tipo. Como exemplo, no tipo II a proteína Cas9, no tipo V a família Cpf1 e no tipo VI a família C2c2



As proteínas dos grupos C2c1 e C2c3, incluídas no tipo V do sistema classe 2, assemelham-se com as Cpf1 por apresentarem um domínio do tipo RuvC de clivagem e por terem como alvo moléculas de DNA, mas diferem dessas pois precisam de um tracrRNA para seu funcionamento⁶⁷. As proteínas do grupo C2c2, tipo VI, não necessitam de um tracrRNA, o grupo observou que o próprio crRNA apresenta uma

estrutura secundária em loop, denominada DR (*Direct Repeat*), que funciona como identificador das proteínas Cas desse grupo. Cada Cas13 exige uma sequência identificadora diferente. Em 2016 Abudayyeh et al mostraram o funcionamento das proteínas Cas13 do grupo C2c2 como RNAses guiadas por RNA, podendo ser programadas para clivar um alvo de RNA fita simples. A análise bioquímica mostrou que essas proteínas apresentam dois domínios HEPN (*Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding*), que são domínios caracterizados funcionalmente com atividade de ribonuclease⁷¹. Além disso, foi demonstrado também a atividade colateral em células bacterianas, ou seja, as proteínas Cas13 iniciam um modo de clivagem aleatória quando são ativadas ao se ligarem em sua molécula alvo. É importante ressaltar que, tal efeito não ocorre com a proteína Cas9, o que permite sua utilização na área de terapia gênica. Vale ressaltar que assim como no sistema de tipo II, as enzimas Cas13 apresentam uma região adjacente ao sítio de clivagem de extrema importância para seu funcionamento, denominada para essa classe de PFS (*Protospacer Flanking Site*) que é composta apenas por um único nucleotídeo. A predileção pelo nucleotídeo nessa posição varia com o gênero e a espécie de Cas13, sabe-se, por exemplo, que para *Leptotrichia wadeii* uma citosina adjacente ao último nucleotídeo na molécula alvo é crucial para sua eficiência. Outra característica das proteínas Cas13 exploradas pelo grupo foi a predileção por dinucleotídeos durante o modo de clivagem colateral. Esse achado permitiu a diferenciação dos alvos no ensaio multiplex utilizando diferentes sequências específicas de RNA repórteres marcados com fluoróforos diferentes ^{58,59}. A combinação dessas características tornou a ferramenta extremamente aplicável como demonstraram as técnicas SHERLOCK e DETECTOR. Além disso, diferentemente dos diagnósticos moleculares existentes, uma plataforma baseada em CRISPR-Cas, como o SHERLOCK, pode ser adaptável para gerar resultados que dispensam o uso de aparelhos e instalações especializadas, isso porque qualquer técnica de amplificação pode ser aplicada para aumentar a sensibilidade da detecção. As opções vão desde PCR até técnicas de amplificação isotermal, como LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*)⁷², SDA (*Strand Displacement Amplification*)⁷³ e RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*). Gootenberg et al (2018) utilizaram o RT-RPA para amplificar os alvos de RNA e incluíram nas sequências um sítio promotor para a polimerase do fago T7⁷⁴, possibilitando dessa forma a transcrição do alvo em RNA e a detecção pelas Cas em uma única reação ⁵⁹.

O RPA é uma técnica de amplificação isothermal que consiste em três essenciais enzimas: proteína ligadora de simples fita de DNA (SSBs - single-stranded DNA-binding proteins) ⁷⁵, uma recombinase e uma polimerase de descolamento de fita de DNA originária de *Bacillus subtilis*. A técnica não exige regulação de temperatura pois as proteínas atuam a temperatura de 37°C, possibilitando o seu uso em regiões com baixo aporte técnico. Em 2015 O RPA foi utilizado na epidemia do vírus Ebola na Guiné ⁷⁶.

Desde sua primeira descrição se passaram quase 30 anos e um enorme esforço científico para se entender os tipos de sistema e o papel das proteínas Cas envolvidas. Hoje trabalhos vêm demonstrando a aplicabilidade da técnica CRISPR-Cas e sua promissora implementação em diversas áreas, como Yin et al que em 2017 conseguiram eliminar fragmentos virais em camundongos infectados com o HIV- 1 utilizando a proteína Cas9. Esse trabalho trouxe um resultado esperançoso para o uso da técnica como tratamento ⁷⁷. Diante disso, fica evidente a importância do estudo com as proteínas Cas e da ampla divulgação dos seus resultados, que estão fornecendo um leque de possibilidades de aplicação. Tendo isso em vista, esse trabalho tem por objetivo utilizar a proteína Cas13a como detectora do Vírus Respiratório Sincicial Humano.

1.2 OBJETIVO

Obter uma forma recombinante da enzima Cas13a de *Leptotrichia Wadeii* e utilizar para detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (RSV) em amostras clínicas humanas.

1.2.1 Objetivos Específicos

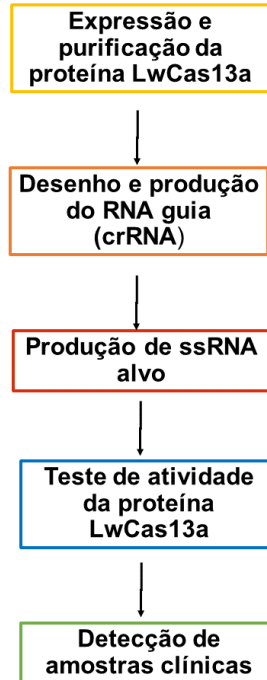
- Expressar e purificar a proteína LwCas13a
- Selecionar e produzir o RNA guia (crRNA) de regiões selecionadas do gene *M* viral.
- Utilizar a proteína para detecção do Vírus Respiratório Sincicial Humano (RSV) em amostras de aspirado de nasofaringe de crianças com doença respiratória aguda.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Amostragem

As amostras utilizadas neste trabalho fazem parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética CAE 64116722.1.0000.5467. Foram selecionadas amostras de aspirado de nasofaringe de crianças com idade inferior a seis anos que apresentaram infecção respiratória aguda (IRA) e foram atendidas no ambulatório do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular para pesquisa de vírus respiratório através da técnica de RT-PCR em tempo real, segundo o painel viral do CDC (Center of Control Disease)⁷⁸. Foram selecionadas 75 amostras positivas para RSV, 8 amostras positivas para Adenovírus, 8 amostras positivas para Rinovírus, 6 amostras positivas para coronavírus sazonal e 10 amostras positivas para SARS-CoV-2 do ano de 2021.

1.3.3 Fluxograma

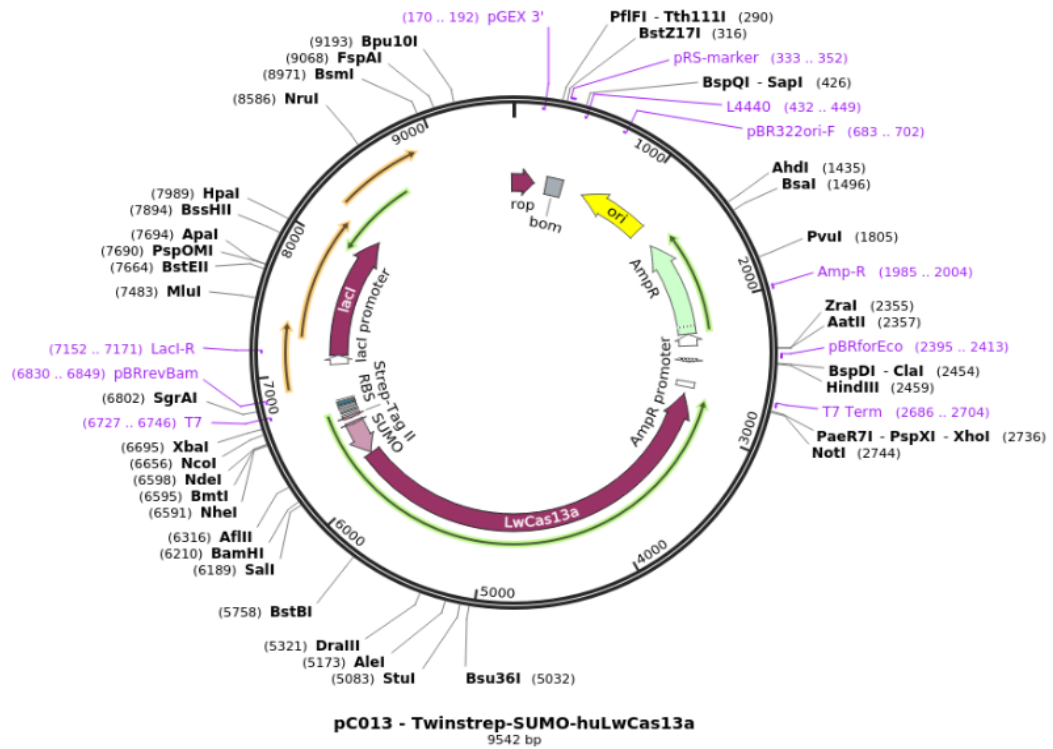


1.3.4 Teste de expressão da proteína recombinante LwCas13a

O plasmídeo PC013- LwCas13a, adquirido do repositório Addgene foi utilizado para a expressão da proteína Cas13a sob comando do promotor T7, com resistência a ampicilina e cauda de histidina N-terminal para purificação, como descrito por Gootenberg et al 2018. Células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) foram transformadas por eletroporação com 1µg de plasmídeo. Um clone foi selecionado para o ensaio de expressão. Para o teste as células crescerem overnight em meio LB com ampicilina. Este pré inóculo foi utilizado na diluição 1:100 em meio Terrific Broth (TB) (Sigma®) [12g/L triptona, 24g/L de extrato de levedura, 9,4g/L de K₂HPO₄, 2,2g/L de KH₂PO₄] e foram mantidas a 37°C sob agitação de 220rpm até a cultura atingir uma densidade ótica de 0.6nm. A expressão proteica foi induzida por suplementação com isopropiltiogalactosídeo (IPTG) (Sigma®) na concentração final de 500µM. Foram testadas duas temperaturas diferentes de indução: 15°C e 18°C por um período fixo de 16h. Amostras da cultura celular foram coletadas antes e após a indução para

análise da expressão proteica. As amostras recolhidas foram centrifugadas a 8000 x g por 1 minuto e sobrenadante descartado. Quantidades semelhantes de extrato foram misturados com tampão de amostra [200mM Tris-HCL pH 8; 8% SDS; 40% Glicerol; 0,4% azul de bromofenol; 200mM 2- β -mercaptoetanol], incubados a 100°C por 10 minutos e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e Western Blot.

Figura 4- Mapa do vetor PC013-LwCas13a utilizado para expressão da proteína recombinante.



Fonte: <https://www.addgene.org/79152/>

1.3.5 Purificação da proteína recombinante LwCas13a

O processo de purificação partiu de uma cultura celular de 2L induzida por 16h a temperatura de 15°C/180rpm. Após o término da indução (500µM de IPTG) as células foram sedimentadas por centrifugação e o pellet foi ressuscitado em tampão de lise [20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.0] suplementado com inibidor de protease e DNase. As células foram lisadas por sonicação nas seguintes condições: 10s ON 40s OFF por 1h, numa amplitude de 40%. (Sonifier 450, Branson, Danbury, CT). O material foi centrifugado à 15.000rpm/4°C por 1h e posteriormente filtrado para submissão à cromatografia de afinidade ao níquel utilizando a resina Ni Sepharose® High Performance (Merck USA®). Cada 50mL de material foi incubado com 1 mL de resina por 2h à 4°C sob agitação. A amostra foi passada por gravidade e a proteína foi eluída em tampão de eluição [20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.0] com 500mM de Imidazol. As frações contendo a proteína de interesse foram coletadas, agrupadas e concentradas em Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

Em seguida foi realizado uma cromatografia de gel filtração utilizando a coluna Superdex® 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences no cromatógrafo AKTA FLPC STAR. A coluna foi primeiramente equilibrada com 5 VC de tampão de eluição [20mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1mM DTT, Ph 8.0] a 0,5 mL/min. A proteína foi eluída com 1 VC e as frações contendo proteína foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 10%. As frações contendo a proteína foram agrupadas, concentradas utilizando Ultra-15 Centrifugal Filter Unit e quantificadas pelo método de Bradford, seguindo as instruções do fabricante.

1.3.6 Análise por Western Blot

A purificação foi confirmada pela técnica de *Western Blot*, como descrito por Towbin et al., (1979). Para isso, 5µg da proteína foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Milipore®) em tampão de transferência [48mM Tris, 39mM de glicina, 0,02% de metanol]. O bloqueio da membrana foi realizado com leite desnatado 5% e BSA 1% em PBS-T 0,05% over night à 4°C. Como primeiro anticorpo foi utilizado anticorpo comercial anti-His (Sigma®), e um secundário anti-camundongo conjugado com a enzima peroxidase (Sigma®).

1.3.7 Seleção da região alvo para detecção e produção do RNA guia (crRNA)

A seleção do alvo para detecção foi realizada através do alinhamento de 72 sequências de genoma inteiro do RSV obtidas do *GenBank* utilizando o Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) por meio do algoritmo *Muscle*. Para certificação de que a sequência escolhida seria um bom candidato, utilizamos também a ferramenta disponível online de predileção de alvos CRISPR-RT (CRISPR RNA Targeting Prediction and Visualization). (Figura 6)

O RNA guia (crRNA) molécula composta pela sequência de 28 nucleotídeos mais a DR (Direct Repeat) da enzima Cas13a de *Leptotrichia wadeii* foi adquirida como uma sequência única de RNA sintético através da Integrated DNA Technologies (San Diego, EUA®). Também foi adquirida a sequência de RNA repórter, marcada com a molécula FAM na extremidade 5' e um quencher na extremidade 3'. A tabela 1 apresenta as sequências adquiridas.

Figura 5- Esquema da organização do genoma do RSV. Destaque para o gene *M* B) Esquema da interação entre a região alvo (*protospacer*) com o crRNA selecionado pela ferramenta CRISPR-RT.

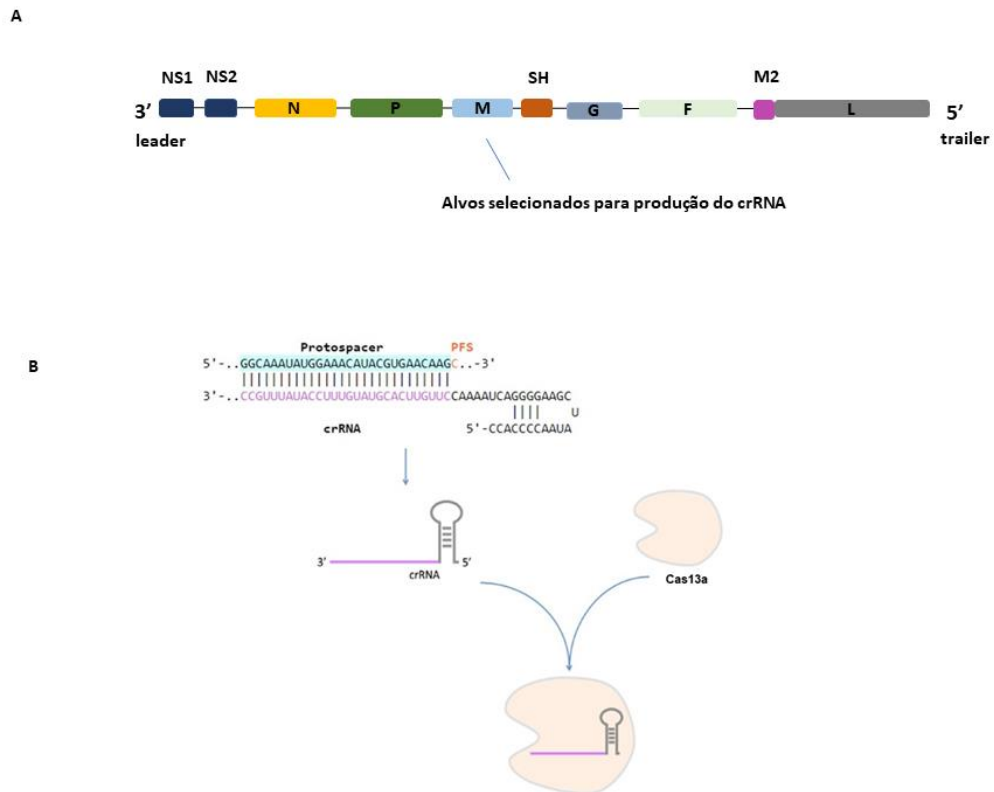


Tabela 1- Sequencias sintéticas completas do RNA guia (crRNA) e do RNA repórter

Nome sequencia	Sequência 5'-3'	Marcação
RNA guia (crRNA)	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGA AGGGGACUAAAACUUUUAUU CACGUAUGUUUCCAUAUUUGCC	Não
RNA repórter	FAM/rUrUrUrUrU/3IABkFQ	FAM

1.3.8 Crescimento viral e extração de RNA.

Dois isolados virais de RSV (HU10542 e HU10455, grupo A e B respectivamente) foram propagados em células da linhagem HEp2 (ATCC) cultivadas em meio DMEN 10% Soro Fetal Bovino (Atena, Biotecnologia®), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma®) e 1% de piruvato de sódio (Sigma®). A infecção foi realizada primeiramente em garrafas de cultivo de 25cm² a partir de um inoculo viral de 100µL da passagem 1. O efeito citopático foi diariamente acompanhado e 5 dias após a inoculação o conteúdo foi coletado, centrifugado e armazenado a temperatura de -80°C para posterior produção de estoque de trabalho na passagem 3, repetindo o mesmo procedimento de inoculação. Para a extração de RNA viral, 200µL de cultura celular infectadas foram extraídas pelo método automatizado Nuclisens EasyMag (BioMerieux®, Lyon, França) como descrito pelo fabricante.

1.3.9 Produção do ssRNA alvo RSVA e RSVB

Produção do cDNA RSVA e RSVB

A partir do RNA viral extraído foi produzido cDNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. Para a reação foram utilizados 10µL de RNA extraído em um mix de reação [10x RT Buffer, 10x RT Randon primers, 100mM dNTP, 200U/µL de inibidor de RNase, 500U/µL Transcriptase Reverse Multiscribe]. As condições de ciclagem em termociclador foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

Amplificação do cDNA por PCR convencional

Para amplificação do cDNA foram utilizados os primers descritos por Kodani et al, com uma inserção da sequência promotora da enzima T7 no primer Forward (tabela 2). Foi utilizado o kit de enzima Taq Platinum (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A reação consistiu em 5µL de cDNA e 10µM de cada primer em um mix de reação [2.5mM dNTP, 12,5mM MgCl₂, 10x Taq Buffer]. As condições de ciclagem em termociclador foram: 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 30 segundos a

94°C, 45 segundos a 52°C e 60 segundos a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE [40mM Tris-Acetado, 1Mm EDTA, pH 8,5] corado com brometo de etídio.

Tabela 2- Sequencias de primers utilizados para amplificação do gene *M*.

Oligonucleotídeos	Iniciadores	Sequência 5'- 3'
RSV gene <i>M</i>	Primer Forward Kodani, 2014 modificado	TAATACGACTCACTATAGGG GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA
	Primer Reserve Kodani, 2014	TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G

*Sequência destacada se refere ao promotor T7

Transcrição reversa do DNA viral amplificado

O produto da PCR descrita no tópico anterior foi transcrito em ssRNA utilizando o kit HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis, NEB como descrito pelo fabricante. Para a reação foi utilizado 1µg de DNA em mix de reação [10mM NTP Buffer, 2µL T7 RNA polimerase]. A reação foi incubada por 2h a 37°C.

1.3.10 Teste de atividade proteína recombinante LwCas13a

Para avaliar a atividade da enzima LwCas13a, foi realizado um ensaio de detecção utilizando o ssRNA dos isolados virais A e B do RSV. O teste de detecção foi realizado em tampão de clivagem [40mM Tris-HCL, 60mM NaCl, 6mM MgCl₂, pH=7.3] com 45nM de LwCas13a, 125nM RNA repórter, 16nM de crRNA, 2µL de inibidor de RNase e diferentes quantidades de RNA alvo: 25ng/µL, 50ng/µL e 100ng/µL em um volume final de 50µL de reação. Como controles foram incluídos apenas a proteína LwCas13a e o RNA repórter; RNase A comercial (Invitrogen) e apenas o RNA repórter. A fluorescência foi coletada após 1h de reação à 37°C, utilizando o QuantStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, USA).

1.3.11 Sensibilidade da enzima LwCas13a em comparação com a reação *two-step* RT-PCR em tempo real.

A partir do ssRNA quantificado foi realizada uma diluição partindo de 10^{-1} até 10^{-8} em água DEPC. A reação de RT-PCR em tempo real pelo método Taqman foi realizada em triplicata com o kit AgPath-ID One Step RT-PCR (Applied Biosystems® MA, USA) com $10\mu\text{M}$ de primers, $5\mu\text{M}$ de sonda e $5\mu\text{L}$ de cada diluição de ssRNA. A amplificação foi realizada na seguinte condição de ciclagem: 15 min a $45\text{ }^\circ\text{C}$, seguido por 45 ciclos de 10s a $95\text{ }^\circ\text{C}$ e 15 minuto a $95\text{ }^\circ\text{C}$. Como controle negativo foi utilizado mix de reação. A curva padrão foi obtida no software ABI 7500 (Applied Biosystems® MA USA).

A detecção através da LwCas13a foi realizada como descrito no tópico anterior (3.10). De forma resumida 45nM de LwCas13a, 125nM RNA repórter, 16nM de crRNA, $2\mu\text{L}$ de inibidor de RNase em tampão de clivagem [40mM Tris-HCL, 60mM NaCl, 6mM MgCl_2 , $\text{pH}=7.3$]. A fluorescência foi coletada após 1h a 37°C utilizando o QuantStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Para determinar o número de cópias/mL aproximado foi utilizado a seguinte equação:

$$\text{cópias/mL} = \frac{\frac{\text{Xg}}{\text{mL}} \text{RNA}}{\text{tamanho transcrito} \times 320} \times 6,022 \times 10^{23}$$

*tamanho do transcrito= n° bases

320g/mol = PM de médio 1 base de ssRNA

$6,022 \times 10^{23}$ = n° de moléculas em 1 mol

1.3.12 Ensaio de detecção LwCas13a utilizando amostras clínicas

Foram produzidos ssRNA a partir de todas as 107 amostras de aspirado de nasofaringe, como descrito em 1.3.9. Em seguida, foram submetidas ao ensaio de detecção após uma etapa de amplificação por PCR convencional e sem amplificação prévia por PCR convencional

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Obtenção da proteína recombinante LwCas13a

Para a análise da expressão foram coletadas amostras antes e após o período de indução, além das frações solúvel e insolúvel. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10% (figura 6A). Ambas as temperaturas de indução, 15°C e 18°C apresentaram expressão da proteína, comprovado pela banda na altura de 149 kDa, presente apenas após a indução por IPTG e confirmada por Western Blot (figura 7C). A temperatura de 15°C e 180rpm foram selecionadas para a produção em maior escala para o processo de purificação. Para purificação da proteína LwCas13a foi utilizada a cromatografia de afinidade ao níquel e o resultado está apresentado na figura 7A, onde as frações 1 a 10 correspondem as eluições com 500mM de imidazol. Como é possível observar muitos contaminantes de diferentes pesos molecular se ligaram a resina, dessa forma após agrupamento e concentração em amicon das frações, foi realizada uma cromatografia de gel filtração em Akta star coluna. Como esperado os contaminantes de menor peso molecular foram eliminados (figura 7B e Anexo 3). As frações contendo a proteína de interesse foram novamente agrupadas, concentradas em amicon e armazenadas a temperatura de -80°C. O rendimento proteico foi de 2,23mg/mL.

Figura 6- Teste para avaliação da expressão da LwCas13a na linhagem celular BL21 (DE3) PLysS. A) SDS-PAGE 10% após o crescimento a 15°C e 18°C em meio TB sob agitação de 180rpm. Frações pré indução; pós indução; fração solúvel e insolúvel. Presença da banda de indução na fração solúvel.

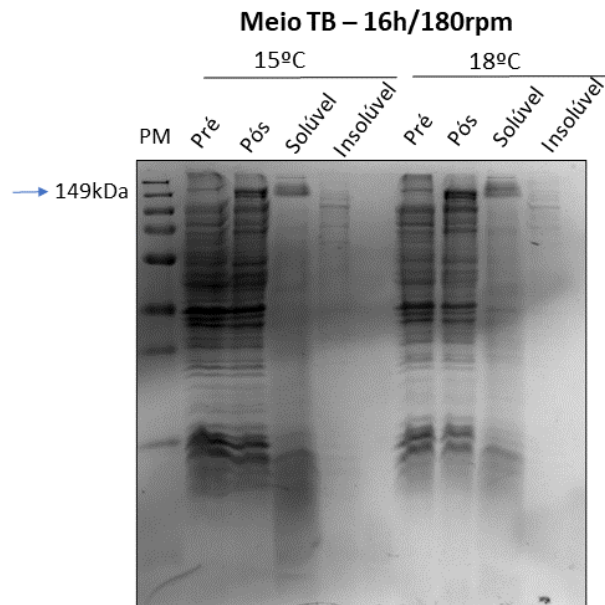
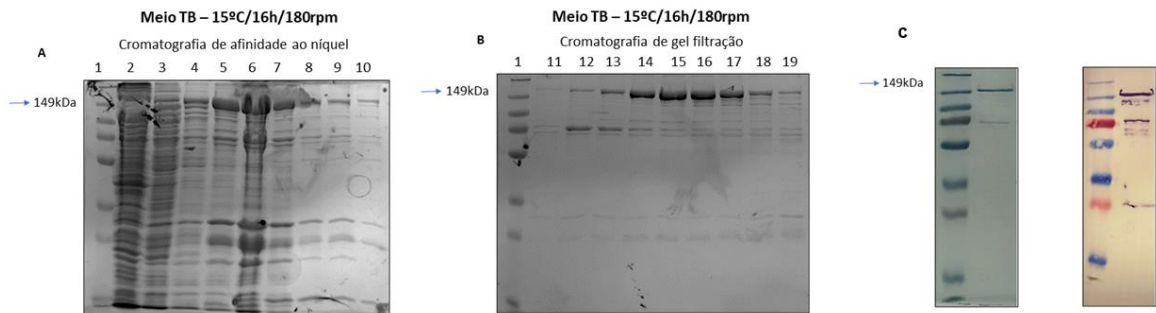


Figura 7- Purificação proteína recombinante LwCas13a na linhagem celular pLysS. A) SDS-PAGE 10% da cromatografia de afinidade ao níquel, crescimento a 15°C/16h/180rpm. 1- peso molecular; 2-10- eluição com 500mM de imidazol. Proteína de interesse na altura de 149 kDa. Presença de contaminantes de diversos pesos. B) SDS-PAGE 10% da cromatografia de gel filtração, crescimento celular a 15°C/16h/180rpm. 1- peso molecular; 11-19- frações contendo a proteína de interesse. Eliminação dos contaminantes da maioria dos contaminantes de peso molecular inferior a 70 kDa. C) *Western blot* fração após concentração em amicon.

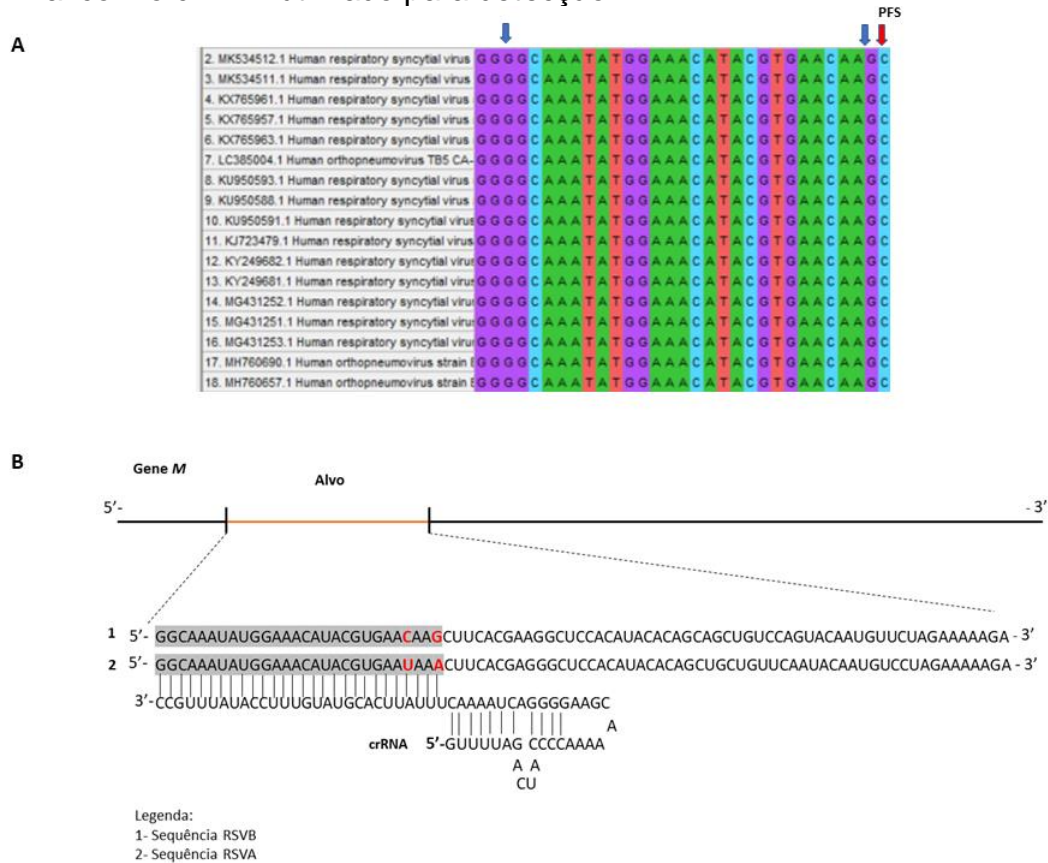


1.4.2 Obtenção da região alvo para detecção e produção do crRNA

O alinhamento das sequências virais permitiu selecionar uma região de 29 nucleotídeos dentro do gene M. Esse gene é alvo de alguns testes diagnóstico e diferente dos genes F e G se apresenta bastante conservado dentre os grupos A e B. Após a seleção, o fragmento de 29 nucleotídeos foi analisado via BLAST e não foi encontrado similaridade com nenhuma sequência do banco. O resultado do alinhamento está apresentado na figura 8A, com destaque para a região selecionada entre as setas azuis e a seta vermelha indicando o nucleotídeo de predileção (PFS) para a enzima LwCas13a.

A ferramenta online CRISPR-RT com base nos parâmetros determinados indicou como melhor sequência alvo a mesma região observado no alinhamento. O esquema apresentado em 8B mostra a interação entre a molécula de crRNA e o alvo presente na no gene M. No esquema é possível visualizar os dois mismatch presentes entre o RSVA e RSVB.

Figura 8- Imagem esquemática da obtenção da sequência para produção do crRNA. A) Resultado do alinhamento realizado pelo software MEGA com 72 sequências de genoma completo obtidas do GenBank. Setas em azul destacando a região selecionada dentro da sequência do gene *M* seguida pelo nucleotídeo de predileção da enzima LwCas13a (seta vermelha). B) Esquema da interação entre as sequências de RNA viral com o crRNA utilizado para detecção.



1.4.3 Produção do ssRNA alvo RSVA e RSVB

Primeiramente foram produzidos estoques virais dos dois isolados (HU10542 e HU10455 RSVA e RSVB, respectivamente). A árvore filogenética construída após o sequenciamento está apresentada no anexo 4. A figura 9 apresenta a imagem da cultura de células HEP2 (EVOS xl (Westover Scientific, Inc., Bothell, EUA) 5 dias após a infecção com cada isolado viral. Neste estágio o tapete celular foi praticamente destruído, mas ainda é possível observar alguns conglomerados celulares característicos do efeito citopático provocado pelo RSV.

A partir dessa cultura o RNA foi extraído para produção do cDNA e amplificação por PCR convencional (figura 10). Nesta etapa de amplificação foi inserido a sequência da enzima T7 RNA polimerase utilizando os primers descritos na tabela 2.

Após a confirmação da amplificação, foi realizada a transcrição de dsDNA (DNA dupla fita) para ssRNA em grandes quantidades. O ssRNA do RSVA e RSVB foram empregados como alvo para a detecção da enzima LwCas13a.

Figura 9- Imagem da cultura celular 5 após a infecção com RSV (A e B) e controle negativo. Como esperado para ambos os isolados o efeito citopático é exatamente igual. Neste estágio a intensa morte celular, mas ainda é possível observar alguns conglomerados celular característicos.

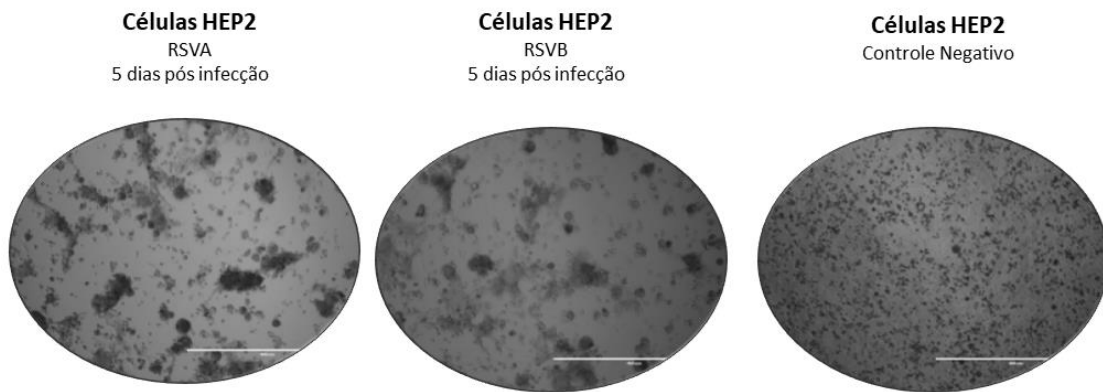
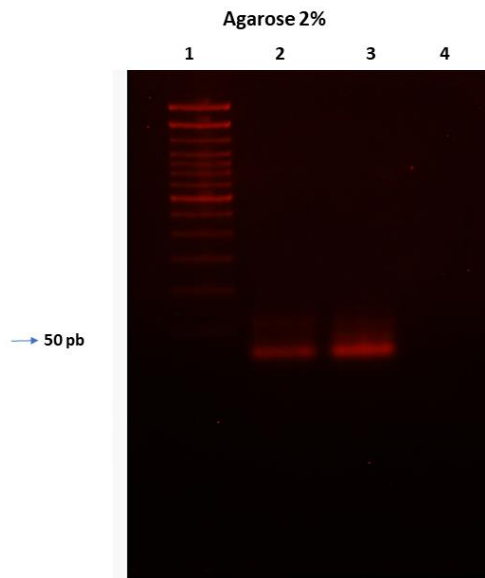


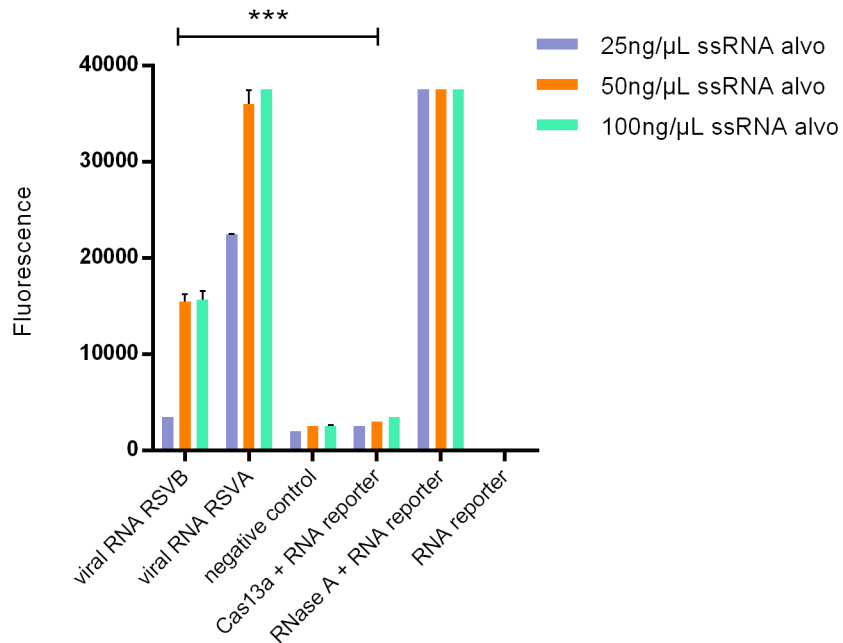
Figura 10- Eletroforese em gel de agarose 2%. Fragmento do *M* amplificado a partir do cDNA. 1- peso molecular; 2-gene *M* RSVA; 3-gene *M* RSVB; 4- controle negativo.



1.4.4 Teste de atividade proteína recombinante Cas13a

Para avaliar a atividade específica da enzima sobre o seu alvo, incluímos um controle contendo apenas a LwCas13a e o RNA repórter, um controle contendo uma RNase A e o RNA repórter e um último controle contendo apenas o RNA repórter. A figura 11, apresenta o resultado desse ensaio. Como esperado, obtivemos um baixo sinal de fluorescência do controle negativo, do controle composto pela LwCas13a + RNA repórter e nenhum sinal de fluorescência do RNA repórter sozinho. Em contrapartida, obtivemos altas taxas de fluorescência para ambos os alvos testados e para o controle composto pela RNase A + RNA repórter. Com esse ensaio demonstramos que a enzima LwCas13a é capaz de detectar com alto sinal de fluorescência quantidades a partir de 50ng/μL de RNA alvo e de forma específica. Comparando os dois grupos antigênicos, observamos que o sinal de fluorescência foi menor para o RSVB em comparação com o RSVA. Esperávamos esse resultado pois ao longo dos 28 nucleotídeos do gene *M*, o RSVB circulante em 2020 apresentava dois nucleotídeos de diferença em relação ao RSVA (Figura 8B). Esse mau pareamento acaba diminuindo a eficiência da enzima como já descrito por Gootenberg et al 2018.

Figura 11- Valores de fluorescência obtidos após 1h de reação à 37°C, para 25ng/ugL, 50ng/μL e 100ng/μL de ssRNA alvo. Baixo sinal de fluorescência para o controle negativo, Cas13a+RNA repórter e para o RNA repórter sozinho. Alto sinal de fluorescência para os RNA alvos a partir de 100ng/μL e para o controle RNase +RNA repórter. A diferença nas taxas de fluorescências entre o RSVA e RSVB estão de acordo com os mismatches entre as duas sequencias, provoca um mau pareamento entre o crRNA a sequência alvo do RSVB.

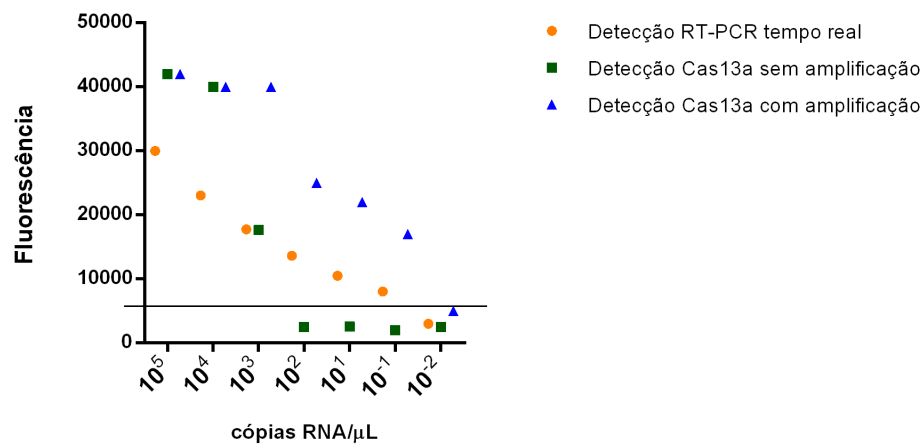


1.4.5 Comparação entre o ensaio de RT-PCR em tempo real e detecção utilizando a enzima LwCas13a.

A partir da quantificação e dos valores de fluorescência obtidos foi possível construir uma curva para cada uma das metodologias utilizadas e comparar com o teste padrão de RT-PCR em tempo real. O resultado está presente na Figura 12. A linha de corte presente no gráfico corresponde ao valor de ct (*cycle threshold*) gerado pela curva de eficiência para a reação de RT-PCR em tempo real obtida por meio do software. Como esperado a detecção utilizando a enzima LwCas13a com alvos amplificados por PCR convencional seguido de transcrição, amplificou o sinal de fluorescência, no entanto o limite de detecção se manteve igual quando comparamos com o RT-PCR em tempo real, de aproximadamente 10^{-1} cópias de RNA/μL. Porém, a detecção utilizando como alvo o RNA extraído, sem amplificação prévia, apresentou

queda abrupta de fluorescência a partir de 10^4 cópias de RNA/ μ L, sendo indetectável a partir de 10^3 cópias de RNA/ μ L.

Figura 12- Comparação entre RT-PCR em tempo real com a detecção utilizando a enzima LwCas13a com amplificação prévia por PCR convencional e sem amplificação. O ensaio sem amplificação apresentou uma drástica queda de fluorescência a partir de 10^4 cópias/ μ L e indetectável a partir de 10^3 cópias RNA/ μ L



1.4.6 Sensibilidade do ensaio de detecção LwCas13a em amostras de aspirado de nasofaringe.

O cálculo de sensibilidade e especificidade foi realizado para as duas condições de teste de detecção: com amplificação prévia por PCR convencional e sem amplificação prévia. Como esperado todas as 75 amostras positivas foram detectadas e não houve reação cruzada com nenhum dos demais vírus testado para ensaio com amplificação. O valor de ct 38.7 (*cycle threshold*) foi determinado pela curva de eficiência realizada para a reação de padrão de RT-PCR em tempo real. A sensibilidade para o ensaio sem amplificação prévia foi de 45,3% [33,7%-57,2%] e valor preditivo negativo de 43,8% [32,2%- 55,9%]. Em relação aos valores de fluorescência as amostras negativas apresentaram um “ruído de fundo” (background de fluorescência) maior em comparação (Figura 13B) devido a presença de diversas moléculas de RNA presentes no material extraído.

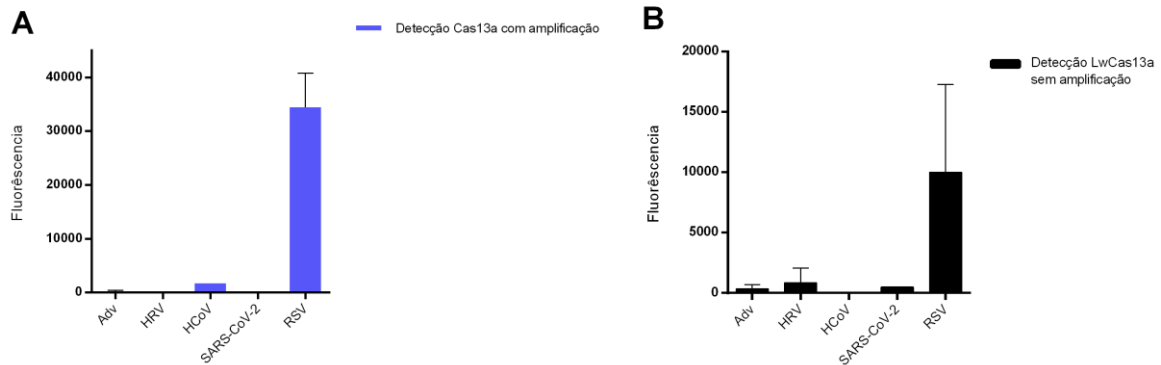
Tabela 3- Sensibilidade e especificidade detecção LwCas13a com amplificação prévia por PCR convencional comparado com teste padrão de RT-PCR em tempo real.

Detecção LwCas13a amplificação	RT-PCR em tempo real	
	Positivo (Ct<38.7)	Negativo (Ct>38.7)
Positivo	75	0
Negativo	0	32
Sensibilidade [95% IC]	100% [95,2%-100%]	
Especificidade [95% IC]	100% [89,1%-100%]	
Valor Preditivo Positivo [95%IC]	100% [95,2%- 100%]	
Valor Preditivo Negativo [95%IC]	100% [89,1%- 100%]	

Tabela 4- Sensibilidade e especificidade detecção LwCas13a sem amplificação prévia por PCR convencional comparado com teste padrão de RT-PCR em tempo real.

Detecção LwCas13a sem amplificação	RT-PCR em tempo real	
	Positivo (Ct<40)	Negativo (Ct>40)
Positivo	34	0
Negativo	41	32
Sensibilidade [95% IC]	45,3 % [33,7%-57,2%]	
Especificidade [95% IC]	100% [89,1%-100%]	
Valor Preditivo Positivo [95%IC]	100% [89,7%- 100%]	
Valor Preditivo Negativo [95%IC]	43,8% [32,2%- 55,9%]	

Figura 13- A) Médias da fluorescência das amostras testadas usando a enzima LwCas13a com amplificação por PCR convencional. B) Média da fluorescência das amostras testadas usando a enzima LwCas13a sem amplificação prévia.



1.5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho obtivemos a forma recombinante da proteína LwCas13a. A proteína foi obtida em um sistema procarioto e purificada em uma forma solúvel. As duas etapas de purificação empregadas (cromatografia de afinidade seguida pela cromatografia de gel filtração) conseguiram eliminar uma quantidade expressiva dos contaminantes, no entanto, contaminantes de peso molecular maiores que 100 kDa não foram eliminados por completo. Apesar disso, obtivemos um rendimento de aproximadamente 2,2mg/mL de proteína, comparáveis com o descrito na literatura^{58,83}. Uma opção para atingir maior pureza seria prosseguir para uma cromatografia de troca iônica (IEC). Nesse caso a separação é realizado com base na afinidade da molécula com a resina da coluna trocadora de íons. Existem dois tipos de cromatografia, as de trocas iônicas e de trocas catiônicas⁸⁴.

O resultado do *western blot* revelou, além da banda de interesse outra banda logo abaixo de tamanho próximo a LwCas13a, sugerindo degradação por proteases durante o processo de purificação.

As análises de atividade enzimática mostraram que a LwCas13a foi capaz de interagir com o ssRNA viral guiada por uma sequência de 28 nucleotídeos escolhida dentro do gene *M*. Essa interação necessita de um pareamento completo entre o RNA alvo e o crRNA para que ocorra a clivagem. Dois pontos são importantes diante dessa característica do sistema, o primeiro é que esse dado implica em uma constante

vigilância a respeito das mutações adquiridas dentro da região alvo, pois a presença de *mismatches* provoca um mal pareamento aumentando a chance de não reconhecimento do alvo pela enzima LwCas13a. Na prática isso é demonstrado pela menor taxa de clivagem diminuindo o sinal de fluorescência detectado que está de acordo com Gootenberg et al. O segundo ponto se apresenta como uma vantagem pois, com essa diferença no sinal de fluorescência resultante da menor eficiência enzimática, seria possível a distinção entre os grupos antigênicos A e B em um mesmo ensaio diagnóstico utilizando um único RNA guia.

Durante as primeiras etapas de execução do trabalho, adquirimos o RNA guia (crRNA) como uma sequência única de RNA sintético, apesar de prático torna o processo extremamente caro, pois raramente sequências de RNA sintético são confeccionadas no país e o valor médio por base é de R\$95,00 reais. Uma opção viável e mais barata seria produzir esse RNA guia através do processo de clonagem em plasmídeo bacteriano albergando a DR (Direct Repeat) da enzima LwCas13a. Dessa forma qualquer sequência alvo poderia ser clonada e posteriormente transcrita em ssRNA, diminuindo o custo e possibilitando produzir alvos de diferentes vírus.

Os ensaios de detecção foram realizados amplificando o alvo por meio de PCR convencional e posteriormente sem a amplificação. Como esperado a detecção com os alvos amplificados pela PCR convencional se mostrou 100% sensível e específico comparado ao RT-PCR em tempo real. Nos ensaios sem amplificação não conseguimos detectar amostras com carga viral inferior a 10^3 cópias RNA/ μ L em amostras de aspirado de nasofaringe. A sensibilidade nesse caso caiu para 45,3% comparado ao teste padrão. Esse dado inviabiliza uma aplicação da técnica pois a quantidade de RNA obtido depende de diversos fatores que incluem desde o processo de coleta do material, período da infecção do paciente, idade, condições imunológicas, entre outros ^{85,86,87}.

Opções para substituir a amplificação por PCR convencional já foram descritas, como o próprio SHERLOCK, que utiliza amplificação isotermal (LAMP) como uma estratégia rápida aliada a LwCas13a. Outras opções presentes na literatura são dispositivos e sistemas baseados em microfluídica e grafeno que se mostraram eficientes em detectar sequências guiadas pelas enzimas Cas sem amplificação prévia do material genético^{88,89}.

O diagnóstico rápido e sensível é primordial para o controle das infecções, tratamento dos pacientes e medidas profiláticas. A pandemia de SARS-CoV-2

mostrou a urgência de plataformas diagnósticas rápidos, sensíveis e acessíveis a população em postos de atendimentos, hospitais e farmácias. O desenvolvimento de tecnologias baseadas na plataforma CRISPR/cas apresentam muitas vantagens na área de diagnóstico molecular por possibilitar a união de outras tecnologias de fronteira, apresentando um potencial de revolucionar a área diagnóstica.

Os dados apresentados neste trabalho estão de acordo com a literatura e trouxe uma nova linha de pesquisa para o LVCM.

1.6 CONCLUSÕES

- A melhor condição de indução para obtenção da proteína recombinante LwCas13a foi a 15°C; 500µM IPTG; por 16h
- A sequência escolhida no gene *M* se mostrou um bom candidato.
- Foi demonstrado como a presença de *mismatches* entre as o RNA alvo e o crRNA altera a capacidade de clivagem pela LwCas13a.
- O sistema de detecção CRISPR-Cas13a é aplicável a amostras clínicas apresentando uma sensibilidade de 100% utilizando a amplificação por PCR previamente. E de 45,3% sem amplificação nenhuma previamente.

1.7 REFERÊNCIAS

- 1- WHO Strategy for the Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance based on Influenza Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2019.
- 2- Nair, Harish, D. James Nokes, Bradford D. Gessner, Mukesh Dherani, Shabir A. Madhi, Rosalyn J. Singleton, Katherine L. O'Brien, et al. 2010. "Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet* 375 (9725): 1545–55.
- 3- Kumar, A. 2006. "Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults." *Yearbook of Critical Care Medicine* 2006: 140–41.
- 4- Walsh, Edward E. 2017. "Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages." *Clinics in Chest Medicine* 38 (1): 29–36.
- 5- Chanock, Robert, and Laurence Finberg. 1957. "RECOVERY FROM INFANTS WITH RESPIRATORY ILLNESS OF A VIRUS RELATED TO CHIMPANZEE CORYZA AGENT (CCA)." *American Journal of Epidemiology* 66 (3): 291–300.
- 6- Morris, J. A., R. E. Blount, and R. E. Savage. 1956. "Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza." *Experimental Biology and Medicine* 92 (3): 544–49.
- 7- Afonso, Claudio L., Gaya K. Amarasinghe, Krisztián Bányai, Yīmíng Bào, Christopher F. Basler, Sina Bavari, Nicolás Bejerman, et al. 2016. "Taxonomy of the Order Mononegavirales: Update 2016." *Archives of Virology* 161 (8): 2351–60.
- 8-COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. *Fields virology*, Philadelphia, v.3, p. 1313 - 1351, 1996
- 9- Collins, Peter L., and Gail W. Wertz. 1986. "Human Respiratory Syncytial Virus Genome and Gene Products." In *Concepts in Viral Pathogenesis II*, 40–46.
- 10-Perez, Mar, Blanca García-Barreno, José A. Melero, Luis Carrasco, and Rosario Guinea. 1997. "Membrane Permeability Changes Induced in Escherichia Coliby the SH Protein of Human Respiratory Syncytial Virus." *Virology* 235 (2): 342–51.
- 11-Levine, S., R. Klaiber-Franco, and P. R. Paradiso. 1987. "Demonstration That Glycoprotein G Is the Attachment Protein of Respiratory Syncytial Virus." *The Journal of General Virology* 68 (9): 2521–24.
- 12- Walsh, E. E., and J. Hruska. 1983. "Monoclonal Antibodies to Respiratory Syncytial Virus Proteins: Identification of the Fusion Protein." *Journal of Virology* 47 (1): 171–77.
- 13- Henderson, Gary, Jillian Murray, and Robert P. Yeo. 2002. "Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins." *Virology* 300 (2): 244–54.

- 14- Wertz, G. W., P. L. Collins, Y. Huang, C. Gruber, S. Levine, and L. A. Ball. 1985. "Nucleotide Sequence of the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus Reveals an Unusual Type of Viral Membrane Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (12): 4075–79.
- 15- Melero, José A., Vicente Mas, and Jason S. McLellan. 2017. "Structural, Antigenic and Immunogenic Features of Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins Relevant for Vaccine Development." *Vaccine* 35 (3): 461–68.
- 16- Agoti, Charles N., Alexander G. Mwiuri, Charles J. Sande, Clayton O. Onyango, Graham F. Medley, Patricia A. Cane, and D. James Nokes. 2012. "Genetic Relatedness of Infecting and Reinfesting Respiratory Syncytial Virus Strains Identified in a Birth Cohort From Rural Kenya." *The Journal of Infectious Diseases* 206 (10): 1532–41.
- 17-Cane, P. A., D. A. Matthews, and C. R. Pringle. 1994. "Analysis of Respiratory Syncytial Virus Strain Variation in Successive Epidemics in One City." *Journal of Clinical Microbiology* 32 (1): 1–4.
- 18-Zhang, Liqun, Mark E. Peeples, Richard C. Boucher, Peter L. Collins, and Raymond J. Pickles. 2002. "Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology." *Journal of Virology* 76 (11): 5654–66.
- 19-Martínez, I., J. A. Melero, and J. Dopazo. 1997. "Antigenic Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein and Relevance of Hypermutation Events for the Generation of Antigenic Variants." *The Journal of General Virology* 78 (10): 2419–29.
- 20- Gorman, Jeffrey J., Bettina L. Ferguson, Dan Speelman, and John Mills. 1997. "Determination of the Disulfide Bond Arrangement of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment (G) Protein by Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 6 (6): 1308–15.
- 21- Johnson, P. R., M. K. Spriggs, R. A. Olmsted, and P. L. Collins. 1987. "The G Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Viruses of Subgroups A and B: Extensive Sequence Divergence between Antigenically Related Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (16): 5625–29.
- 22-Hendry, R. M., A. L. Talis, E. Godfrey, L. J. Anderson, B. F. Fernie, and K. McIntosh. 1986. "Concurrent Circulation of Antigenically Distinct Strains of Respiratory Syncytial Virus during Community Outbreaks." *The Journal of Infectious Diseases* 153 (2): 291–97.
- 23-Venter, Marietjie, Barry D. Schoub, Caroline T. Tiemessen, and Shabir A. Madhi. 2001. "Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus over Four Consecutive Seasons in South Africa: Identification of New Subgroup A and B Genotypes." *The Journal of General Virology* 82 (9): 2117–24.
- 24-Peret, Teresa C. T., Caroline B. Hall, Gregory W. Hammond, Pedro A. Piedra, Gregory A. Storch, Wayne M. Sullender, Cecilia Tsou, and Larry J. Anderson. 2000.

“Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America.” *The Journal of Infectious Diseases* 181 (6): 1891–96.

25-Welliver, Robert C., Sr. 2007. “Temperature, Humidity, and Ultraviolet B Radiation Predict Community Respiratory Syncytial Virus Activity.” *The Pediatric Infectious Disease Journal* 26 (11 Suppl): S29–35.

26- Bouzas, Maiara L., Juliana R. Oliveira, Artur Queiroz, Kiyoshi F. Fukutani, Aldina Barral, Annabel Rector, Elke Wollants, et al. 2018. “Diagnostic Accuracy of Digital RNA Quantification versus Real-Time PCR for the Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Aspirates from Children with Acute Respiratory Infection.” *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 106 (September): 34–40.

27- Moura, Fernanda Edna Araújo, Andrea Blanc, Sandra Frabasile, Adriana Delfraro, María José de Sierra, Lorena Tome, Eduardo Antônio Gonçalves Ramos, Marilda Mendonça Siqueira, and Juan Arbiza. 2004. “Genetic Diversity of Respiratory Syncytial Virus Isolated during an Epidemic Period from Children of Northeastern Brazil.” *Journal of Medical Virology* 74 (1): 156–60.

28-Checon, Rita Elizabeth, Marilda M. Siqueira, Ana Kelly Lugon, Silvana Portes, and Reynaldo Dietze. 2002. “Short Report: Seasonal Pattern of Respiratory Syncytial Virus in a Region with a Tropical Climate in Southeastern Brazil.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67 (5): 490–91.

29- Paris, Fernanda de-, Caroline Beck, Luciana de Souza Nunes, Alice Beatriz Mombach, Rodrigo Paiva, Denise da Silva Menezes, Márcia Pires, Rodrigo dos Santos, Ricardo de Souza Kuchenbecker, and Afonso Barth. 2014. “Evaluation of Respiratory Syncytial Virus Group A and B Genotypes among Nosocomial and Community-Acquired Pediatric Infections in Southern Brazil.” *Virology Journal* 11 (1): 36.

30-Antoniassi da Silva, Luciana Helena, Luciana Helena Antoniassi da Silva, Fernando Rosado Spilki, Adriana Gut Lopes Riccetto, Renata Servan de Almeida, Emílio Carlos Elias Baracat, and Clarice Weis Arns. 2008. “Genetic Variability in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus Isolated from the Campinas Metropolitan Region, Brazil.” *Journal of Medical Virology* 80 (9): 1653–60.

31-Thomazelli, Luciano M., Sandra Vieira, Andrea L. Leal, Thereza S. Sousa, Daniele B. L. Oliveira, Miguel A. Golono, Alfredo E. Gillio, Klaus E. Stwien, Dean D. Erdman, and Edison L. Durigon. 2007. “Surveillance of Eight Respiratory Viruses in Clinical Samples of Pediatric Patients in Southeast Brazil.” *Jornal de Pediatria* 83 (5): 422–28.

32- Durigon, Edison Luiz, Viviane Fongaro Botosso, and Danielle Bruna Leal de Oliveira. 2017. “Human Respiratory Syncytial Virus: Biology, Epidemiology, and Control.” *Human Virology in Latin America*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7_12.

32- González-Reyes, L., M. B. Ruiz-Argüello, B. García-Barreno, L. Calder, J. A. López, J. P. Albar, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero. 2001. “Cleavage of the

Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein at Two Distinct Sites Is Required for Activation of Membrane Fusion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9859–64.

33- Lamb, R. A. 1993. “Paramyxovirus Fusion: A Hypothesis for Changes.” *Virology* 197 (1): 1–11.

34- Johnson, P. R., and P. L. Collins. 1988. “The Fusion Glycoproteins of Human Respiratory Syncytial Virus of Subgroups A and B: Sequence Conservation Provides a Structural Basis for Antigenic Relatedness.” *The Journal of General Virology* 69 (10): 2623–28.

35-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Palivizumab Product Approval Information Licensing Action. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm093369.htm>>. Acessado em: 10 junho 2018

36- Paiva, Maria Aparecida Soares de Souza, Maria Aparecida Soares de Souza Paiva, and Sandra Mara Moreira Amaral. 2009. “Doenças Pulmonares Intersticiais Crônicas Na Criança.” *Jornal Brasileiro de Pneumologia*.

37- The IMpact-RSV Study Group. 1998. “Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-Risk Infants.” *Pediatrics* 102 (3): 531–37

38-Shadman, Kristin A., and Ellen R. Wald. 2011. “A Review of Palivizumab and Emerging Therapies for Respiratory Syncytial Virus.” *Expert Opinion on Biological Therapy* 11 (11): 1455–67.

39- CPS Updates Recommendations for Use of Palivizumab against RSV. Disponível online:<<http://www.cps.ca/en/media/release-communicue/cps-updates-recommendations-for-use-of-palivizumab-against-rsv>>Acessado em: 10 junho 2018.

40- Oliveira, Danielle B. L., Marika K. Iwane, Mila M. Prill, Geoffrey A. Weinberg, John V. Williams, Marie R. Griffin, Peter G. Szilagyi, et al. 2015. “Molecular Characterization of Respiratory Syncytial Viruses Infecting Children Reported to Have Received Palivizumab Immunoprophylaxis.” *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 65 (April): 26–31.

41- Zhu, Qing, Josie M. McAuliffe, Nita K. Patel, Frances J. Palmer-Hill, Chin-Fen Yang, Brandon Liang, Lan Su, et al. 2011. “Analysis of Respiratory Syncytial Virus Preclinical and Clinical Variants Resistant to Neutralization by Monoclonal Antibodies Palivizumab And/or Motavizumab.” *The Journal of Infectious Diseases* 203 (5): 674–82.

42- Powell, K. L., E. Thomas, and G. S. Cockerill. 2017. “Antiviral Drugs for Acute Infections.” In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 665–81.

43- Hause, Anne M., David M. Henke, Vasanthi Avadhanula, Chad A. Shaw, Lorena I. Tapia, and Pedro A. Piedra. 2017. “Sequence Variability of the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Gene among Contemporary and Historical Genotypes of RSV/A

and RSV/B." *PloS One* 12 (4): e0175792.

44-Williams, Brian G., Eleanor Gouws, Cynthia Boschi-Pinto, Jennifer Bryce, and Christopher Dye. 2002. "Estimates of World-Wide Distribution of Child Deaths from Acute Respiratory Infections." *The Lancet Infectious Diseases* 2 (1): 25–32.

45-Junior, João B. Salomão, João B. Salomão Junior, Luiz G. A. Gardinassi, Paulo V. M. Simas, Cintia O. Bittar, Fátima P. Souza, Paula Rahal, and Dirce M. T. Zanetta. 2011. "Human Respiratory Syncytial Virus in Children Hospitalized for Acute Lower Respiratory Infection." *Jornal de Pediatria* 0 (0): 0–0.

46- Collins, Peter L., and José A. Melero. 2011. "Progress in Understanding and Controlling Respiratory Syncytial Virus: Still Crazy after All These Years." *Virus Research* 162 (1-2): 80–99.

47- Hall, Caroline Breese, Geoffrey A. Weinberg, Marika K. Iwane, Aaron K. Blumkin, Kathryn M. Edwards, Mary A. Staat, Peggy Auinger, et al. 2009. "The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children." *The New England Journal of Medicine* 360 (6): 588–98.

48- Zhou, Hong, William W. Thompson, Cecile G. Viboud, Corinne M. Ringholz, Po-Yung Cheng, Claudia Steiner, Glen R. Abedi, Larry J. Anderson, Lynnette Brammer, and David K. Shay. 2012. "Hospitalizations Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States, 1993–2008." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 (10): 1427–36.

49- Pfeil, Johannes, Julia Tabatabai, Anja Sander, Markus Ries, Jürgen Grulich-Henn, and Paul Schnitzler. 2014. "Screening for Respiratory Syncytial Virus and Isolation Strategies in Children Hospitalized With Acute Respiratory Tract Infection." *Medicine* 93 (25): e144.

50- Hogan, Catherine, Chelsea Caya, and Jesse Papenburg. 2018. "Rapid and Simple Molecular Tests for the Detection of Respiratory Syncytial Virus: A Review." *Expert Review of Molecular Diagnostics*, June. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1487293>.

51- Moraz, Gabriele, Anderson da Silva Garcez, Eliseu Miranda de Assis, Jandira Pereira dos Santos, Nêmora Tregnago Barcellos, and Locimara Ramos Kroeff. 2015. "Estudos de Custo-Efetividade Em Saúde No Brasil: Uma Revisão Sistemática." *Ciencia & Saude Coletiva* 20 (10): 3211–29.

52- Abels, S., D. Nadal, A. Stroehle, and W. Bossart. 2001. "Reliable Detection of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children for Adequate Hospital Infection Control Management." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (9): 3135–39.

53- Gröndahl, B., W. Puppe, J. Weigl, and H-J Schmitt. 2005. "Comparison of the BD Directigen Flu A B Kit and the Abbott TestPack RSV with a Multiplex RT-PCR ELISA for Rapid Detection of Influenza Viruses and Respiratory Syncytial Virus." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11 (10): 848–50.

54- Chartrand, Caroline, Nicolas Tremblay, Christian Renaud, and Jesse Papenburg.

2015. “Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-Analysis.” *Journal of Clinical Microbiology* 53 (12): 3738–49.
- 55- bioMérieux: FilmArray® Respiratory Panel 2017 . Disponível em <<http://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarrayr-respiratory-panel>> Acessado em 12 junho 2018.
- 56- Alere: Alere™ i RSV Demo video 2016 Disponível em <<http://www.alere.com/en/home/product-details/alere-i-rsv.html>> Acessado em 14 de junho 2018.
- 57- Chen, Janice S., Enbo Ma, Lucas B. Harrington, Maria Da Costa, Xinran Tian, Joel M. Palefsky, and Jennifer A. Doudna. 2018. “CRISPR-Cas12a Target Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity.” *Science* 360 (6387): 436–39.
- 58- Gootenberg, Jonathan S., Omar O. Abudayyeh, Jeong Wook Lee, Patrick Essletzbichler, Aaron J. Dy, Julia Joung, Vanessa Verdine, et al. 2017. “Nucleic Acid Detection with CRISPR-Cas13a/C2c2.” *Science* 356 (6336): 438–42.
- 59-Gootenberg, Jonathan S., Omar O. Abudayyeh, Max J. Kellner, Julia Joung, James J. Collins, and Feng Zhang. 2018. “Multiplexed and Portable Nucleic Acid Detection Platform with Cas13, Cas12a, and Csm6.” *Science* 360 (6387): 439–44.
- 60-Ishino, Yoshizumi, Mart Krupovic, and Patrick Forterre. 2018. “History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology.” *Journal of Bacteriology* 200 (7). <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>.
- 61- Jansen, Ruud, Jan D. A. van Embden, Wim Gaastra, and Leo M. Schouls. 2002. “Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes.” *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75.
- 62-Mojica, Francisco J. M., César Díez-Villaseñor, Jesús García-Martínez, and Elena Soria. 2005. “Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements.” *Journal of Molecular Evolution* 60 (2): 174–82.
- 63- Makarova, Kira S., Alexander V. Sorokin, Pavel S. Novichkov, Yuri I. Wolf, and Eugene V. Koonin. 2007. “Clusters of Orthologous Genes for 41 Archaeal Genomes and Implications for Evolutionary Genomics of Archaea.” *Biology Direct* 2 (1): 33.
- 64-Makarova, Kira S., and Eugene V. Koonin. 2012. “Evolution and Classification of CRISPR-Cas Systems and Cas Protein Families.” In *CRISPR-Cas Systems*, 61–91.
- 65- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science* 337 (6096): 816–21.
- 66- Dahlberg, Lina, and Anna M. Groat Carmona. 2018. “CRISPR-Cas Technology In and Out of the Classroom.” *The CRISPR Journal* 1 (2): 107–14.
- 67-Jiang, Wenyan, and Luciano A. Marraffini. 2015. “CRISPR-Cas: New Tools for

Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems.” *Annual Review of Microbiology* 69 (July): 209–28.

68- Shmakov, Sergey, Aaron Smargon, David Scott, David Cox, Neena Pyzocha, Winston Yan, Omar O. Abudayyeh, et al. 2017. “Diversity and Evolution of Class 2 CRISPR–Cas Systems.” *Nature Reviews. Microbiology* 15 (3): 169–82.

69- Shmakov, Sergey, Omar O. Abudayyeh, Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Jonathan S. Gootenberg, Ekaterina Semenova, Leonid Minakhin, et al. 2015. “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems.” *Molecular Cell* 60 (3): 385–97.

70- Anders, Carolin, Ole Niewoehner, Alessia Duerst, and Martin Jinek. 2014. “Structural Basis of PAM-Dependent Target DNA Recognition by the Cas9 Endonuclease.” *Nature* 513 (7519): 569–73.

71-Abudayyeh, Omar O., Jonathan S. Gootenberg, Silvana Konermann, Julia Joung, Ian M. Slaymaker, David B. T. Cox, Sergey Shmakov, et al. 2016. “C2c2 Is a Single-Component Programmable RNA-Guided RNA-Targeting CRISPR Effector.” *Science* 353 (6299): aaf5573.

72-Mauk, Michael G., Jinzhao Song, Changchun Liu, and Haim H. Bau. 2018. “Simple Approaches to Minimally-Instrumented, Microfluidic-Based Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Tests.” *Biosensors* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/bios8010017>.

73- Toley, Bhushan J., Isabela Covelli, Yevgeniy Belousov, Sujatha Ramachandran, Enos Kline, Noah Scarr, Nic Vermeulen, Walt Mahoney, Barry R. Lutz, and Paul Yager. 2015. “Isothermal Strand Displacement Amplification (iSDA): A Rapid and Sensitive Method of Nucleic Acid Amplification for Point-of-Care Diagnosis.” *The Analyst* 140 (22): 7540–49.

74- Borkotoky, Subhomoi, and Ayaluru Murali. 2018. “The Highly Efficient T7 RNA Polymerase: A Wonder Macromolecule in Biological Realm.” *International Journal of Biological Macromolecules*, May. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.198>.

75- Piepenburg, Olaf, Colin H. Williams, Derek L. Stemple, and Niall A. Armes. 2006. “DNA Detection Using Recombination Proteins.” *PLoS Biology* 4 (7): e204.

76- Faye, Oumar, Ousmane Faye, Barré Soropogui, Pranav Patel, Ahmed Abd El Wahed, Cheikh Loucoubar, Gamou Fall, et al. 2015. “Development and Deployment of a Rapid Recombinase Polymerase Amplification Ebola Virus Detection Assay in Guinea in 2015.” *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 20 (44). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.44.30053>.

77- Yin, Chaoran, Ting Zhang, Xiyang Qu, Yonggang Zhang, Raj Putatunda, Xiao Xiao, Fang Li, et al. 2017. “In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models.” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (5): 1168–86.

78- Ellis, Chelsey, Amita Misir, Charles Hui, Mona Jabbour, Nicholas Barrowman, Jonathan Langill, Jennifer Bowes, and Robert Slinger. 2016. “Detection of Respiratory

Viruses and Bacteria in Children Using a Twenty-Two Target Reverse-Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR) Panel.” *World Journal of Pediatrics: WJP* 12 (2): 183–89.

79- Db, Cox, D. B. Cox, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, B. Franklin, M. J. Kellner, J. Joung, and F. Zhang. 2018. “RNA Editing with CRISPR-Cas13.” *Yearbook of Paediatric Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/ey.15.14.11>.

80- Oliveira, Andressa P., Fernando M. Simabuco, Rodrigo E. Tamura, Manuel C. Guerrero, Paulo G. G. Ribeiro, Towia A. Libermann, Luiz F. Zerbini, and Armando M. Ventura. 2013. “Human Respiratory Syncytial Virus N, P and M Protein Interactions in HEK-293T Cells.” *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.010>.

81- Sampayo-Escobar, Viviana, Ryan Green, Michael B. Cheung, Raminder Bedi, Subhra Mohapatra, and Shyam S. Mohapatra. 2018. “Osteopontin Plays a Pivotal Role in Increasing Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection.” *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192709>.

82- Utlely, Thomas J., Nicole A. Ducharme, Vasundhara Varthakavi, Bryan E. Shepherd, Philip J. Santangelo, Michael E. Lindquist, James R. Goldenring, and James E. Crowe Jr. 2008. “Respiratory Syncytial Virus Uses a Vps4-Independent Budding Mechanism Controlled by Rab11-FIP2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29): 10209–14.

83- Yao, Rui, Yueren Xu, Lang Wang, Dawei Wang, Linchang Ren, Changling Ren, Cunyuan Li, et al. 2021. “CRISPR-Cas13a-Based Detection for Bovine Viral Diarrhea Virus.” *Frontiers in Veterinary Science* 8 (June): 603919.

84- PCR (RT-qPCR) Panel.” *World Journal of Pediatrics: WJP* 12 (2): 183–89.
Jungbauer, Alois, and Rainer Hahn. 2009. “Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography.” *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)63022-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)63022-6).

85- El Saleeby, Chadi M., Andy J. Bush, Lisa M. Harrison, Jody A. Aitken, and John P. Devincenzo. 2011. “Respiratory Syncytial Virus Load, Viral Dynamics, and Disease Severity in Previously Healthy Naturally Infected Children.” *The Journal of Infectious Diseases* 204 (7): 996–1002.

86- Taveras, Jeanette, Cristina Garcia-Maurino, Melissa Moore-Clingenpeel, Zhaohui Xu, Sara Mertz, Fang Ye, Phyl Chen, et al. 2022. “Type III Interferons, Viral Loads, Age, and Disease Severity in Young Children With Respiratory Syncytial Virus Infection.” *The Journal of Infectious Diseases* 227 (1): 61–70.

87- Watanabe, Raí André Silva, Jessica Santiago Cruz, Luciano Kleber de Souza Luna, Vitória Rodrigues Guimarães Alves, Danielle Dias Conte, Larissa Lyra, Filipe Nishiyama, Bruno Sanchez Camargo, and Nancy Bellei. 2022. "Respiratory Syncytial Virus: Viral Load, Viral Decay, and Disease Progression in Children with Bronchiolitis." *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 53 (3): 1241–47.

88- Yu, Haiyang, Huibin Zhang, Jinhua Li, Zheng Zhao, Minhua Deng, Zhanpeng Ren, Ziqin Li, Chenglong Xue, Mitch Guijun Li, and Zhaowei Chen. 2022. "Rapid and Unamplified Detection of SARS-CoV-2 RNA via CRISPR-Cas13a-Modified Solution-Gated Graphene Transistors." *ACS Sensors* 7 (12): 3923–32.

89- Welch, Nicole L., Meilin Zhu, Catherine Hua, Juliane Weller, Marzieh Ezzaty Mirhashemi, Tien G. Nguyen, Sreekar Mantena, et al. 2022. "Multiplexed CRISPR-Based Microfluidic Platform for Clinical Testing of Respiratory Viruses and Identification of SARS-CoV-2 Variants." *Nature Medicine* 28 (5): 1083–94.

CAPÍTULO 2

O LVCM se colocou à disposição das demandas que foram surgindo ao longo dos meses de pandemia dentro da sua área de conhecimento e atuação. Dessa forma, o intuito deste capítulo é abordar uma parte de um trabalho emergencial prestado à comunidade na tentativa de contribuir com diagnóstico e conhecimento científico. Os seguintes tópicos serão abordados neste capítulo:

- padronização de teste de ELISA indireto utilizando amostras de soro humano para detecção de anticorpos da classe IgM, IgA e IgG
- Padronização de teste de ELISA utilizando sangue capilar coletado em papel filtro para detecção de anticorpos da classe IgG.
- aplicação do teste de ELISA no diagnóstico de pacientes de diferentes hospitais da cidade de São Paulo e triagem de pacientes e doares de plasma convalescente.

2.1 INTRODUÇÃO

Em março de 2020 a OMS (Organização Mundial da Saúde) declarou pandemia da Covid-19 em decorrência das infecções causadas pelo vírus SARS-CoV-2, agente etiológico da doença, identificado em janeiro de 2020 ¹. Desde dezembro de 2019 o vírus era o responsável pelo aumento dos casos de pneumonia grave na China, especificamente na província de Hubei ¹. Em fevereiro de 2020, um homem de 61 anos de idade foi diagnosticado na cidade de São Paulo ao retornar da Itália, região da Lombardia, configurando o primeiro caso no Brasil ². Naquele momento 25 países estavam sendo afetados e mais de 3 milhões de casos haviam sido confirmados no mundo ³.

Ao longo do primeiro trimestre de 2020 medidas restritivas foram sendo adotadas ao redor do mundo na tentativa de desacelerar as taxas de contaminação, principalmente a suspensão de voos e quarentena de viajantes ⁴. No Brasil, o estado de São Paulo, epicentro dos casos, decretou em 23 de março o fechamento de todo o comércio, exceto os serviços essenciais, e suspensão das aulas nas redes públicas e privadas de ensino. Em seguida diversas cidades brasileiras decretaram alguma medida restritiva. Em dois meses, o país já superava a marca de 400 mil pessoas infectadas e mais de 27 mil mortes ⁵.

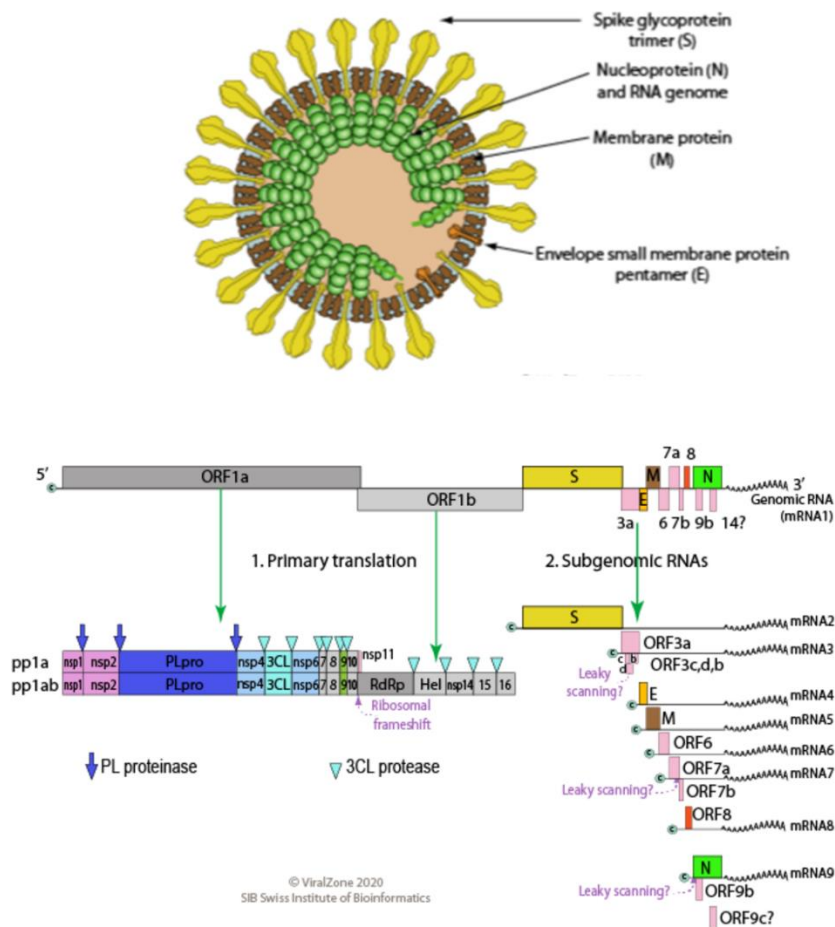
Em julho de 2021 o Brasil ocupava o segundo lugar no *ranking* de número de mortes por Covid-19, com 562.752 vidas perdidas, atrás dos EUA com 611.504 mortes⁶. Um trabalho publicado na revista científica britânica *The BJM* no mesmo período demonstrou como as respostas descoordenadas com a emergência e desvalorização da ciência, negando o potencial impacto, contribuíram para o exorbitante número de mortes nesses países ⁷. Em 27 de abril de 2021 uma CPI (Comissão Parlamentar de Inquérito) foi instaurada no Senado brasileiro para apurar as ações e omissões do Governo Federal no enfrentamento da pandemia. Encerrada em novembro, a comissão recomendou o indiciamento de 66 pessoas físicas, dentre elas o presidente da república, e 2 jurídicas, reconhecendo que o negacionismo em relação ao vírus e às vacinas teriam aumentado o número de mortes no Brasil ^{8,9}.

A Síndrome Respiratória Aguda Grave do inglês SARS - *Severe Acute Respiratory Syndrome* - é um quadro clínico provocada por coronavírus associados à SARS (SARS-CoV). Em 2003 o primeiro vírus identificado provocou um surto global com aproximadamente 8 mil casos e 800 mortes, desde 2004 nenhum caso foi

relatado ¹⁰. Após 14 anos do surgimento, a cepa que desencadeou o surto global foi identificada em uma população de morcegos *Rhinolophus sinicus* em uma caverna na província de Yunnan, China ¹¹. Em 2012 um novo coronavírus foi identificado na península arábica, especificamente na Jordânia, denominado MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome* – Síndrome Respiratória do Oriente Médio), o único surto expressivo fora da península relatado ocorreu em 2015 na Coreia do Sul ¹². Existem indícios de que o MERS-CoV tenha surgido em morcegos, mas o que se sabe até o momento é que humanos são infectados através do contato direto com camelos em vários países do Oriente Médio, África e sul da Ásia ^{13,14}. Dentre os 7 coronavírus capazes de infectar humanos, o MERS-CoV-2 é o que apresenta maior mortalidade, chegando a 37% ¹⁰. Os outros 4 vírus são conhecidos por causar sintomas leves de resfriado (229E, NL63, OC43 e HKU) ^{15,16}.

Os SARS-CoV pertencem ao subgênero *Sarbecovirus*, gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Orthocoronavirinae* e família *Coronaviridae*. São vírus esféricos, envelopados, compostos por um (+) ssRNA (RNA simples fita de polaridade positiva), que atua como genoma e mRNA (RNA mensageiro), classificação IV de Baltimore. Possuem o maior genoma de todos os vírus de RNA com aproximadamente 30kb ¹⁷ (Figura 14).

Figura 14- Representação esquemática da partícula viral do SARS-CoV-2. O esquema apresenta as principais proteínas estruturais e a organização do genoma viral. Imagem retirada do portal de pesquisa bioinformática *ViralZone*.

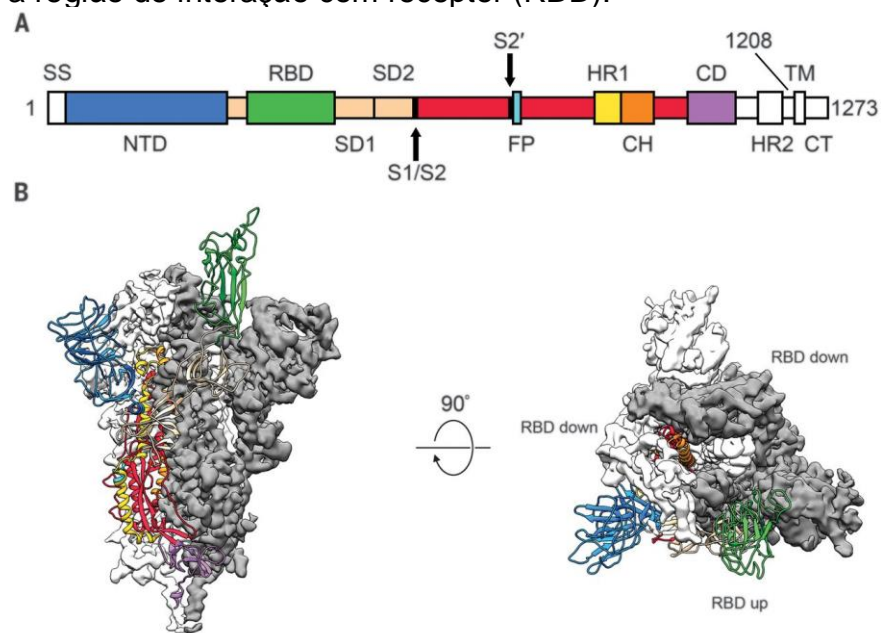


A adesão do SARS-CoV-2 a célula hospedeira ocorre pela interação entre a glicoproteína S (Spike) e o receptor da célula. A partícula pode ser endocitada ou o (+) ssRNA viral é liberada diretamente no citoplasma através da fusão da membrana viral com a membrana celular¹⁸. No citoplasma a tradução da ORF 1a e 1b ocorre, originando as proteínas envolvidas no processo de replicação e transcrição, dentre elas a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela transcrição em do genoma em moléculas de (-) ssRNA (RNA simples fita de polaridade negativa). Esses RNAs são utilizados como molde para a replicação de novas moléculas (+) ssRNA e para a transcrição descontinuada dos mRNA subgenômicos, que são posteriormente traduzidos em diferentes proteínas estruturais^{18, 19}.

Destaca-se entre as proteínas estruturais, a glicoproteína S, constituída por 1273 aminoácidos e composta por duas subunidades, S1 e S2¹⁹. Na S1 localiza-se o

domínio de ligação ao receptor, denominado RBD (*Receptor-binding domain*), região que interage com o receptor ACE2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*) presente em diversos tecidos do corpo humano¹⁸. A entrada na célula requer uma clivagem na junção entre as subunidades após a adesão^{18,19}. A região de interação com o receptor celular (RBD) é um alvo crítico para anticorpos neutralizantes e desde a elucidação de sua estrutura, tem sido alvo de drogas e vacinas profiláticas²⁰. Outra região alvo de anticorpos na S1 é a N-terminal (NTD). Além disso, toda a subunidade 1 sofre pressão seletiva, acumulando grande parte das mutações responsáveis pela geração de variantes virais²¹. Já foram descritas mais de 5 mil variantes, a OMS as classifica em variantes de preocupação e de interesse. As de preocupação que circularam ou circularam no Brasil são: Alpha, Beta, Gama, Delta e Ômicron e suas subvariantes²².

Figura 15- Estrutura da proteína Spike do SARS-CoV-2. A) Estrutura primária com destaque para os domínios. B) Estrutura tridimensional da forma pré fusão com destaque para a região de interação com receptor (RBD).



Com o intenso esforço da comunidade científica ao redor do mundo, até junho de 2020, 5.560 trabalhos científicos a respeito do novo vírus haviam sido publicados em periódicos conceituados com base no banco de dados Scopus²⁶. Este fato aliado ao intenso investimento em pesquisa nas últimas décadas, principalmente em países desenvolvidos, foi crucial para as primeiras formulações vacinais estarem disponíveis em novembro de 2020, tempo recorde de desenvolvimento de vacina²⁸. Até o

momento nenhuma das formulações disponíveis confere imunidade esterilizante, capaz de conferir uma barreira contra a infecção, mas são eficientes em proteger a maioria das pessoas da forma grave da doença ²⁹.

A contaminação viral ocorre principalmente por meio de gotículas ou partículas formadoras de aerossóis expelidas pela fala, tosse ou espirro por pessoas infectadas¹⁷. O contato das mãos com objetos e superfícies contaminadas com a mucosa do nariz, olhos e boca também são uma via de contaminação, no entanto, o vírus não parece permanecer viável por longos períodos em superfícies abióticas ³⁰. Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse, cansaço, perda do paladar e olfato. Intensa dificuldade para respirar, perda da mobilidade e dores no peito configuram entre os sintomas relacionadas ao quadro grave da doença, no qual os pacientes apresentam pneumonia bilateral ³¹. A faixa etária com 60 anos ou mais é o grupo mais afetado pela Covid-19, representando 67,7% das mortes até agosto de 2021 ³².

O diagnóstico é realizado por RT-PCR em tempo real em amostras de swab nasal e oral ou por aspirado de nasofaringe ²⁹. Os testes rápidos (imunocromatográficos) para detecção de antígeno são vantajosos para o diagnóstico devido a facilidade de realização e rápido resultado. No entanto apresentam baixa sensibilidade, principalmente em pacientes assintomáticos e sofrem intensa variação de performance nos estudos ³⁰. Esses testes foram intensamente utilizados no diagnóstico da Covid-19 desde o início da pandemia pois, além das dificuldades técnicas e operacionais do RT-PCR em tempo real, o sistema de saúde estava em sobrecarga e um resultado poderia demorar até 30 dias para liberação. O teste isotermal RT- LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) utilizado para detecção de outros vírus respiratório foi empregado para o diagnóstico da Covid-19 e até o 9º dia da infecção apresentou concordância de 100% com RT-PCR em tempo real, após esses períodos a sensibilidade cai de forma acentuada ³¹.

As características exatas da resposta humoral parecem incertas ainda, no entanto o que se observa é que a soroconversão para IgM e IgG ocorrem praticamente de forma simultânea, na maioria dos pacientes em 7 dias após o início dos sintomas e chegam a altos níveis após 10 dias ³². A gravidade da doença está associada com idade avançada, sexo masculino e comorbidades. Em pacientes graves e fatais se observa uma resposta maior de IgM, IgG e interleucinas inflamatórias como, IL-6 e IL-1, em contraste a níveis reduzidos de células TCD4+, TCD8+ e células NK (*natural killer*). Esse cenário caracteriza um estado inflamatório elevado, mas imunossuprimido

em relação aos linfócitos, provocando um desbalanço de resposta e culminando para um mal prognóstico.

As proteínas N e S apresentam perfil de resposta imune parecido, no entanto os anticorpos contra a N caem mais rapidamente em comparação a S ³³. Ambas as proteínas são empregadas nos testes sorológicos. Os testes sorológicos foram úteis para o diagnóstico de pacientes suspeitos com resultados negativos de RT-PCR e para a identificação de infecções assintomáticas. Após a vacinação esse diagnóstico se tornou mais difícil pois para a identificação de infecção prévia é necessário utilizar um alvo diferente daquele contido na formulação vacinal, mas, os testes ainda são muito importantes para avaliação da resposta vacinal.

2.2 OBJETIVO

O principal objetivo foi padronizar um teste de ELISA indireto para detecção das imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG) contra SARS-CoV-2 com alta sensibilidade e especificidade para ser utilizado no diagnóstico e triagem de amostras clínicas humanas.

Objetivo secundário:

- Padronizar um teste de ELISA IgG para detecção em amostras de sangue capilar utilizando um antígeno recombinante produzido *in house*

2.3 MATERIAIS E METODOS

2.3.1 Amostragem

Amostras utilizada no diagnóstico clínico de SARS-CoV-2

O laboratório de Virologia Clínica e Molecular ampliou em 2020 seu trabalho feito desde 1995 de fornecer diagnóstico para vírus respiratório de importância pediátrica, atendendo 7 hospitais da cidade de São Paulo. Devido a importância do diagnóstico para contenção do vírus emergente em ambiente hospitalar, além dos pacientes, todas as equipes médicas e de suporte dos hospitais também passaram a ser acompanhadas.

Além da coleta de *swab* e/ou aspirado de nasofaringe para o diagnóstico por meio de RT-PCR em tempo real, o sangue de pacientes em diferentes estágios da infecção foram coletados em tubos com ativador de coagulação para obtenção do soro. O critério para solicitação de diagnóstico sorológico foi determinado pelas equipes médicas dos hospitais. As amostras foram coletadas nas unidades hospitalares e eram transportadas diariamente até o ICBII-USP sob refrigeração (4°C).

Os hospitais atendidos no período foram: Hospital Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo; Hospital Municipal Infantil Menino Jesus; Hospital Infantil Darcy Vargas; Hospital Infantil Cândido Fontoura; Hospital Universitário- Universidade de São Paulo; Hospital São Luiz Gonzaga e Hospital Dom Pedro II. Ao todo foram analisadas 986 amostras de soro. Biorrepositório CEPESH 028.216 sob o CAEE 39339920.1.0000.5467.

Amostragem do projeto plasma convalescente como alternativa terapêutica para o tratamento de SARS-CoV-2.

O projeto multicêntrico foi uma parceria entre o Hospital das Clínicas de São Paulo, o Hospital Sírio-Libanês e o Hospital Israelita Albert Einstein no qual o LVCM integrou com o objetivo de fornecer o *status* sorológico dos pacientes em tratamento e candidatos à doação de plasma. Ao todo foram triadas 1130 amostras para as classes de anticorpos IgM, IgA e IgG pelo método de ELISA indireto e dosados para anticorpos neutralizantes pelo método de neutralização viral (CPE-VNT). As amostras

recebidas consistiram em pacientes eletivos a doação de plasma convalescente e, pacientes receptores coletadas em diferentes tempos após a transfusão. As amostras foram coletadas nas unidades hospitalares e eram encaminhadas ao ICBII-USP duas vezes na semana. Biorrepositório CEPSH 028.216 sob o CAEE 39339920.1.0000.5467.

Amostragem utilizada na padronização do teste ELISA- IgG em amostra de sangue coletadas em papel filtro.

Para a padronização do ensaio de ELISA contra anticorpos IgG de SARS-CoV-2 utilizando sangue seco como material, foram coletadas 182 amostras de sangue capilar em papel filtro por meio de punção em um dos dedos das mãos. Concomitante, o sangue venoso desses mesmos pacientes foi coletado em tubo para coleta com ativador de coágulo para obtenção do soro. Foram incluídos neste trabalho adultos entre 18 e 90 anos que faziam parte da equipe médica e de suporte técnico dos hospitais parceiros. As amostras foram encaminhadas junto com a rotina diagnóstica recebida diariamente. Biorrepositório CEPSH 028.216 sob o CAEE 39339920.1.0000.5467.

Construção de um painel de amostras controles

Ao longo dos meses da pandemia de 2020 foi sendo construído um painel de amostras controles (verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativas) que foram utilizados ao longo da pandemia para padronização de diversos ensaios. Além disso, foram incluídas nesse painel 126 amostras de soro do repositório de amostras clínicas do LVCM dos anos de 2017, 2018 e 2019 confirmadas por RT-PCR em tempo real para outras doenças virais, dentre elas Sarampo, Zika, Dengue, CMV, Chikungunya e coronavírus sazonais. E 196 amostras de pessoas com diagnóstico negativo para os vírus respiratórios e exantemáticos testados no LVCM.

Ao longo do texto esse painel de amostras controle será citado com frequência. O esquema apresentado na Figura 17 mostra como esse painel de amostras controle foi dividido para a padronização dos testes. As amostras positivas foram divididas em

dois grupos, o primeiro com 189 amostras coletadas entre 0 e 12 dias após o teste de RT-PCR em tempo real e o segundo com 223 amostras coletadas na fase convalescente . O painel foi composto por um terceiro grupo formado por 322 amostras negativas. Ao todo o painel foi composto por 734 amostras.

Figura 16- Distribuição da amostragem utilizada. O esquema apresenta a origem e a quantidade de amostras utilizadas nas três principais frentes de trabalho apresentadas.

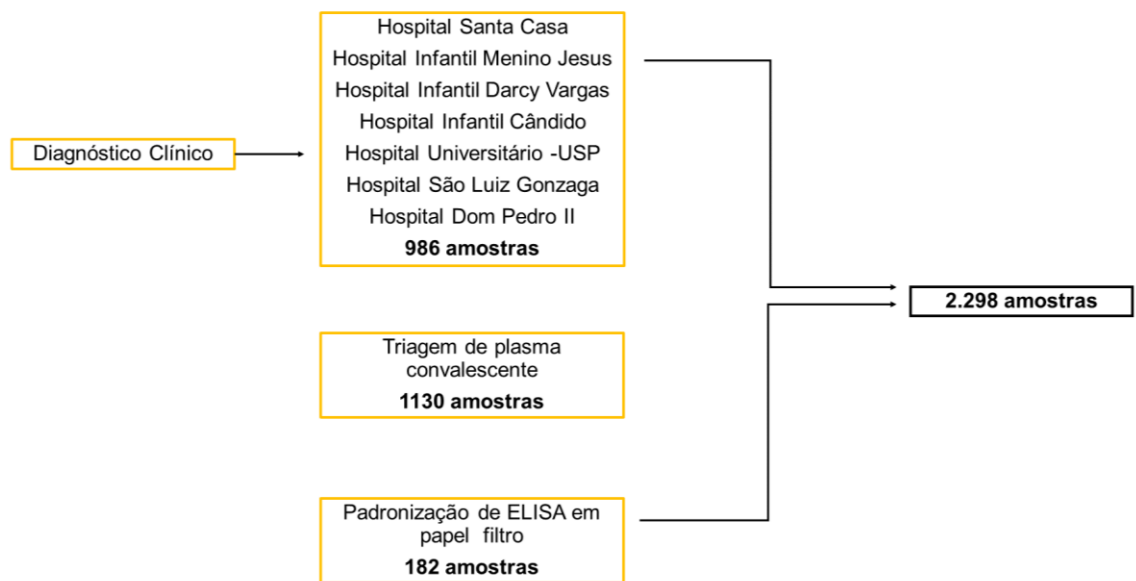
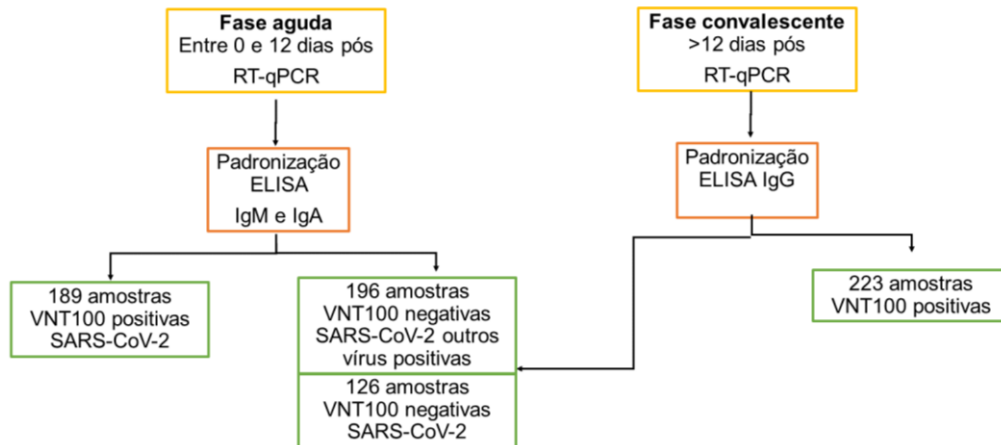


Figura 17- Distribuição do painel controle. Foram selecionadas 189 amostras com RT-PCR em tempo real e VNT positivas coletadas na fase aguda para comparação com o teste ELISA IgM e IgA e 223 amostras coletadas na fase convalescente para o ELISA IgG. Um único painel de amostras negativos foi utilizado.



2.3.2 Padronização do teste de ELISA qualitativo no soro humano utilizando o antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 (Fapon Biotech Inc., Dongguan, China), que corresponde a nucleoproteína viral, para detecção de anticorpos das classes IgM, IgA e IgG.

A solução de bloqueio e diluente da amostra foram desenvolvidas e padronizadas para utilização no teste de ELISA comercial ZIKA-V (Advagen Biotech, Ltda, Itú, Brasi) e são produzidos *in house* no laboratório. A composição das soluções utilizadas nos ensaios de ELISA está descrita no Apêndice 2. Todas as etapas de lavagem descritas foram realizadas em máquina de lavagem automatizada (Bio Tek, USA®).

Oito amostras do painel de amostras controles foram escolhidas para determinar a concentração de antígeno e diluição do soro humano.

Amostra 1: convalescente positiva para ELISA IgG com alto título de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 (>1:1280); amostra 2: convalescente positiva para ELISA IgG com baixo título de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 (1:160); amostra 3: fase aguda positivo para ELISA IgA com alto título de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 (>1:1280); amostra 4: fase aguda positivo para

ELISA IgA com baixo título de anticorpo neutralizantes para SARS-CoV-2 (1:160); amostra 5: fase aguda positivo para IgM com alto título de anticorpo neutralizantes para SARS-CoV-2 (>1:1280); amostra 6: fase aguda positivo para ELISA IgM com baixo título de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2(1:160); amostra 7: SARS-CoV-2 negativo para *real time* RT-PCR e ensaio de neutralização, amostra 8: SARS-CoV-2 negativo para *real time* RT-PCR e ensaio de neutralização e positivo para HKU por *real time* RT-PCR coletada na fase convalescente.

Placas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com 100ng, 200ng e 400ng da nucleoproteína comercial diluída em solução tampão carbonato/bicarbonato [0,05M, pH 9,6]. Para cada condição de concentração da proteína foram testadas duas diluições de soro humano, 1/50 e 1/100. Para a detecção foram utilizados anticorpos anti-humano das classes IgM, IgG e IgA, conjugados com a enzima peroxidase (Sigma).

As placas foram sensibilizadas com 100µL/poço das diferentes concentrações de proteína e incubadas à 37°C por 1h. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com solução de PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma, USA®) e secas em papel absorvente. Foram utilizadas 300µL/poço da solução de bloqueio e as placas foram incubadas à 37°C por 3h, seguido de quatro lavagens. As amostras de soro foram inativadas em banho seco à 56°C por 30 minutos antes do processo de diluição. Foram utilizadas 100µL de cada diluição em duplicata e as placas foram incubadas à 37°C por 1h. Foi utilizado 100uL somente do diluente como “branco”, para verificar qual o valor de densidade ótica em uma reação sem soro. Após o mesmo processo de lavagem foram adicionados 100µL/poço dos anticorpos secundários e suas respectivas diluição para cada condição. Após 1h de incubação à 37°C as placas foram lavadas novamente e 100µL da solução comercial TMB (Invitrogen®) foi acrescida. As placas foram incubadas por 10min ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 100µL de solução de ácido sulfúrico na concentração de 0,5M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de 450nm (Bio Tek, USA®).

2.3.3 Determinação da Sensibilidade e Especificidade do Teste de ELISA utilizando antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 (Fapon Biotech Inc., Dongguan, China) em soro humano para detecção de anticorpos IgM, IgA e IgG contra SARS-CoV-2.

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram determinados para cada classe de imunoglobulina por meio da realização de uma curva *ROC (Receiver Operating Characteristic)*. Para isso foram selecionados três painéis de amostras controles para o ensaio de ELISA utilizando a melhor condição estabelecida pelo teste de padronização (figura 4). Após a realização dos ensaios com a concentração de antígeno e diluições definidas, a curva foi construída utilizando o *software GraphPad Prism* versão 8. O ponto de corte (*cut off*) foi determinado levando em conta os maiores valores de sensibilidade e especificidade obtidos.

2.3.4 Ensaio de Repetibilidade e Reprodutibilidade Intraensaio do teste de ELISA

O mesmo painel de oito amostras controles foram selecionadas para os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intraensaio.

Para o ensaio de repetibilidade foi realizado 8 determinações para cada soro, pelo mesmo operador, mesma instrumentação e mesmo lote do antígeno e soluções. Para a avaliação da reprodutibilidade intraensaio foram realizadas 8 determinações para cada soro durante 3 dias consecutivos pelo mesmo operador, mesma instrumentação e mesmo lote do antígeno e soluções.

O coeficiente de variação das 8 determinações para cada amostra foi calculado utilizando a fórmula:

$$CV = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média experimental}} \times 100$$

2.3.5 Padronização ELISA utilizando sangue seco coletado em papel filtro contra a proteína N recombinante para detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2.

O teste de ELISA utilizando o papel de filtro foi desenvolvido em colaboração com o grupo coordenado pela Professora Dra. Ana Paula Salles Moura da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), com a qual foi adquirido o antígeno recombinante, que corresponde a nucleoproteína do SARS-CoV-2.

Placas de 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com 100µL/poço de antígeno na concentração de 2 µg/uL diluídas em tampão carbonato/bicarbonato [0,05M, pH 9,6]. Após incubação de 1h a 37°C as placas foram lavadas 4 vezes com solução de PBS 1x acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma, USA®) e bloqueadas com 300µL de solução de bloqueio. Após incubação por 3h à 37°C, as placas foram lavadas e secas com batidas leves em papel absorvente.

O papel filtro contendo três gotas de sangue seco foram cortados em círculos com perfurador no tamanho de 6mm de diâmetro. Em uma placa de 96 poços para diluição os papeis foram eluidos *overnight* à 4°C em 200µL solução de PBS 1x. Antes da diluição o eluato foi ressuspendido por pipetagem cerca de 20 vezes. Em seguida foi realizada uma diluição de 1:10 na solução diluente da amostra. Foram pipetados 100µL/poço de cada diluição em duplicata, seguido de incubação por 1h à 37°C. Após a incubação as placas foram lavadas novamente e 100µL de anticorpo anti-IgG humano conjugado com a enzima peroxidase diluído 1:4000 na solução diluente da amostra foram pipetados. Após a incubação de 1h a 37°C as placas foram lavadas e 100µL da solução TMB foi adicionada. A reação foi parada após 10min de reação com 100µL de solução de ácido sulfúrico à 0,5M. As placas foram lidas imediatamente em espectrofotômetro em 450nm (Bio Tek, USA®).

2.3.6 Diagnóstico clínico e triagem de pacientes utilizando o método de ELISA indireto contra o antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 para detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA.

O teste de ELISA utilizando o antígeno comercial nCoV-PS-Ag7 foi empregado no diagnóstico de 986 amostras oriundas dos hospitais parceiros e na triagem de 1130 pacientes e doares de plasma convalescente.

Devido ao volume de amostras recebidos semanalmente no laboratório o processamento foi realizado com extremo rigor. Diariamente no momento do recebimento as amostras foram cadastradas numa planilha e receberam um número com a sigla SOCOV (Sorologia SARS-CoV-2). No laboratório de nível 2, os tubos de criopreservação foram etiquetados e 2mL de soro foram transferidos após a centrifugação do sangue por 10min à 2500rpm/22°C. As amostras foram armazenadas à -20°C até a realização dos ensaios. Os resultados foram liberados para cada hospital em no máximo 7 corridos após o recebimento, em algumas excepcionalidades a pedido do hospital, o resultado foi emitido em 48 horas após o recebimento.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Resultado Padronização das condições do ELISA anti nucleoproteína (nCoV-PS-Ag7) para detecção dos anticorpos da classe IgM, IgA e IgG.

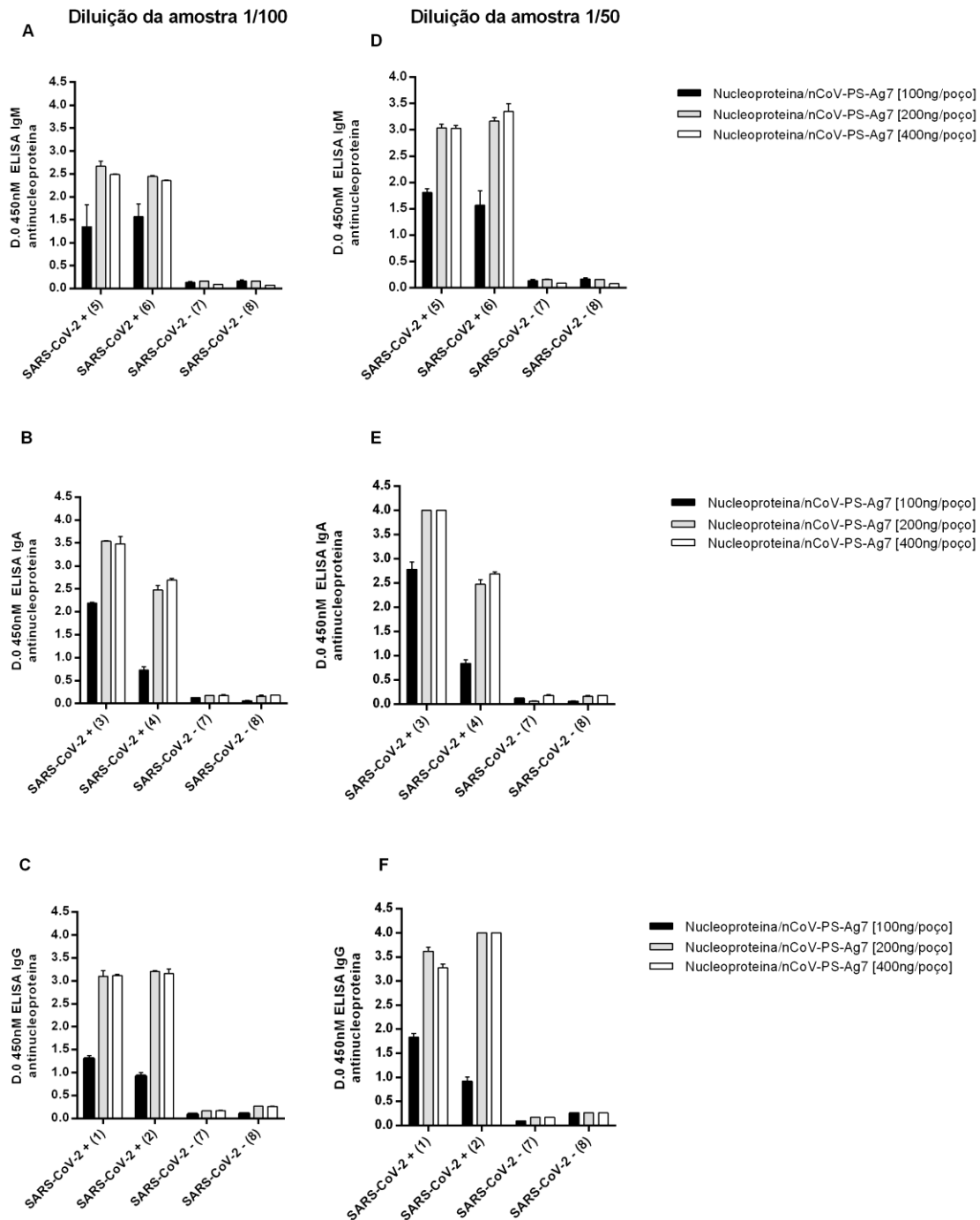
Para a obtenção de um teste de ELISA indireto que fosse capaz de detectar anticorpos contra o SARS-CoV-2 no soro humano foi primeiramente testadas diferentes concentrações de antígenos (100ng/poço, 200/poço e 400ng/poço). Cada quantidade foi testada com duas diluições da amostra de soro (1/50 e 1/100) para cada classe de anticorpo.

Para todas as classes de anticorpos a quantidade de 200ng/poço foi a que apresentou maior densidade ótica dos controles positivos sem provocar um aumento dos valores dos controles negativos. O aumento da quantidade de antígeno para 400ng/poço não apresentou aumento significativo quando comparado com 200ng/poço. Como esperado, a diluição de 1/50 do soro também apresentou maior densidade ótica do que a diluição 1/100. Nas amostras negativas esse aumento não foi expressivo, mas foi observado na Amostra 18 (controle negativo). Dessa forma estabelecemos as condições descritas na Tabela 5 para dar continuidade aos ensaios de padronização.

Tabela 5- Parâmetros utilizados para o teste ELISA com antígeno Ag7 Nucleoproteína SARS-COV2

Parâmetro	Condição		
	IgM	IgG	IgA
Sensibilização	2µg/µL	2µg/µL	2µg/µL
Placas de poliestireno	Costar 2596	Costar 2596	Costar 2596
Bloqueio	300µl/poço – 3h à 37°C	300µl/poço – 3h à 37°C	300µl/poço – 3h à 37°C
Diluição da amostra	1/50	1/100	1/50
Diluição do conjugado	1/3000	1/4000	1/3000
Tempo de cromógeno	10min	10min	10min

Figura 18- Avaliação da quantidade de antígeno e diluição do soro. A, B e C, comparação da quantidade de antígeno por poço na diluição 1/50 dos controles positivos e negativos para IgM, IgA e IgG, respectivamente. D, E e F, mesma comparação na diluição 1/100 dos controles. Foi determinado 200µg/poço de antígeno para todas as imunoglobulinas devido a maior a detecção (D.O) e diluição 1/50 para IgM e IgA e 1/100 para IgG.



2.4.2 Resultados de sensibilidade, especificidade e ponto de corte (*cut off*) para o teste de ELISA indireto contra SARS-CoV-2 no soro utilizando o antígeno.

A figura 19 apresenta as curvas ROC construídas a partir dos valores de absorbância das amostras positivas e negativas, bem como os índices de reatividade das amostras. O teste IgG apresentou a melhor performance dentre as três imunoglobulinas, com sensibilidade de 97.2% [95.4 -98.5] e especificidade 96.5%

[93.9 -98.2] (Tabela 6). O ponto de corte foi determinado com base nos melhores valores de ambos os parâmetros (sensibilidade e especificidade) obtidos por meio da curva. A partir deste uma amostra foi considerada positiva para valores acima do *cut off* e negativas abaixo do *cut off*. Todas as reações incluíam as amostras controles utilizadas para os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.

Dentre as amostras que apresentaram reatividade cruzada com a nucleoproteína recombinante de SARS-CoV-2, algumas apresentaram altos valores de absorbância. Todas essas amostras foram coletadas entre 2017 e 2018 e não eram positivas para nenhum vírus testado no LVCM. Dentre essas amostras, 1 única reagiu para duas imunoglobulinas (IgG e IgA).

Figura 19- Curvas Roc obtidas da comparação entre o teste *gold standart* VNT₁₀₀ e o ELISA IgM, IgA e IgG e índice de reatividade.

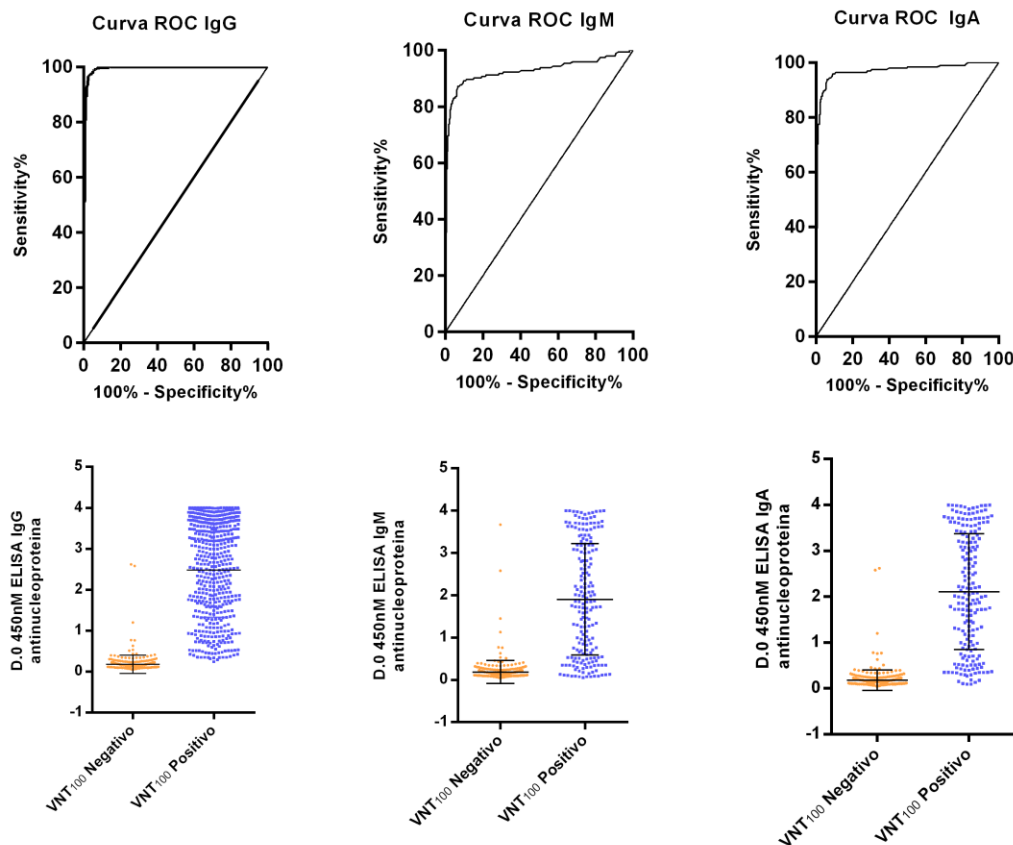


Tabela 6- Sensibilidade e especificidade do ELISA IgM, IgA e IgG comparados com o teste VNT100

Parâmetros	IgM	IgA	IgG
Sensibilidade [95% CI]	81.6 [79.9 -90.2]	93.8 [89.5 -96.7]	97.2 [95.4 -98.5]
Especificidade [95% CI]	94.1 [90.9 -96.4]	94.1 [90.9 -96.4]	96.5 [93.9 -98.2]
Valor preditivo positivo	93.7 [91.8 -97.5]	93.2 [90.4 -97.9]	95.8 [92.6 -98.7]
Valor preditivo negativo	80.2 [76.4 -89.5]	92.9 [88.7-97.4]	97.1 [94.8 -98.4]
<i>Likelihood ration</i>	14.5	15.9	28.4
Valor do <i>cut off</i>	0.346	0.341	0.400

2.4.3 Resultado ensaio de reprodutibilidade e repetibilidade

Os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados devido a importância da rotina diagnóstica que foi estabelecida. Dessa forma, foi de extrema importância entender as variações que os controles sofriam e assim poder realizar um teste em simplicata, poupando tempo e material. Ambos os ensaios foram realizados em um mesmo momento, sendo o teste de repetibilidade correspondendo ao 1º dia do teste de reprodutibilidade. As tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados do teste de repetibilidade para IgG, IgA e IgM, respectivamente. Nas amostras positivas os coeficientes de variação foram menores em relação as amostras negativas que mesmo com alguns valores elevados, não ultrapassaram o limite de 20% estabelecido no laboratório. As tabelas 10, 11 e 12 apresentam os valores de D.O obtidos no teste de reprodutibilidade para IgG, IgA e IgM, respectivamente. Da mesma forma, o coeficiente de variação das amostras negativas foi maior, mas inferior a 20%. Assim determinamos que os testes eram reproduziam e deveriam conter as 4 amostras em todos os ensaios.

Tabela 7- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgG no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles

Teste	Amostra 1 SARS-CoV-2 IgG +	Amostra 2 SARS-CoV-2 IgG +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgG-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgG-
1	3.82	2.259	0.156	0.195
2	3.756	2.376	0.190	0.211

3	3.98	2.254	0.187	0.276
4	3.85	2.310	0.202	0.207
5	3.79	2.211	0.143	0.212
6	3.65	2.411	0.169	0.210
7	3.798	2.109	0.189	0.218
8	3.723	2.267	0.141	0.237
Média	3.795	2.263	0.166	0.220
DP	0.090	0.088	0.026	0.023
CV (%)	2.3%	3.88%	15.8%	10.7%

DP – desvio padrão

CV (%) – porcentagem coeficiente de variação

Tabela 8- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgA no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles

Teste	Amostra 3 SARS-CoV-2 IgA +	Amostra 4 SARS-CoV-2 IgA +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgA-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgA-
1	2.32	1.059	0.11	0.208
2	2.556	1.174	0.076	0.194
3	2.49	1.23	0.087	0.224
4	2.355	1.172	0.109	0.205
5	2.391	1.232	0.090	0.206
6	2.405	1.311	0.102	0.276
7	2.37	1.217	0.092	0.209
8	2.323	1.304	0.079	0.188
Média	2.401	1.212	0.093	0.213
DP	0.077	0.075	0.01	0.025
CV(%)	3.2%	6.2%	12.9%	11.9%

DP – desvio padrão

CV(%) – porcentagem coeficiente de variação

Tabela 9- Resultado do ensaio de repetibilidade para o teste de IgM no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles.

Réplicas	Amostra 5 SARS-CoV-2 IgM +	Amostra 6 SARS-CoV-2 IgM +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgM-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgM-
1	2.541	0.867	0.077	0.06
2	2.983	0.754	0.055	0.087
3	3.022	0.812	0.076	0.1
4	2.342	0.819	0.109	0.079
5	2.670	0.724	0.101	0.101
6	2.767	0.97	0.103	0.069
7	2.457	0.766	0.105	0.098
8	2.865	0.865	0.087	0.096
Média	2.67	0.822	0.089	0.086
DP	0.231	0.073	0.017	0.014
CV(%)	8.6%	8.9%	19.7%	16.7%

DP – desvio padrão

CV(%) – porcentagem coeficiente de variação

Tabela 10- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgG no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra realizados em 3 dias consecutivos. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles.

Dia	Réplicas	Amostra 1 SARS-CoV-2 IgG +	Amostra 2 SARS-CoV-2 IgG +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgG-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgG-
1	1	3.76	2.345	0.180	0.207
	2	3.87	2.376	0.178	0.221
	3	3.98	2.212	0.185	0.203
	4	3.723	2.354	0.174	0.203
	5	3.712	2.411	0.172	0.209
	6	3.812	2.398	0.198	0.212
	7	3.765	2.333	0.199	0.216

	8	3.712	2.210	0.167	0.213
2	1	3.97	2.219	0.187	0.198
	2	3.956	2.31	0.134	0.232
	3	3.865	2.398	0.1837	0.276
	4	3.823	2.297	0.120	0.298
	5	3.86	2.338	0.126	0.286
	6	3.721	2.345	0.134	0.312
	7	3.976	2.41	0.198	0.200
	8	3.903	2.287	0.187	0.287
3	1	3.76	2.198	0.109	0.312
	2	3.68	2.20	0.114	0.298
	3	3.679	2.212	0.13	0.236
	4	3.81	2.231	0.165	0.387
	5	3.799	2.39	0.134	0.287
	6	3.87	2.229	0.164	0.212
	7	3.890	2.341	0.178	0.256
	8	3.756	2.319	0.190	0.24
Média		3.818	2.306	0.162	0.250
DP		0.093	0.073	0.028	0.048
CV(%)		2.4%	3.1%	17.2%	19.2%

DP – desvio padrão

CV(%) – porcentagem coeficiente de variação

Tabela 11- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgA no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra realizados em 3 dias consecutivos. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles.

Dia	Réplicas	Amostra 3 SARS-CoV-2 IgA +	Amostra 4 SARS-CoV-2 IgA +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgA-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgA-
1	1	2.186	1.21	0.117	0.225
	2	2.075	1.1	0.103	0.23
	3	2.086	1.03	0.133	0.254

	4	2.327	1.318	0.12	0.227
	5	2.178	1.114	0.116	0.208
	6	2.241	1.147	0.117	0.207
	7	2.086	1.282	0.112	0.218
	8	2.015	1.127	0.148	0.217
2	1	2.340	1.073	0.19	0.215
	2	2.312	1.158	0.17	0.231
	3	2.293	1,108	0.122	0.229
	4	2.39	1.28	0.126	0.212
	5	2.512	1.065	0.119	0.224
	6	2.252	1.009	0.109	0.209
	7	2.471	1.02	0.103	0.221
	8	2.437	1.076	0.15	0.23
3	1	2.193	1.275	0.11	0.246
	2	2.139	1.282	0.125	0.249
	3	2.004	1.237	0.117	0.252
	4	2.217	1.206	0.117	0.242
	5	2.27	1.253	0.102	0.217
	6	2.015	1.248	0.119	0.23
	7	2.009	1.337	0.107	0.236
	8	2.121	1.286	0.123	0.223
Média		2.215	1.172	0.123	0.227
DP		0.147	0.095	0.020	0.013
CV(%)		6.6%	8.1%	16.7%	5.9%

DP – desvio padrão

CV(%) – porcentagem coeficiente de variação

Tabela 12- Resultado do ensaio de reprodutibilidade para o teste de IgM no soro. Média e desvio padrão obtidos a partir das 8 réplicas para cada amostra realizados em 3 dias consecutivos. Coeficiente de variação inferior a 20% para todos os controles.

Dia	Réplicas	Amostra 5 SARS-CoV-2 IgM +	Amostra 6 SARS-CoV-2 IgM +	Amostra 7 SARS-CoV-2 IgM-	Amostra 8 SARS-CoV-2 IgM-
1	1	2.667	0.902	0.108	0.089
	2	2.402	0.843	0.099	0.097
	3	2.363	0.883	0.086	0.1
	4	2.456	0.842	0.084	0.088
	5	2.267	0.896	0.087	0.084
	6	2.24	0.931	0.083	0.086
	7	2.242	0.906	0.095	0.074
	8	2.235	0.957	0.099	0.079
2	1	2.24	0.803	0.113	0.123
	2	2.29	0.808	0.113	0.169
	3	2.087	0.826	0.098	0.107
	4	2.171	0.820	0.099	0.136
	5	2.146	0.81	0.086	0.124
	6	2.008	0.856	0.096	0.12
	7	2.29	0.906	0.075	0.105
	8	2.24	0.803	0.089	0.111
3	1	2.355	0.781	0.091	0.102
	2	2.262	0.923	0.081	0.132
	3	2.134	0.981	0.1	0.126
	4	2.266	0.93	0.082	0.132
	5	2.03	0.829	0.092	0.12
	6	2.364	0.848	0.082	0.1
	7	2.184	0.755	0.085	0.131
	8	2.254	0.711	0.096	0.121
Média		2.254	0.856	0.092	0.110
DP		0.136	0.064	0.009	0.021
CV(%)		6%	7.5%	10.6%	19.6%

DP – desvio padrão

CV(%) – porcentagem coeficiente de variaçã

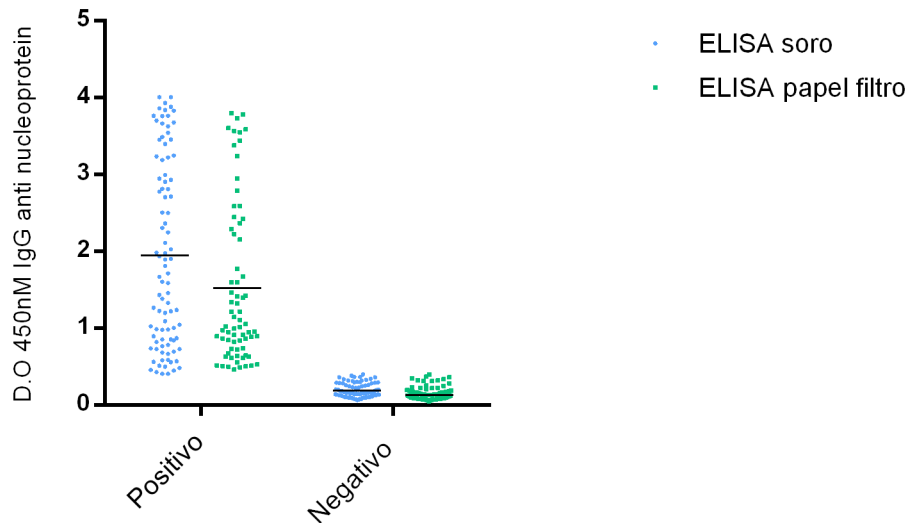
2.4.4 Padronização ELISA utilizando sangue seco coletado em papel filtro contra a proteína N recombinante produzida nacionalmente para detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2.

A tabela 13 apresenta o resultado da comparação entre o teste IgG em papel de filtro com o teste de ELISA no soro. O ensaio apresentou bons valores de sensibilidade 99,4% [96,9%-99,9%] e de especificidade 85,3% [75,8%-92,2%]. Apesar da diluição final de 1:2000 (diluição realizada com o papel filtro seguida de diluição do eluato) as amostras não apresentaram uma diminuição drástica da reatividade comparada ao índice de reatividade do soro (figura 20). No entanto amostras com valores próximos aos *cut off* não foram identificadas pelo teste, sendo consideradas falso negativas.

Tabela 13- Sensibilidade e especificidade para o teste ELISA IgG no papel filtro em comparação ao teste ELISA no soro.

ELISA IgG papel filtro	ELISA IgG soro	
	Positivo (Ct<40)	Negativo (Ct>40)
Positivo	70	1
Negativo	12	181
Sensibilidade [95% IC]	85,3% [75,8%-92,2%]	
Especificidade [95% IC]	99,4% [96,9%-99,9%]	
Valor Preditivo Positivo [95%IC]	98,5% [92,4%- 99,9%]	
Valor Preditivo Negativo [95%IC]	93,7% [89,3%- 96,7%]	
Likelihood ratio	155,4	

Figura 20- Comparação do índice de reatividade entre as amostras de soro (azul) e coletas em papel filtro (verde).



2.5 DISCUSSÃO

Padronizamos em curto período um ensaio de ELISA para detectar as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM contra o SARS-CoV-2 a partir de uma única diluição do soro utilizando 20 microlitros de amostra. Os altos valores de sensibilidade e especificidade aliados a boa performance nos testes de reprodutibilidade, nos permitiram diagnosticar e triar uma grande quantidade de amostras semanalmente.

Os testes IgA e IgM, apresentaram bons valores de sensibilidade quando comparamos com a literatura, no entanto tivemos um viés amostral no grupo de amostras de fase aguda. A maioria das amostras que obtivemos para realizar a curva ROC para IgA e IgM foram de pacientes em estado grave oriundos dos hospitais das Clínicas de São Paulo, Hospital Israelita A. Einstein e Hospital Sírio Libanês. Como descrito na literatura pacientes graves apresentam perfil de resposta com altos índices de anticorpos de fase aguda, diferente de pacientes considerados moderados e leves^{34,35}. Isso fez com que adotássemos cautela na aplicação dos testes de IgM e IgA na população que recebemos ao longo de 2020 e 2021 e nos resultados disponibilizados para os hospitais parceiros.

O diagnóstico de ELISA juntamente com a dosagem de anticorpos neutralizantes pelo ensaio de VNT₁₀₀ foi um pilar importante para construção de um

banco de bolsas de plasma pelos HC, HIAE e HSL. Essas bolsas foram distribuídas pelo país para a rede pública e privada, atendendo pacientes que se enquadravam nos critérios para receber o plasma convalescente como tratamento. Em muitos casos a transfusão pôde melhorar o prognóstico de pacientes em um momento que não havia vacina disponível^{36,37}.

O teste de ELISA IgG também foi importante para o diagnóstico de síndromes tardias como a síndrome inflamatória multissistêmica associada ao Covid-19, uma condição rara que afeta crianças e pode comprometer diversos órgãos, necessitando de internação hospitalar³⁸, apesar de grave os pacientes apresentam melhor após o atendimento médico adequado. Além disso, o teste de ELISA IgG permitiu acompanhar os níveis de anticorpos ao longo do tempo em pacientes vacinados com diferentes formulações vacinais permitindo o desenvolvimento de diferentes pesquisas realizadas no LVCM a partir de 2021³⁹.

A padronização do teste de ELISA a partir de amostras de sangue seco foi um trabalho em parceria a UFMG. A padronização em amostras clínicas bem caracterizadas demonstrou o reconhecimento de anticorpos contra a nucleoproteína recombinante de SARS-CoV-2 produzida nacionalmente. Além disso, o teste de comparação entre soro e sangue seco também foi um passo inicial importante para aquisição de um teste cuja etapa de coleta poderia ser simplificada e mais barata. A diluição de 1/2000 teve um impacto significativo no valor de sensibilidade 85,3% [75,8%-92,2%], pois as amostras consideradas positivas, mas com índice de reatividade próximos ao valor de *cut off* não foram detectadas no ensaio. A criação de uma zona indeterminada seria uma medida adotada de extrema importância para a discriminação desse tipo de amostra.

Outro aspecto importante das plataformas de ELISA é a realização do ensaio em laboratório de nível 2. Os testes de neutralização viral, como VNT₁₀₀ e PRNT são conduzidos em laboratório de nível 3 para SARS-CoV-2 pois, nesses ensaios são utilizadas partículas virais viáveis, o que não ocorre nos ensaios de ELISA. Além disso, a viremia pode ocorrer em infecções por SARS-CoV-2 no entanto, a carga viral é geralmente baixa⁴⁰ e, todas as amostras de soro são inativadas para condução de ensaios de ELISA.

O diagnóstico sorológico se mostrou uma ferramenta extremamente importante na emergência provocada pela pandemia e continua sendo uma ferramenta importante na pesquisa mesmo com disponibilidade de vacinas contra SARS-CoV-2.

2.6 CONCLUSÕES

Os objetivos foram alcançados visto a situação emergencial da pandemia e foi possível obter as seguintes conclusões:

- Obtivemos um ensaio de ELISA contra IgG/IgA/IgM utilizando uma nucleoproteína recombinante comercial com uma ótima performance para ser aplicado a rotina diagnóstica, principal o ensaio anti-IgG
- Foi fornecido suporte no diagnóstico sorológico para 7 hospitais públicos da cidade de São Paulo.
- O ensaio de ELISA foi um pilar importante na triagem de doares e receptores de plasma convalescente.
- Obtivemos um teste de ELISA capaz de detectar imunoglobulinas IgG em amostra de sangue capilar coletadas em papel filtro com sensibilidade de 85,3% [75,8%-92,2%] e especificidade de 99,4% [96,9%-99,9%].

2.7 REFERÊNCIAS

- 1- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382: 727–733. doi:10.1056/NEJMoa2001017

- 2- Araujo, Danielle Bastos, Rafael Rahal Guaragna Machado, Deyvid Emanuel Amgarten, Fernanda de Mello Malta, Gabriel Guarany de Araujo, Cairo Oliveira Monteiro, Erika Donizetti Candido, et al. 2020. “SARS-CoV-2 Isolation from the First Reported Patients in Brazil and Establishment of a Coordinated Task Network.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 115 (October): e200342.

- 6- “Coronavirus (COVID-19) Dashboard”. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 10 ago. 2021

- 7 – Ventura D, Aith F, Reis R. Crimes Against humanity in Brazil’s COVID-19 responde- a lesson to us all *BMJ* 202; 375 :n2625 doi: 10.1136/bmj.n2625

- 8- SENADO FEDERAL. Senado Federal. Atividade Legislativa. São Paulo, SP. 2021. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2021/10/20/cpi-da-pandemia-principais-pontos-do-relatorio> . Acesso em: 16 nov. 2021.

- 9- Nunes, J. (2022). Neglect and Resistance in Brazil’s Pandemic. *Current History*, 121(832), 50-56.
- 10- WORLD HEALTH ORGANIZAÇÃO. WHO. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2). São Paulo, SP. 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1 . Acesso em 15 out.2021

- 11- Cyranoski, David. 2017. “Bat Cave Solves Mystery of Deadly SARS Virus - and Suggests New Outbreak Could Occur.” *Nature* 552 (7683): 15–16.

- 13- Azhar, E. I., El-Kafrawy, S. A., Farraj, S. A., Hassan, A. M., Al-Saeed, M. S., Hashem, A. M., & Madani, T. A. (2014). Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 370(26), 2499-2505.

- 14- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). São Paulo, SP. 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1 . Acesso em 20 nov. 2021.

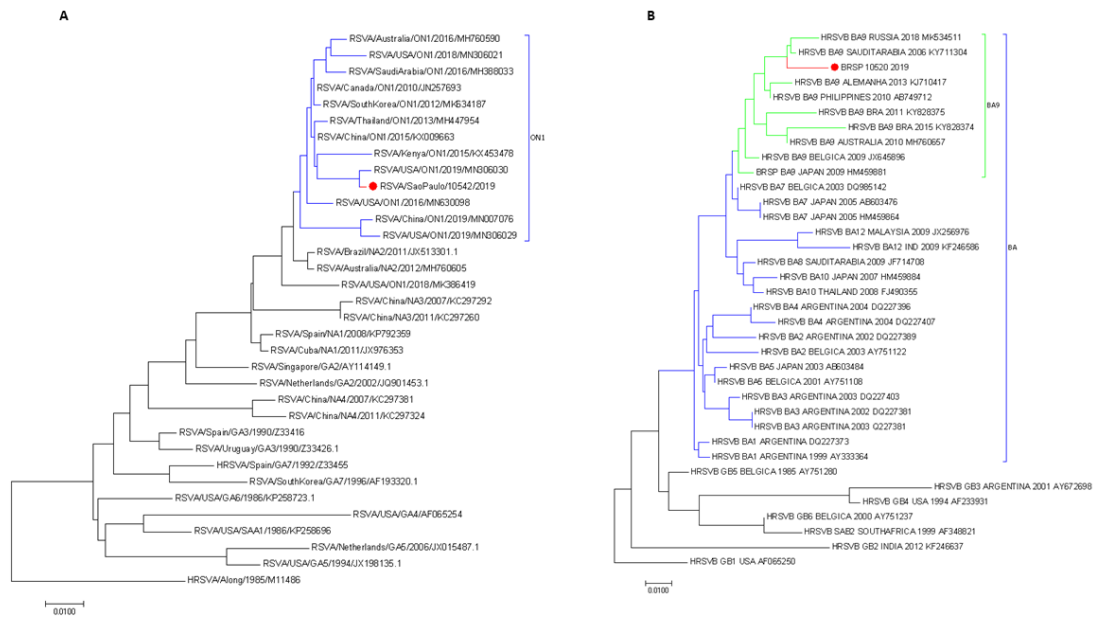
- 15- Ijaz, M. K., A. H. Brunner, S. A. Sattar, R. C. Nair, and C. M. Johnson-Lussenburg. 1985. "Survival Characteristics of Airborne Human Coronavirus 229E." *The Journal of General Virology* 66 (Pt 12) (December): 2743–48
- 16- Moriyama, Miyu, Walter J. Hugentobler, and Akiko Iwasaki. 2020. "Seasonality of Respiratory Viral Infections." *Annual Review of Virology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012420-022445>.
- 17-INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. ICVT. Taxonomy. São Paulo, SP. 2021. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> . Acesso em 15 out. 2021.
- 18- V'kovski, Philip, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder, and Volker Thiel. 2021. "Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- 19- Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, 7(6), 439-450.
- 20- Mariano, Giuseppina, Rebecca J. Farthing, Shamar L. M. Lale-Farjat, and Julien R. C. Bergeron. 2020. "Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be." *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (December): 605236
- 21- Huang, Yuan, Chan Yang, Xin-Feng Xu, Wei Xu, and Shu-Wen Liu. 2020. "Structural and Functional Properties of SARS-CoV-2 Spike Protein: Potential Antivirus Drug Development for COVID-19." *Acta Pharmacologica Sinica* 41 (9): 1141–49.
- 22- Wu, Canrong, Yang Liu, Yueying Yang, Peng Zhang, Wu Zhong, Yali Wang, Qiqi Wang, et al. 2020. "Analysis of Therapeutic Targets for SARS-CoV-2 and Discovery of Potential Drugs by Computational Methods." *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 10 (5): 766–88
- 23- Wrapp, Daniel, Nianshuang Wang, Kizzmekia S. Corbett, Jory A. Goldsmith, Ching-Lin Hsieh, Olubukola Abiona, Barney S. Graham, and Jason S. McLellan. 2020. "Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation." *bioRxiv : The Preprint Server for Biology*, February. <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.944462>.
- 24- Harvey, W.T., Carabelli, A.M., Jackson, B. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* **19**, 409–424 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- 25- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Covid-19. São Paulo, SP. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> . Acesso em: 20 agosto 2021.

- 26- Nascimento, Danilo Alves do, and Iara Gomes Vasconcelos. 2020. "Mapeamento da produção científica sobre COVID-19." *InterAmerican Journal of Medicine and Health* 3 (July). <https://doi.org/10.31005/iajmh.v3i0.134>.
- 27- Kashte, Shivaji, Arvind Gulbake, Saadiq F. El-Amin Iii, and Ashim Gupta. 2021. "COVID-19 Vaccines: Rapid Development, Implications, Challenges and Future Prospects." *Human Cell* 34 (3): 711–33.
- 28- Feikin, Daniel R., Melissa M. Higdon, Laith J. Abu-Raddad, Nick Andrews, Rafael Araos, Yair Goldberg, Michelle J. Groome, et al. 2022. "Duration of Effectiveness of Vaccines against SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Disease: Results of a Systematic Review and Meta-Regression." *The Lancet* 399 (10328): 924–44.
- 29- Caires, Luzia. Vacinas são um sucesso, mas vírus ainda desafia nossa imunidade. Como vamos responder? *Jornal da USP*. São Paulo, SP, 10 de fevereiro de 2022. Ciências. Disponível em : <https://jornal.usp.br/ciencias/vacinas-sao-um-sucesso-mas-virus-ainda-desafia-nossa-imunidade-como-vamos-responder/> . Acesso em: 21 de mar. 2022.
- 30- Carraturo, Federica, Carmela Del Giudice, Michela Morelli, Valeria Cerullo, Giovanni Libralato, Emilia Galdiero, and Marco Guida. 2020. "Persistence of SARS-CoV-2 in the Environment and COVID-19 Transmission Risk from Environmental Matrices and Surfaces." *Environmental Pollution* 265 (Pt B): 115010.
- 31- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Covid-19. São Paulo, SP. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> . Acesso em: 21 agosto 2021.
- 32- MINISTÉRIO DA SAÚDE. OpenDataSUS. Conjunto de Dados. São Paulo, SP. 2021. Disponível em: <https://opendatasus.saude.gov.br/dataset/srag-2021-e-2022> . Acesso em 20 out. 2022.
- 33- Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.

- 34-Sterlin, Delphine, Anouk Malaussena, and Guy Gorochov. 2021. “[IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 virus].” *Medecine sciences: M/S* 37 (11): 968–70.
- 35- Forthal, Donald. 2021. “Adaptive Immune Responses to SARS-CoV-2.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.009>.
- 36-Wendel, Silvano, Rita Fontão-Wendel, Roberta Fachini, Gabriela Candelaria, Patricia Scuracchio, Ruth Achkar, Mayra Brito, et al. 2021. “A Longitudinal Study of Convalescent Plasma (CCP) Donors and Correlation of ABO Group, Initial Neutralizing Antibodies (nAb), and Body Mass Index (BMI) with nAb and Anti-Nucleocapsid (NP) SARS-CoV-2 Antibody Kinetics: Proposals for Better Quality of CCP Collections.” *Transfusion* 61 (5): 1447–60.
- 37- Wendel, Silvano, Jose Mauro Kutner, Rafael Machado, Rita Fontão-Wendel, Carolina Bub, Roberta Fachini, Ana Yokoyama, et al. 2020. “Screening for SARS-CoV-2 Antibodies in Convalescent Plasma in Brazil: Preliminary Lessons from a Voluntary Convalescent Donor Program.” *Transfusion* 60 (12): 2938–51.
- 38- Paulis, Milena De, Milena De Paulis, Danielle Bruna Leal Oliveira, Rodolfo P. Vieira, Isabella Coutinho Pinto, Rafael Rahal Guaragna Machado, Mariana Pauferro Cavalcanti, et al. 2020. “Multisystem Inflammatory Syndrome Associated With COVID-19 With Neurologic Manifestations in a Child: A Brief Report.” *Pediatric Infectious Disease Journal*. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002834>.
- 39- Ortega, Marina Mazzilli, Laís Teodoro da Silva, Érika Donizetti Candido, Yingying Zheng, Bruna Tiaki Tiyo, Arthur Eduardo Fernandes Ferreira, Simone Corrêa-Silva, et al. 2022. “Salivary, Serological, and Cellular Immune Response to the CoronaVac Vaccine in Health Care Workers with or without Previous COVID-19.” *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14283-x>.
- 40- Peng, Liang, Jing Liu, Wenxiong Xu, Qiumin Luo, Dabiao Chen, Ziyang Lei, Zhanlian Huang, et al. 2020. “SARS-CoV-2 Can Be Detected in Urine, Blood, Anal Swabs, and Oropharyngeal Swabs Specimens.” *Journal of Medical Virology* 92 (9): 1676–80.

APÊNDICE 1. Árvores filogenéticas RSVa e RSVB.

Árvores construídas utilizando o software MEGA após sequenciamento pelo método de SANGER dos isolados virais descritos no item 1.4.3.



APÊNDICE 2- Composição das soluções utilizados nos ensaios de ELISA

Solução	Reagentes	Peso (g)/Volume(mL)
Solução de Bloqueio	PBS 1x (Tampão Fosfato-Salina)	1000mL
	Tween 20	0,5mL
	Lisina	10g
	Manitol	10g
	Kathon	0,5mL
Solução Diluente da Amostra	Tampão Tris-EDTA	12,1g
	Caseína	20g
	Tween 20	2mL
	Cloreto de Sódio (NaCl)	29,22g
	EDTA	3,72g
	Kathon	0,5mL
	Corante Brilliant Blue	4mg
Tampão Carbonato	Água destilada	q.s.p. 1000ml
	Carbonato de Sódio (Na ₂ CO ₃)	1,59g
	Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	2,39g

	Água destilada	q.s.p. 1000ml
Solução de Lavagem	Cloreto de Sódio (NaCl)	160g
	Cloreto de Potássio (KCl)	4,0g
	Fosfato Dissódico (Na ₂ HPO ₄)	28,8g
	Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄)	4,8g
	Tween 20	10 ml
	Kathon	0,5ml (0,05%)
	Água destilada	q.s.p. 1000ml