

ENSAIO DE PRECISÃO PARA CALIBRAÇÃO DE ENSAIO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DE SARS-COV-2

Bianca Sampaio Dotto Fiuza¹; Antônio Márcio Santana Fernandes²; Vinícius Pinto Costa Rocha²; Bruna Aparecida Souza Machado²

¹Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial B; Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq; bianca.fiuza@fbter.org.br

²Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador - BA; brunam@fieb.org.br

RESUMO

O Comitê de Especialistas em Padronização Biológica da OMS desenvolveu o primeiro Padrão Internacional da OMS e Painel de Referência Internacional para imunoglobulina anti-SARS-CoV-2 em dezembro de 2020. O objetivo dos Padrões Internacionais de Anticorpos da OMS é fornecer um padrão de referência mundial para calibrar preparações de referência nacionais ou padrões secundários. As descobertas de ensaios (como a resposta de anticorpos neutralizantes a potenciais vacinas contra a COVID-19) realizados em vários países podem ser mais facilmente comparadas graças à calibração. Prevê-se que a utilização destes padrões promova o conhecimento da resposta imunitária, em particular os correlatos de proteção. Com isso, o objetivo deste trabalho foi padronizar a calibração do ensaio de anticorpos neutralizantes com a utilização de soro padrão recomendado pela OMS (padrão NIBSC).

PALAVRAS-CHAVE: SARS-CoV-2; anticorpos neutralizantes; COVID-19, vacina.

1. INTRODUÇÃO

O coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) foi a fonte da pandemia de COVID-19.¹ A criação e utilização de vacinas contra o SARS-CoV-2 diminuíram enormemente os efeitos da pandemia da COVID-19 à escala local e mundial.² A imunogenicidade de várias vacinas candidatas contra a COVID-19 varia, o que torna a comparação difícil.³ Os desenvolvedores de vacinas avaliam as respostas imunológicas após a imunização usando uma variedade de imunoenaios com leituras variada.⁴ O nível de anticorpos neutralizantes é um biomarcador útil para a correlação de proteção contra a infecção por SARS-CoV-2.⁵ No entanto, é um desafio identificar a concentração precisa de anticorpos neutralizantes necessários para a proteção e fazer comparações com outras pesquisas recentes, uma vez que os ensaios utilizados para relatar os resultados destes estudos não foram calibrados utilizando um padrão de referência.⁶

O primeiro Padrão Internacional para imunoglobulina anti-SARS-CoV-2 da Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolvido em dezembro de 2020, visa unificar a avaliação da resposta imune humoral após uma vacina ou infecção espontânea.⁷ Com isso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer padrões para a calibração dos testes de anticorpos neutralizantes usando o soro padrão recomendado pela OMS.

2. METODOLOGIA

2.1 PADRÕES DE ANTICORPOS

Dois padrões foram incluídos neste estudo: NIBSC 21/338⁸ e NIBSC 21/340⁹. NIBSC 21/338 é um pool de plasma de 265 indivíduos vacinados e convalescentes após uma infecção Alfa, Beta ou Delta (NIBSC). Já o NIBSC 21/340 foi obtido de sete indivíduos recuperados de SARS-CoV2 no Reino Unido entre maio e agosto de 2020. A fonte material para o pool foi selecionada com base no título de anticorpos para assemelham-se a níveis semelhantes aos do 1º Padrão Internacional da OMS 20/136.

2.2 PLASMÍDEOS E CULTURA CÉLULAR

O plasmídeo que codifica Spike Wuhan-Hu-1 foi obtido da BEI Resources (Manassas, Virginia, USA), bem como todos os vetores de empacotamento para produção lentiviral. A linhagem celular 293T de Rim Embrionário Humano (HEK) e ACE2 superexpressando HEK (293T ACE2) foram cultivadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher) e HEPES (Thermo Fisher) e incubados a 37°C, 5% de CO₂.

2.2 GERAÇÃO DE LENTIVÍRUS PSEUDOTIPADO

Partículas lentivirais pseudotipadas expressando a proteína spike Wuhan-Hu-1 foram geradas a partir da co-transfecção da linha celular HEK293T de acordo com um protocolo estabelecido anteriormente.¹⁰ Para isso, células HEK293T foram plaqueadas em placas de 6 poços a 5x10⁵ em 2 mL de DMEM e incubada a 37°C, 5% de CO₂ por 18 a 24 h. Em seguida, transfectadas com Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) e uma

mistura de DNA contendo: 1 µg de pHAGE-CMV- Luc2-IRES-ZsGreen-W; 0,22 µg de HDM-Hgpm2; 0,22 µg de HDM-Tat1b; 0,22 µg pRC-CMV-Rev1b e 0,34 µg do DNA da *spike* (Wuhan-Hu-1 HDM-IDTSpikeΔCter).¹¹ Após 18 h de transfecção o meio de cultura foi trocado e as placas incubadas por mais 48 h. Após 60 h da transfecção, os sobrenadantes foram coletados, filtrados (Polietersulfona, 0,45 µm), titulados e usados nos ensaios de neutralização e titulação.

2.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para validação dos ensaios de anticorpos de ligação e neutralizantes, foram utilizados os padrões recomendados pela OMS: 1° e 2° Padrão Internacional Anticorpos para variantes preocupantes do SARS-CoV-2 21/338 e 21/340, respectivamente, adquiridos do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). Primeiramente os padrões foram reconstituídos em 0,25 mL de água destilada.

Em seguida, utilizando placas de cultura de 96 poços com 95 µL de meio DMEM adicionados na primeira linha, acrescentado de 5 µL do padrão reconstituído (1:20). As amostras foram diluídas em série, tomando-se 50 µL da amostra diluída a 1:20 e transferindo-a para o próximo poço ao lado na mesma linha, seguido da adição de 50 µL partículas lentivirais pseudotipadas (1:40). Nos poços H7 a H12 (controles negativos), foram adicionados 100 µL de DMEM, já nos poços H1 a H6 (controles positivos) foram adicionados 50 µL de DMEM e acrescentado 50 µL das partículas pseudotipadas. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 1 h. Após, 50 µL de células 293T-ACE2 com uma densidade de 1,25x10⁴ em 50 µL de DMEM foram adicionadas às placas e novamente incubadas por 48 h.

2.4 ENSAIO DE PRECISÃO

A repetibilidade (intra-ensaio) foi determinada por um pesquisador através da realização de três experimentos independentes (três lotes virais) em triplicata. A reprodutibilidade (interensaio) foi determinada por dois pesquisadores que realizaram três experimentos independentes com cinco repetições. O coeficiente de variação (CV) foi calculado pela razão entre o desvio padrão e os valores médios do pNT50.¹² O CV de até 15% foi aceito para ambos os parâmetros de precisão.¹³

2.5 ANÁLISE BASEADA EM IMAGEM

Os núcleos das células foram marcados usando *Hoechst 33342* (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a 20 µM e, após 15 min de incubação a 37°C, 5% de CO₂, a porcentagem de células 293T-ACE2 expressando ZsGreen foi quantificada usando *CellInsight LZR CX7* (Thermo Fisher) e analisados no *Cellomics Scan* (versão 6.6.2). Os títulos dos pseudovírus foram determinados pela fórmula de Poisson, que revela o número de partículas virais por mililitro, seguindo a equação: $-\ln(1 - P/100) \times (\text{número de células por poço}) / (\text{volume de pseudovírus adicionado por poço em mililitro})$, onde P é a porcentagem de células ZsGreen+.¹¹ Para determinar a metade da concentração efetiva máxima de cada amostra contra os pseudovírus (pNT50), o padrão foi titulado variando de 1:40 a 1:2560.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precisão do ensaio foi determinada por análise de variabilidade intra e interensaio utilizando duas amostras padrão da OMS. Foram utilizados cinquenta microlitros de pseudovírus frescos, correspondendo a uma multiplicidade de infecção (MOI) de aproximadamente 0,6.

As curvas foram realizadas em 3 lotes diferentes, executados em dias distintos e por mais de um operador, visando ter reprodutibilidade no ensaio. A potência do soro foi determinada por regressão não linear e é representada como pNT50. A curva de calibração apresentada no gráfico revela um padrão no processo de diluição, destacando a relação entre a concentração do padrão e a eficácia da neutralização. A curva de calibração exibe uma tendência decrescente, indicando que, à medida que o padrão é diluído, a eficiência na neutralização diminui. Nota-se que a primeira diluição atinge uma taxa de neutralização significativamente maior em comparação com as diluições subsequentes.

O CV medido na pesquisa intra-ensaio foi de 14% e 11,9% para 21/338 e 21/340, respectivamente. Dois investigadores testaram independentemente os padrões da OMS para determinar a reprodutibilidade entre ensaios. O CV calculado entre os pesquisadores foi de 19% para 21/338 e 3,2% para 21/340, demonstrando menos de 15% de variabilidade (Figura 1), exceto para o interensaio da amostra 21/338. A Figura 1 mostra a distribuição dos resultados obtidos como potência relativa do padrão analisado. Com isso, os resultados dos ensaios de neutralização com vírus vivos ou vírus pseudotipados podem ser comparados diretamente ou como títulos relativos à referência.

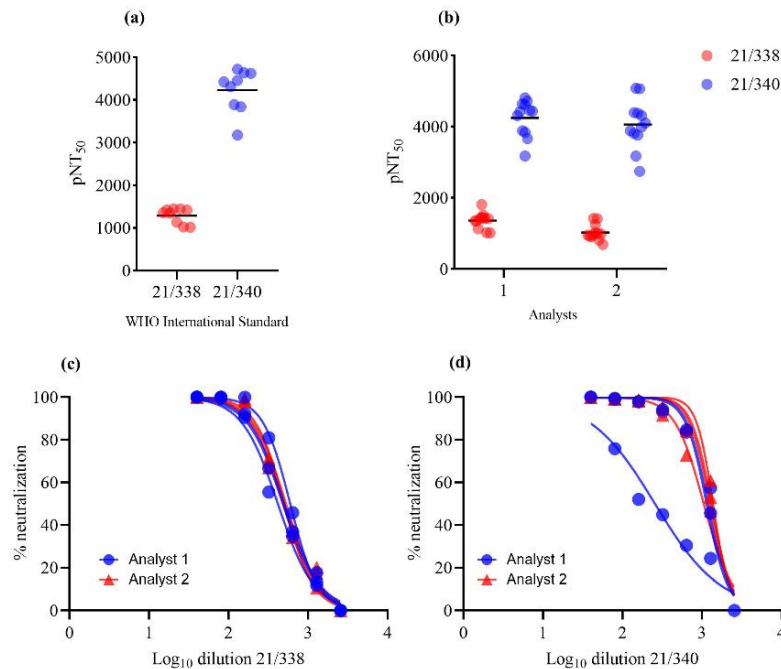


Figura 1. Testes de precisão da análise automatizada de imagens. Os pseudovírus que expressam a glicoproteína de pico Wuhan-Hu-1 foram incluídos nas amostras de soro padrão OMS 21/338 e 21/340. O pNT₅₀ foi calculado, assim como o CV nos mesmos experimentos (intra-ensaio) ou independentes (inter-ensaio). (a-b) Intra-ensaio: 3 experimentos independentes foram realizados por um pesquisador. Os dados foram agrupados para representar a variação entre as amostras. (c-d) Análise interensaio: 2 pesquisadores realizaram 3 ensaios independentes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de um padrão comercial conhecido e bem estabelecido é importante para calibração e harmonização de ensaios de detecção de anticorpos neutralizantes. Nossos resultados demonstraram uma maior neutralização na primeira diluição, demonstrando que uma concentração mais elevada do padrão resulta em uma reação mais eficaz de neutralização, devido a uma maior quantidade de anticorpos neutralizantes presentes. O material de referência foi estabelecido através de robustos processos e comprovadamente adequados para o uso pretendido. Portanto, tais padrões são apropriados para calibração de ensaio ou controle de qualidade (QC) de um procedimento analítico.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ SHARMA et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies.** International Journal of Antimicrobial Agents. 2020.
- ² NARAYANAN et al. **A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 2: host extracellular to systemic effects of SARS-CoV-2 infection.** European Journal of Human Genetics. 2023.
- ³ GIURGEA et al. **Navigating the Quagmire: Comparison and Interpretation of COVID-19 Vaccine Phase 1/2 Clinical Trials.** Vaccines. 2020.
- ⁴ KRISTIANSEN et al. **WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin.** The Lancet, 2021.
- ⁵ KHOURY et al. **Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection.** Nature Medicine, 2021.
- ⁶ ZHU et al. **WHO international standard for SARS-CoV-2 antibodies to determine markers of protection.** The Lancet Microbe, 2022
- ⁷ INFANTINO et al. **The WHO International Standard for COVID-19 serological tests: towards harmonization of anti-spike assays.** International Immunopharmacology, 2021.
- ⁸ NIBSC. **WHO International Standard 1st International Standard for Antibodies to SARS-CoV-2 Variants of Concern NIBSC Code: 21/338.** 2022. Disponível em: <https://nibsc.org/documents/ifu/21-338.pdf> (acesso: 10 de janeiro de 2023).
- ⁹ NIBSC. **WHO International Standard 2nd International Standard for Antibodies to SARS-CoV-2 Variants of Concern NIBSC Code: 21/340.** 2022. Disponível em: <https://nibsc.org/documents/ifu/21-340.pdf> (acesso: 10 de janeiro de 2023).
- ¹⁰ MENDOZA et al. **Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2.** Current Protocols in Microbiology. 2021.
- ¹¹ CRAWFORD et al. **Pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 Spike protein for neutralization assays.** 2021.
- ¹² MERLUZA, et al. **Validation and Establishment of the SARS-CoV-2 Lentivirus Surrogate Neutralization Assay as a Prescreening Tool for the Plaque Reduction Neutralization Test.** Microbiology Spectrum, 2023.
- ¹³ Committee for Medicinal Products for Human. **Use ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis Step5.** European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2022.