

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Desarrollo de prueba ELISA para la detección de anticuerpos
contra el Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la proteína Espícula
del SARS-CoV-2

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Cristina Cumanda Caicedo Cobo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

A Dios y al universo por permitirme nacer en la familia que nací, vivir lo que he vivido y ser quien soy. A mi mamá y papá por ser mis mayores ejemplos de resiliencia y superación. A mis hermanos por enseñarme a ser fuerte y disfrutar de la vida. A mis sobrinos por ser mi mayor motivación. A mi abuelita por apoyarme en cada paso que he dado. A mi nana por brindarme amor de madre, aunque no nos una la sangre. A mis mascotas por permitirme sentir el amor más puro y desinteresado. A cada persona que ha estado en mi vida, de manera efímera o no, por aportar en la construcción de la mujer en la que me estoy convirtiendo.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas y a todo su personal, por abrirme sus puertas y aportar activamente en mi crecimiento profesional y personal. En especial a Washington Cárdenas, PhD por ser mi mentor y tutor. A Mariuxi Mirabá, MSc y Ma. José Cáceres, BSc por la paciencia y las enseñanzas que me han impartido en los últimos años, las cuales me han ayudado en la adquisición de habilidades aplicables en mi área de interés y a la consecución de este proyecto.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; yo *Cristina Cumanda Caicedo Cobo* y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Cristina C. Caicedo

EVALUADORES

.....
Diego A. Gallardo, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Washington B. Cárdenas, PhD.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

En Ecuador existe dependencia extranjera de herramientas biotecnológicas y recursos para realizar diagnósticos moleculares. Esto provoca la inflación de los precios, así como períodos de escasez antes brotes epidémicos, epidemias o pandemias. El objetivo de este proyecto es desarrollar una prueba ELISA para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 con tecnología local. Se busca demostrar que la elaboración de pruebas para diagnóstico molecular de manera soberana e independiente es posible en nuestro país.

El antígeno RBD utilizado en la prueba se obtuvo a partir de una proteína recombinante denominada RBD-RS-Fc producida localmente. La digestión y purificación del antígeno se confirmó por medio de SDS-PAGE y su tinción en Coomassie Blue.

En la prueba ELISA, se detectaron valores de absorbancia proporcionales a la cantidad de antígeno utilizado en la sensibilización de los pocillos y mayores a los obtenidos con el control negativo.

El diseño propuesto de la prueba ELISA funciona como se esperaba. Los resultados indican que si existe interacción entre el antígeno RBD producido con tecnología local y los anticuerpos del paciente. Se debe optimizar la producción de cantidades mayores de RBD para proceder con la estandarización de la prueba ELISA.

Palabras Clave: Soberanía, prueba ELISA, COVID-19, biotecnología.

ABSTRACT

In Ecuador, there is foreign dependence on biotechnological tools and resources for molecular diagnostics. This causes price inflation, as well as periods of shortage before epidemiological outbreaks, epidemics, or pandemics. The objective of this project is to develop an ELISA test for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 using local technology. The aim is to demonstrate that the development of tests for molecular diagnosis in a sovereign and independent manner is possible in our country.

The RBD antigen used in the test was obtained from a recombinant protein called RBD-RS-Fc produced locally. The digestion and purification of the antigen was confirmed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

In the ELISA test, absorbance values proportional to the amount of antigen used in the coating of the wells and higher than those obtained with the negative control were detected.

The proposed ELISA design works as expected. The results indicate that there is interaction between the RBD antigen produced with local technology and the patient's antibodies. The production of larger amounts of RBD should be optimized to proceed with the standardization of the ELISA.

Keywords: *Sovereignty, ELISA test, COVID-19, biotechnology.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación del problema	1
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 Marco teórico.....	2
1.4.1 Pandemia por COVID-19:	2
1.4.2 Diagnóstico de COVID-19	3
1.4.3 Serología relacionada al SARS-CoV-2.....	4
1.4.4 Desarrollo de pruebas ELISA.....	6
1.4.5 Análisis de datos de las pruebas ELISA.....	8
CAPÍTULO 2	10
2. Metodología.....	10
2.1 Digestión de la proteína recombinante y purificación del antígeno	10

2.1.1	Digestión con la proteasa	10
2.1.2	Purificación con perlas magnéticas de proteína A	11
2.1.3	Purificación con columnas de GST	11
2.1.4	Purificación por cromatografía de afinidad en columnas con proteína A inmovilizada	13
2.1.5	Concentración de proteínas y cambio de medio.....	13
2.2	Inmunoensayos de comprobación	13
2.2.1	SDS-PAGE	13
2.2.2	Tinción en Coomassie Blue.....	14
2.2.3	Western Blots.....	14
2.3	Prueba ELISA.....	14
CAPÍTULO 3		15
3.	Resultados Y ANÁLISIS	15
3.1	Obtención de la proteína recombinante	15
3.2	Obtención del antígeno RBD	17
3.2.1	Obtención del RBD para las pruebas ELISA	17
3.3	Diseño y evaluación de la prueba ELISA.....	18
3.4	Ensayos para la producción de grandes cantidades de RBD	20
CAPÍTULO 4		23
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	23
4.1	Conclusiones	23
4.2	Recomendaciones.....	23
BIBLIOGRAFÍA		25

ABREVIATURAS

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
COVID-19	Corona Virus Disease 2019
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
RBD	Receptor Binding Domain
Ab	Anticuerpos
nAb	Anticuerpos Neutralizantes
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
FDA	Food and Drug Administration
N	Nucleocapsid - Nucleocápside
S	Spike - Espícula
E	Envelope – Envoltura
M	Membrane – Membrana
ACE-II	Angiotensin-converting enzyme 2
BB	Binding Buffer
BWB	Binding Wash Buffer
E/W	Equilibration Wash Buffer
PBS	Phosphate-buffered saline
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
TBS	Tris-buffered saline
TA	Temperatura Ambiente
SDS	Sodium dodecyl sulfate
HRP	Horseradish peroxidase
MWCO	Molecular weight cut-off
OD	Optical Density
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

SIMBOLOGÍA

pH	Potencial de Hidrógeno
uL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
ng/uL	Nanogramos por microlitros
V	Voltios
NaCl	Cloruro de sodio
°C	Grados centígrados
min	Minutos
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Paciente con COVID-19 expulsando gotículas respiratorias con potencial infeccioso	3
Figura 1.2 Representación gráfica de la neutralización del SARS-CoV-2. nAb: Anticuerpos Neutralizantes	5
Figura 1.3 Unión del RBD del SARS-CoV-2 al ACE-II de la célula huésped	6
Figura 1.4 Tipos de pruebas ELISA	7
Figura 2.1 Esquema de la metodología utilizada y sus etapas	10
Figura 2.2 Esquema gráfico de la purificación de la reacción de digestión con las perlas magnéticas de proteína A	11
Figura 2.3 Esquema gráfico de la purificación en columnas de GST del sobrenadante del paso de unión de la purificación con las perlas magnéticas de proteína A	12
Figura 3.1 Tinción en Coomassie Blue de la proteína recombinante	16
Figura 3.2 Western Blot de la proteína recombinante. a) Incubación con Anti-HA y Anti-Mouse. b) Incubación con el Anti-Human específico para la cadena Gamma	16
Figura 3.3 Tinción en Coomassie Blue de las proteínas obtenidas luego de purificar la digestión de la proteína recombinante RBD-RS-Fc	17
Figura 3.4 Tinción en Coomassie Blue del antígeno en medio DPBS 1X	18
Figura 3.5 Pocillo de una placa de microtitulación con el diseño propuesto de la prueba ELISA	19
Figura 3.6 Gráfico de barras de los resultados obtenidos en la prueba ELISA.	20
Figura 3.7 SDS-PAGE de los flow-throughs obtenidos tras la purificación en columnas de Proteína A	21
Figura 3.8 SDS-PAGE de los flow-throughs obtenidos de la purificación en columnas de proteína A concentrados y su contenido filtrado	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados obtenidos en la prueba ELISA.....	19
--	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

El sector de salud pública del país depende de la importación de pruebas de diagnóstico comerciales y su disponibilidad en países extranjeros. La importación implica trámites económicos y legales que dificultan la logística de la compra. El acceso restringido a los kits comerciales provoca que exista escasez local; especialmente cuando incrementa su demanda tras sucesos epidemiológicos como brotes, epidemias o pandemias. En Ecuador, la falta de soberanía local en la producción de kits para diagnóstico molecular afecta al sector de la salud y de la investigación. En el sector de la salud se refleja en un sinnúmero de problemas relacionados al control epidemiológico de la enfermedad y al acceso limitado que existe para la población en general. En el área de la investigación existen limitaciones para evaluar la respuesta inmune con respecto a los patógenos o vacunas que se desean estudiar. Los kits comerciales requieren temperaturas y condiciones determinadas previamente por el fabricante para mantener su integridad. El comprador no siempre tiene acceso a controlar y conocer si dichas condiciones se cumplen en las diferentes etapas del proceso de importación. En las pruebas ELISA, los posibles daños se verían reflejados en la desnaturalización de la proteína con la que están cubiertos los pocillos o en la degradación de los reactivos disponibles en el kit. En ambos casos la sensibilidad de la prueba podría disminuir significativamente, dando paso a la obtención de resultados poco confiables.

1.2 Justificación del problema

Implementar la soberanía biotecnológica dentro del país, produciendo kits de diagnóstico molecular, es una vía para impulsar el desarrollo tecnológico e intelectual, así como la innovación y el crecimiento económico. La producción de tests ELISA locales es un paso para erradicar la dependencia de recursos extranjeros que existe en el país. Evitar los inconvenientes de logística ligados a la importación disminuiría los costos de adquisición y aumentaría la fiabilidad de los

resultados obtenidos con la prueba. El desarrollo y comercialización de una prueba ELISA de bajo costo de producción dentro del país permitiría que los laboratorios y las personas tengan mayor acceso a un diagnóstico barato, de manera que se podría llevar un control epidemiológico más confiable y certero. La Academia también obtendría beneficios y la oportunidad de ir a la par con la comunidad internacional. Las investigaciones que se podrían llevar a cabo están relacionadas a la evaluación de la respuesta inmune de la población a diferentes variantes de un virus. Adicionalmente, sería posible estandarizar las dosis requeridas de cierta vacuna para lograr la inmunización y conocer su duración.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diseñar una prueba ELISA con tecnología local para la detección de anticuerpos contra la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 aplicando herramientas de biología molecular.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Implementar protocolo de producción y purificación de proteínas recombinantes para la sensibilización en placas de microtitulación.
2. Evaluar el diseño propuesto para la prueba ELISA utilizando sueros positivos para anticuerpos contra SARS-CoV-2.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Pandemia por COVID-19:

El COVID-19 es una enfermedad provocada por el betacoronavirus SARS-CoV-2 que afecta fundamentalmente al sistema respiratorio y se transmite por medio de gotas y aerosoles (Figura 1.1 Paciente con COVID-19 expulsando gotículas respiratorias con potencial infeccioso.) (Banerjee et al., 2021; Lamers & Haagmans, 2022); además, se desconoce con certeza su origen, pero se especula que es zoonótico (Lin et al., 2022). La tasa de mortalidad del COVID-19 en casos confirmados es de 6,6%, es decir, menor a la de enfermedades

causadas por otros coronavirus como el MERS-CoV y el SARS-CoV cuyas tasas son del 34,3% y 9,6%, respectivamente (Toyoshima et al., 2020). No obstante, ha sido responsable del colapso de los sistemas sanitarios alrededor del mundo debido a la alta transmisibilidad y virulencia de las distintas variantes del SARS-CoV-2 (Chen et al., 2022; WHO, 2022).

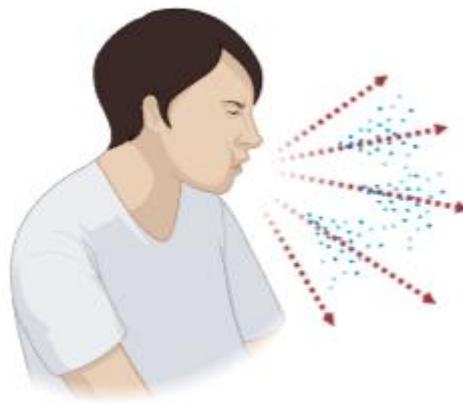


Figura 1.1 Paciente con COVID-19 expulsando gotículas respiratorias con potencial infeccioso. Adaptado de "Tos (adulto, con spray)", por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.4.2 Diagnóstico de COVID-19

El diagnóstico del COVID-19 se realiza principalmente por medio de la detección del material genético del SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo por medio de RT-PCR (Achá Alarcón et al., 2022; Frumence et al., 2021; Villafañe et al., 2022). Las pruebas por RT-PCR pueden detectar la presencia del virus incluso en la etapa de incubación debido a su sensibilidad (Villafañe et al., 2022). Las pruebas rápidas para detección de antígenos suelen ser utilizadas para obtener resultados de manera fácil, rápida y económica (Achá Alarcón et al., 2022), pero al ser una prueba dependiente de la carga viral es probable obtener resultados falsos-negativos en las primeras instancias de la infección (Achá Alarcón et al., 2022; Amer et al., 2021). Una alternativa de menor costo, pero menos sensible dado que depende de la respuesta inmune del paciente, es la detección de anticuerpos a partir de muestras de sangre o suero (Villafañe et al., 2022). La presencia de anticuerpos usualmente se evalúa por

medio de una prueba de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA, por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Achá Alarcón et al., 2022; Frumence et al., 2021; Ibrahim et al., 2021; Villafañe et al., 2022).

1.4.3 Serología relacionada al SARS-CoV-2

La detección de anticuerpos permite llevar un registro epidemiológico de quiénes han contraído el virus o han sido vacunados (Christensen et al., 2022; Sekirov et al., 2021). Las pruebas serológicas permiten inferir si el sistema inmunológico de la persona está preparado para reconocer las partículas virales ante una nueva exposición (Shi & Ren, 2021). Cuantificar anticuerpos neutralizantes (nAb) es indispensable en el desarrollo de vacunas y la estimación del riesgo de re-infección (Hønge et al., 2022; Shi & Ren, 2021). Los nAb son los responsables de la inmunidad protectora debido a que se unen al patógeno de manera que inhiben su replicación y bloquean su infección (Figura 1.2) (Payne, 2017). La efectividad con la cual se detiene la replicación viral se relaciona directamente con la tasa de unión de los anticuerpos a epítopos neutralizantes y, en ocasiones, puede incrementar por la presencia de anticuerpos no-neutralizantes (Neurath, 2008).

La FDA ha aprobado alrededor de 100 pruebas ELISA comerciales para la detección de Ab contra SARS-CoV-2 para uso clínico, las cuales están diseñadas en su mayoría para detectar anticuerpos contra la nucleocápside (Anti-N) o contra la proteína de la espícula (Anti-S) (Christensen et al., 2022; Shi & Ren, 2021). Ambas son proteínas estructurales del SARS-CoV-2 junto a la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E) (Christensen et al., 2022; Frumence et al., 2021; Ma et al., 2022; Shi & Ren, 2021). La nucleocápside es considerada la proteína con mayor inmunogenicidad debido a que es altamente expresada durante la infección (Bylicki et al., 2021; Hoste et al., 2020). La proteína de la espícula contiene la región de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) y ha sido la base de la mayoría de las vacunas contra el COVID-19 (Chen et al., 2022; Datta et al., 2021). El RBD se une a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-II) del huésped permitiendo la entrada del virus a la célula (Figura 1.3), por ello se considera que posee varios epítopos neutralizantes (Datta

et al., 2021; Zanella et al., 2022). Los ensayos serológicos Anti-N se suelen realizar para conocer si el paciente ha sido infectado por el SARS-CoV-2 (Christensen et al., 2022), pero aquellos Anti-S también están direccionados a estudios como la evaluación de la efectividad de las vacunas ante nuevas variantes y la estimación de cuánto dura la inmunidad adquirida tras la infección o vacunación (Chen et al., 2022; Christensen et al., 2022; Datta et al., 2021).

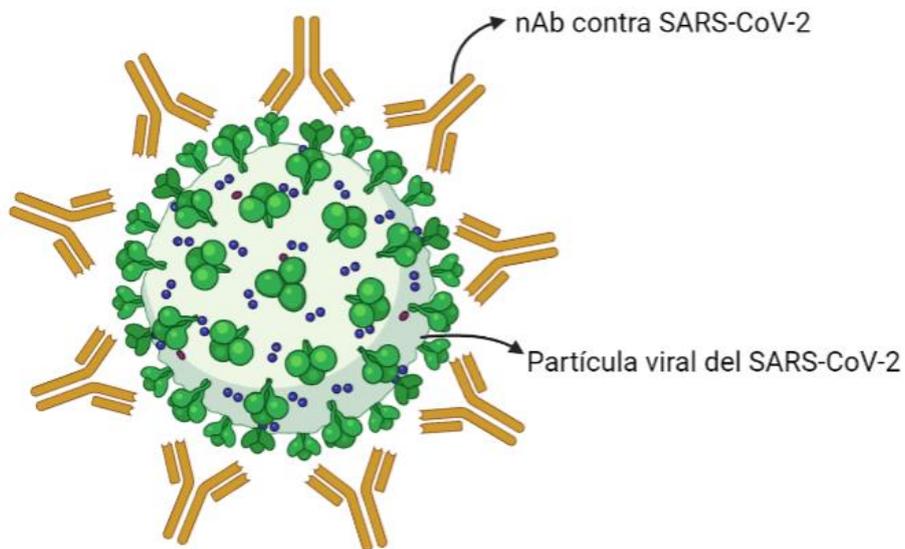


Figura 1.2 Representación gráfica de la neutralización del SARS-CoV-2. nAb: Anticuerpos Neutralizantes. Adaptado de "SARS-CoV-2 (virus del COVID-19) 3D", por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

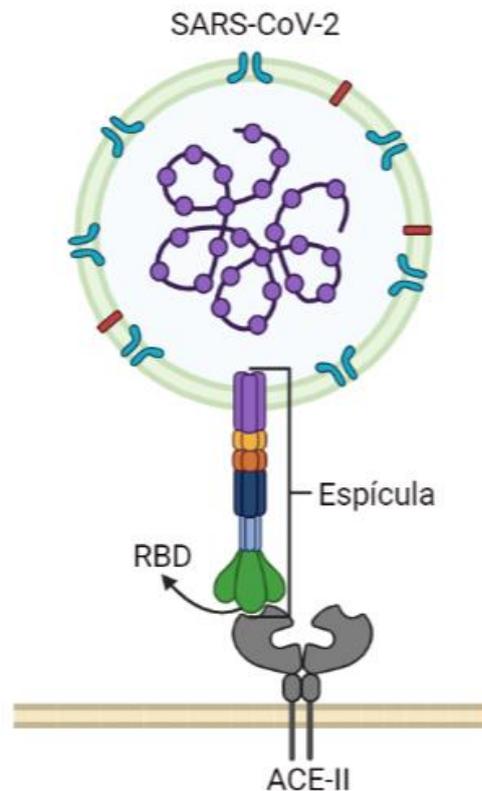


Figura 1.3 Unión del RBD del SARS-CoV-2 al ACE-II de la célula huésped. Adaptado de "Unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 2" por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.4.4 Desarrollo de pruebas ELISA

Los ensayos ELISA son una herramienta útil y popular para la detección de anticuerpos, antígenos u otras moléculas gracias a su bajo costo y su alta sensibilidad (Büyükköroğlu & Şenel, 2018; Pettipher et al., 2004; Shrivastava et al., 2022; Sykes & Rankin, 2014; Vieira et al., 2015). Estas pruebas se basan en reconocer determinada molécula utilizando un anticuerpo ligado a una enzima capaz de producir una señal colorimétrica o fluorescente (Büyükköroğlu & Şenel, 2018). La técnica se puede realizar de manera directa, indirecta, tipo "sandwich" o competitiva, dependiendo del modo en que se una el anticuerpo de detección a la molécula que reconoce (Figura 1.4) (Büyükköroğlu & Şenel, 2018).

Las pruebas ELISA se desarrollan en una placa de microtitulación, cuyo material suele ser poliestireno, polivinilo, dextrano o poliacrilamida y se caracteriza por permitir la adsorción física (adherencia) del anticuerpo o antígeno que se desea que cubra el pocillo (Büyükköroğlu & Şenel, 2018; Lai et al., 2017). La proteína de recubrimiento requiere un medio adecuado en pH y sales para lograr que su adherencia sea estable (Craig et al., 1989), lo cual es importante si se desea elaborar una prueba serológica altamente sensible. La especificidad y sensibilidad de un ensayo ELISA depende básicamente de la cantidad de proteínas dispuestas a capturar la molécula de interés disponibles en la superficie sólida, la afinidad de los anticuerpos utilizados en las incubaciones, el sustrato de la inmunoperoxidasa y la capacidad de lectura del espectrofotómetro (Büyükköroğlu & Şenel, 2018; Pettipher et al., 2004; Sykes & Rankin, 2014).

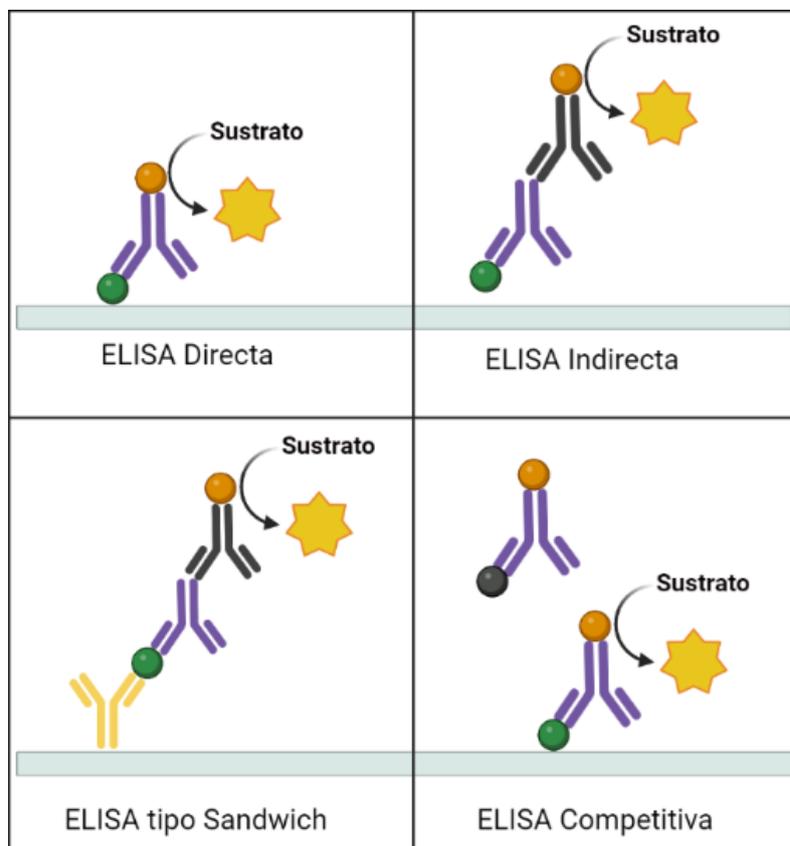


Figura 1.4 Tipos de pruebas ELISA. Adaptado de "Resumen ELISA" por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.4.5 Análisis de datos de las pruebas ELISA

Los datos obtenidos de luego de realizar la lectura de una prueba ELISA se pueden analizar de manera cualitativa, para determinar presencia o ausencia, o cuantitativa si el estudio es más específico y se desea conocer la cantidad de antígenos o anticuerpos presentes en la muestra (Pettipher et al., 2004). En un análisis cuantitativo, se requiere establecer una curva estándar y un umbral (cut-off) con muestras cuyas concentraciones pueden ser conocidas o no (Kadam et al., 2019; Krähling et al., 2021). Si las concentraciones son desconocidas, se procede a asignar valores arbitrarios que servirán como referencia al momento de emitir los resultados (Krähling et al., 2021).

La curva estándar se obtiene al procesar los datos de varias diluciones seriadas de una muestra concentrada positiva para la proteína cuya presencia se está evaluando (Aydin, 2015). Es recomendable probar con varios modelos y escoger el que mejor se ajuste al comportamiento de los datos basándose en el mayor coeficiente de determinación (R^2) (Nummer et al., 2018). En el caso de las pruebas ELISA, los modelos que mejor se ajustan suelen ser los logarítmicos de 4 o 5 parámetros (4PL o 5PL, respectivamente) (Bursa et al., 2020; Cumberland et al., 2015; Krähling et al., 2021). Los modelos 4PL y 5PL son funciones sigmoideas (Cumberland et al., 2015), por lo cual es fundamental tener en cuenta que se debe trabajar con la región lineal de la curva que se genere, es decir, si una muestra posee un valor fuera del rango lineal se debe diluir para estimar su resultado real, caso contrario el valor obtenido no es fiable (Aydin, 2015).

El cut-off es un valor que se establece al analizar un determinado número de muestras cuyo diagnóstico es negativo para la proteína que se desea detectar (Lardeux et al., 2016; Olsen et al., 2022). El valor es el resultado obtenido de la suma del promedio de dichas muestras más tres desviaciones estándar (Gupta et al., 2016; Lardeux et al., 2016; Sahu et al., 2022). Determinar un cut-off es relevante para descartar el ruido de fondo o background provocado por la reactividad cruzada (Sahu et al., 2022); así se consigue aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba evitando resultados falsos-positivos o falsos-

negativos (Olsen et al., 2022). Este valor se puede interpretar en términos de la densidad óptica, la concentración si se conoce o, caso contrario, de las unidades arbitrarias establecidas (Olsen et al., 2022; Sahu et al., 2022; Salgado et al., 2022).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El desarrollo de las pruebas ELISA para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 se puede resumir en cuatro etapas (Figura 2.1):

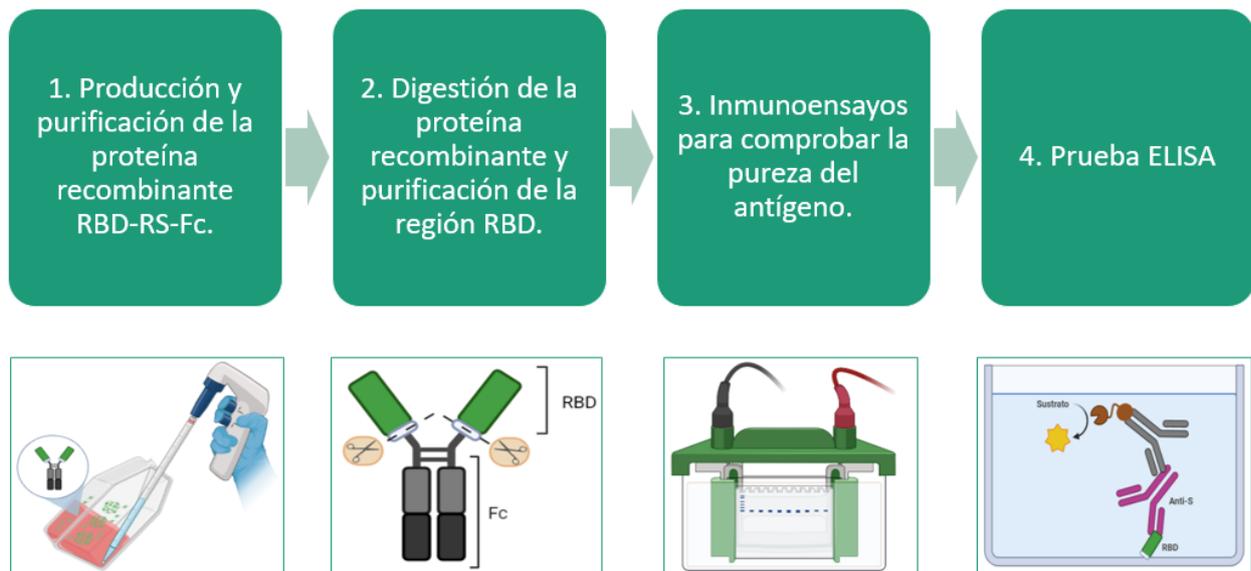


Figura 2.1 Esquema de la metodología utilizada y sus etapas. Elaborado en biorender.com y PowerPoint.

Es importante enfatizar que en este proyecto se trabajó directamente con la proteína recombinante, la cual fue previamente producida en cultivo celular y purificada por personal del Laboratorio para Investigaciones Biomédicas. Por ello la metodología aplicada fue a partir de la segunda etapa.

2.1 Digestión de la proteína recombinante y purificación del antígeno

2.1.1 Digestión con la proteasa

Se realizó la digestión en solución de la proteína RBD-RS-Fc con una proteasa unida a un GST-Tag. En la reacción de digestión se utilizó un buffer de escisión (1X Cleavage buffer; 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA), 1 mM DTT y se completa el volumen final con agua ultrapura para mantener las concentraciones

finales óptimas para los reactivos. Las digestiones se realizaron toda la noche a 4°C y se detuvieron al comenzar sus respectivas purificaciones.

2.1.2 Purificación con perlas magnéticas de proteína A

La reacción de digestión de las proteínas se purificó con perlas magnéticas de proteína A (Pierce™ Protein A Magnetic Beads; ThermoScientific, USA). Se lavaron 50 uL de perlas magnéticas dos veces, la primera con 150 uL y la segunda con 1 mL de buffer de unión y lavado (BWB: Binding Wash Buffer; 20X TBS-T: 400 mM Tris, 3 M NaCl, 0.05% Tween 20). La muestra, es decir, la reacción de digestión se preparó el BWB de acuerdo con las indicaciones del protocolo (Figura 2.2). Se colectó y guardó el sobrenadante para realizar su purificación con columnas de GST. Luego se realizaron dos lavados con 500 µL de BWB, se eluyó y neutralizó con 100 µL de 0.1 M Glicina (pH 2) y 15 µL de 1 M Tris (pH 8.5), respectivamente.

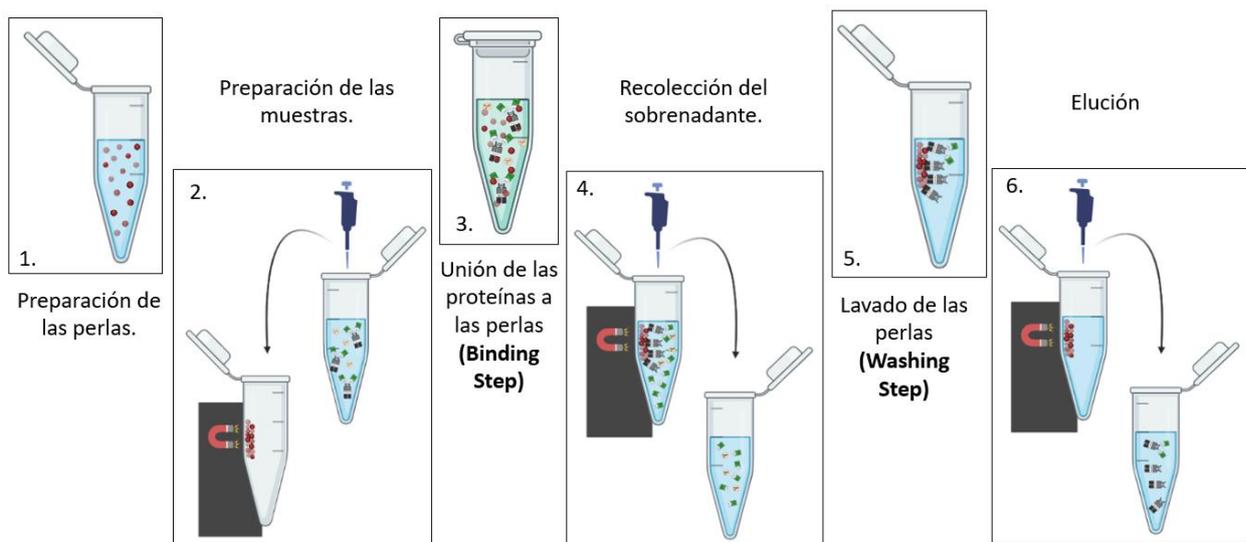


Figura 2.2 Esquema gráfico de la purificación de la reacción de digestión con las perlas magnéticas de proteína A. Elaborado en biorender.com

2.1.3 Purificación con columnas de GST

Se preparó la columna incubándola a TA por 10 min, luego se removió el buffer de almacenamiento (storage buffer) y posteriormente se añadieron 400 uL de E/W

para lavarla. Se purificó el sobrenadante del paso de unión de la purificación con perlas magnéticas de proteína A utilizando columnas para purificación de proteínas etiquetadas con GST (Pierce® GST Spin Purification Kit; ThermoScientific, USA) como se muestra en el esquema de la Figura 2.3. El sobrenadante se preparó con el buffer de lavado proporcionado en el kit (Equilibration Wash Buffer – E/W; PBS) antes del paso de unión a la columna. Se realizaron tres lavados con 400 uL de E/W y finalmente se realizó la elución en tres periodos de centrifugación, en cada uno se agregaron 200 uL de buffer de elución. El buffer de elución es 1X glutatión, la cual se prepara con E/W a partir de un stock de 10X glutatión. En todos los pasos se centrifugó a 700xg por 2 a TA.

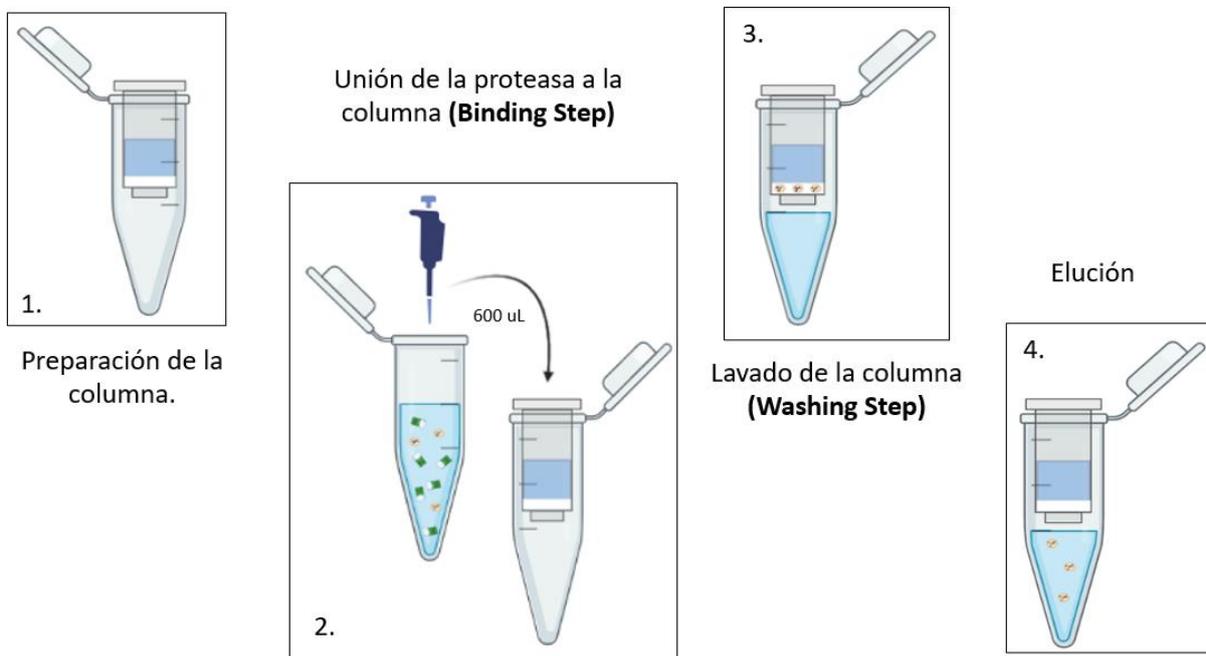


Figura 2.3 Esquema gráfico de la purificación en columnas de GST del sobrenadante del paso de unión de la purificación con las perlas magnéticas de proteína A. Elaborado en biorender.com

2.1.4 Purificación por cromatografía de afinidad en columnas con proteína A inmovilizada

La muestra digerida se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A (Pierce® Protein A Columns; ThermoScientific, USA). Se realizó la dilución del sobrenadante con el buffer de unión (BB: Binding Buffer; PBS: 0.1 M Fosfato de Sodio, 0.15 M cloruro de sodio) en una relación 1:2. Luego de la unión de las proteínas a la resina, se realizaron lavados con 15 mL de BB. La elución se hizo pasando 5 mL de buffer de elución (0.1 M Glicina, pH 2) por la columna y neutralizando su efecto con 500 µL de 1 M Tris (pH 8.5). Se colectaron y guardaron a -80°C los flujos (flow-throughs) de cada paso.

2.1.5 Concentración de proteínas y cambio de medio

Se utilizaron los concentradores Thermo Scientific™ PES Pierce™, MWCO de 10 K para reducir el volumen del medio en que se encontraban las proteínas o, en su defecto, cambiar el medio. Se realizaron centrifugaciones a 2000xg y a 4°C hasta que obtener el volumen deseado.

2.2 Inmunoensayos de comprobación

2.2.1 SDS-PAGE

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras obtenidas luego de las purificaciones. Los geles de poliacrilamida se prepararon con un gel separador (running gel) de 12% y un gel concentrador (stacking gel) de 4%. Las muestras se trataron con dodecilsulfato sódico (SDS) para que su carga sea negativa. El tratamiento con SDS se realizó colocando 23 µL de muestra con 7 µL de 4X buffer de carga (200mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 0.4% Bromophenol Blue, 40% Glycerol) y calentando la solución a 90°C por 10 min. La electroforesis se realizó a 150 V durante aproximadamente 1h30min o hasta que se observaba que la línea guía desaparecía.

2.2.2 Tinción en Coomassie Blue

La tinción en Coomassie blue se realizó para determinar la pureza de las muestras. Los geles de acrilamida destinados a este proceso se incubaron en la solución de tinción (0.25% Coomassie Blue R250; 40% Metanol; 7% Ácido Acético Glacial) a temperatura ambiente (TA) durante aproximadamente 16-18 horas. El desteñido del gel se realizó utilizando una solución de 40% metanol y 10% de ácido acético.

2.2.3 Western Blots

Los ensayos de Western Blot se realizaron con el objeto de confirmar que las proteínas obtenidas son las de interés y determinar sus tamaños experimentales antes y después de la purificación y digestión. La transferencia de las proteínas se realizó a 30 V durante 1h. Se utilizaron membranas de PVDF, las cuales se prepararon en metanol y se equilibraron en buffer de transferencia. El paso de bloqueo se realizó durante 16-18 horas a 4°C con un buffer de bloqueo (TBS-T + Leche: Buffer Salino de Tris, 0.1% Tween 20, 5% Leche TRU descremada). En los ensayos para la detección de la región Fc se realizó sólo una incubación con el anticuerpo Anti-Human IgG (específico para la cadena Gamma) conjugado con la enzima HRP (Horse-radish peroxidase). Para la detección del RBD se realizaron dos incubaciones, la primera con Anti-HA y la segunda con el Anti-Mouse IgG conjugado a la HRP. Luego de cada incubación se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con TBS-T (Buffer Salino de Tris, 0.1% Tween 20). Para la lectura, se utilizó el kit de Quimioluminiscencia Novex (ThermoScientific, USA).

2.3 Prueba ELISA

La sensibilización de las placas ELISA se realizó incubando el antígeno RBD en una placa de microtitulación durante 18 horas a 4°C. El bloqueo se realizó por 2 horas a temperatura ambiente (TA) en una solución de PBS + 0.05% Tween 20 + 5% de leche TRU descremada. La primera incubación de anticuerpos se realizó por 2 horas a TA con una dilución 1/1000 de un suero humano en una solución de

PBS-T-L (PBS, 0.05% Tween 20, 0.5% de leche TRU descremada). En la segunda incubación se utilizó el anticuerpo Anti-Human IgG (específico para la región Fab) conjugado con HRP en una dilución 1/10000 en la solución PBS-T-L. Se utilizó TMB como sustrato. Se agregaron 50 μ L de TMB y se incubó por 10 min en la oscuridad a TA. Se detuvo la reacción agregando 50 μ L de 0.18 M H₂SO₄ y se leyó la placa a 450 nm de manera inmediata.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Obtención de la proteína recombinante

La proteína recombinante purificada por el personal del laboratorio a partir del sobrenadante de transfección tuvo una concentración de 98.86 ng/ μ L. Este valor se utilizó para realizar los cálculos pertinentes para la digestión con la proteasa. Se estimó que el tamaño de la proteína recombinante es de 159 kDa. Se descartó la presencia de proteínas inespecíficas luego de realizar el SDS-PAGE y la tinción en Coomassie Blue de la proteína purificada, pues sólo se observó una banda del tamaño esperado (Figura 3.1). En los ensayos de Western Blot se utilizó la muestra de la proteína recombinante como control positivo y se confirmó su estructura, pues se pudo visualizar tanto en el inmunoensayo indirecto con el Anti-HA y el Anti-Mouse como en el directo, en el que sólo se utilizó el Anti-Human (Figura 3.2).



Figura 3.1 Tinción en Coomassie Blue de la proteína recombinante. M: Marcador molecular. 1: Proteína recombinante RBD-RS-Fc purificada luego de la transfección.

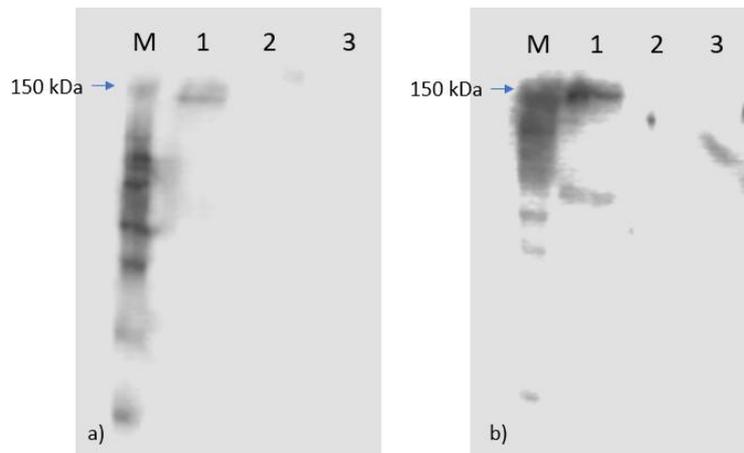


Figura 3.2 Western Blot de la proteína recombinante. a) Incubación con Anti-HA y Anti-Mouse. b) Incubación con el Anti-Human IgG (específico para la cadena Gamma). M: Marcador molecular. 1: Proteína recombinante RBD-RS-Fc purificada luego de la transfección (159 kDa). 2: Proteína no digerida (53 kDa) / Región Fc (26 kDa) (Elución de la purificación con perlas

magnéticas de proteína A). 3: RBD (27 kDa) (Flow-through del paso de unión de la purificación con GST),

3.2 Obtención del antígeno RBD

3.2.1 Obtención del RBD para las pruebas ELISA

En el ensayo para obtener el antígeno viral para la prueba ELISA se realizó la digestión de 30 ug de la proteína recombinante RBD-RS-Fc y su purificación por perlas magnéticas de proteína A y luego en columnas de GST. Al realizar la tinción en Coomassie Blue se pudo observar la proteasa obtenida en la elución de la purificación por GST, pero no se visualizó la presencia del RBD ni de la región Fc o proteína no digerida (Figura 3.3). La presencia de la proteasa indica que las purificaciones si funcionaron, por ello se procedió a concentrar la región RBD y a cambiar el medio a 1X DPBS. El volumen inicial del flow-through obtenido de la purificación por GST en que se encuentra el RBD purificado fue de 3 mL. Se realizó su concentración y se agregaron 9 mL de 1X DPBS, se concentró hasta que el volumen se redujo a ~200 uL y luego se realizó su SDS-PAGE y tinción en Coomassie Blue. Fue posible visualizar las bandas del tamaño esperado del RBD (27 kDa), las cuales indican que la proteína está presente (Figura 3.4).

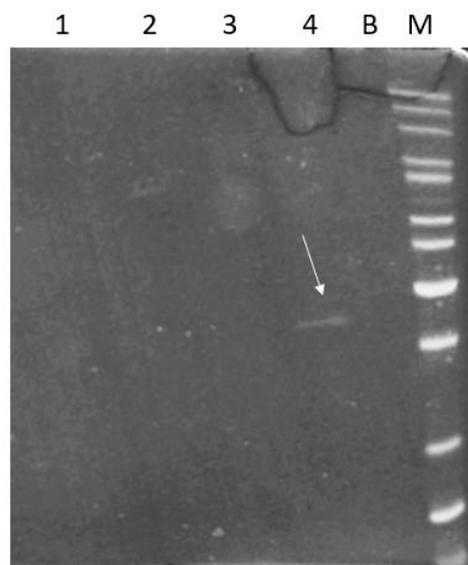


Figura 3.3 Tinción en Coomassie Blue de las proteínas obtenidas luego de purificar la digestión de la proteína recombinante RBD-RS-Fc. 1: Proteína no digerida (53 kDa) / Región

Fc (26 kDa) (Elución de la purificación con perlas magnéticas de proteína A), 2-3: RBD (27 kDa) (Flow-through del paso de unión de la purificación con GST), 4: Proteasa (46 kDa) (Elución de la purificación con GST), M: Marcador, B: Blank

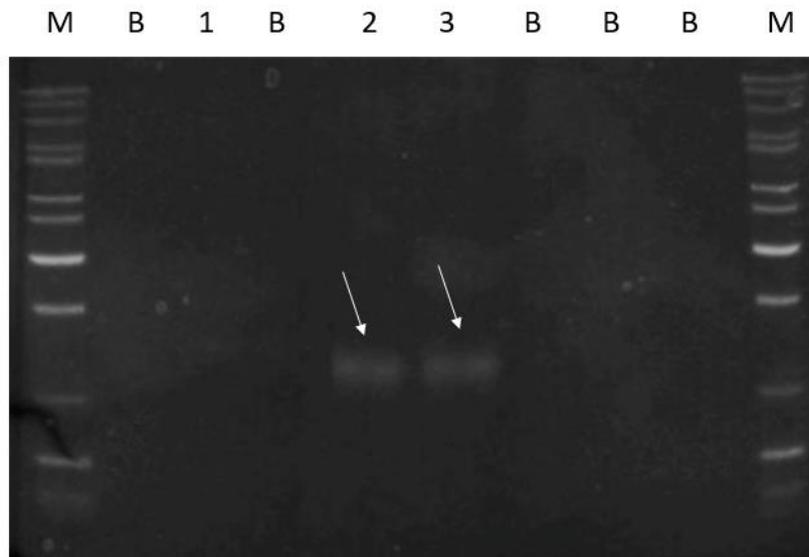


Figura 3.4 Tinción en Coomassie Blue del antígeno concentrado en medio DPBS 1X. 1: Proteasa (46 kDa) (Elución de la purificación con GST) 2-3: RBD (27 kDa) (Flow-through del paso de unión de la purificación con GST), M: Marcador, B: Blank

3.3 Diseño y evaluación de la prueba ELISA

El diseño propuesto para la prueba ELISA consiste en recubrir un pocillo de una placa de microtitulación con la proteína RBD, posteriormente realizar la primera incubación con el suero del paciente positivo para anticuerpos contra la proteína Espícula del SARS-CoV-2 y luego añadir el anticuerpo secundario (Anti-Human IgG específico para la región Fab) (Figura 3.5). Se realizó la evaluación de esta propuesta utilizando el RBD obtenido. Se cambió el medio del RBD a 1X DPBS y luego a buffer carbonato/bicarbonato utilizando los concentradores PES de MWCO 10K. Tras el cambio de medio a buffer carbonato/bicarbonato, la concentración de la proteína disminuyó a 50 ng/uL en un volumen de ~200 uL. Se realizó la sensibilización por duplicado con diferentes cantidades de RBD: 100, 500 y 1000 ng y se mantuvieron las mismas condiciones descritas en la metodología. El control

negativo se realizó en pocillos con 1000 ng de RBD utilizando buffer PBS-T-L en la primera incubación. La lectura de la prueba ELISA aumenta de manera proporcional a la cantidad de RBD que se imprimió en el pocillo y, en los tres casos, se obtuvo un OD mayor que en el control negativo (Tabla 1, Figura 3.6). Esto indica que los valores de OD obtenidos se deben a que los anticuerpos presentes en el suero interaccionaron con el RBD del pocillo.

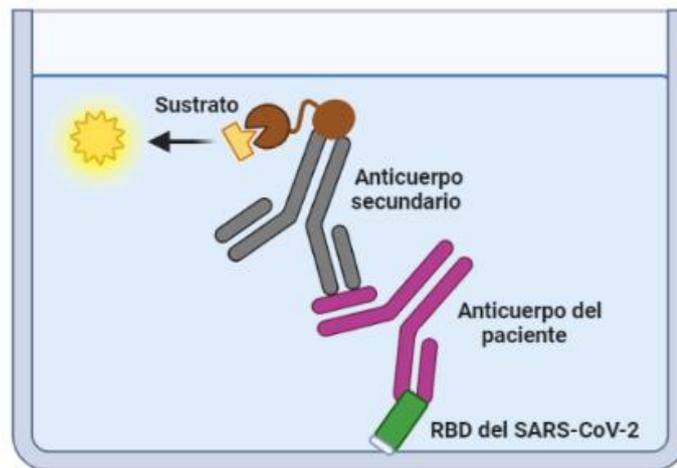


Figura 3.5 Pocillo de una placa de microtitulación con el diseño propuesto de la prueba ELISA. Adaptado de "ELISA indirecta", por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Tabla 1 Resultados obtenidos en la prueba ELISA.

Cantidad de RBD (ng) utilizada en la sensibilización	Lectura a 450 nm	
	OD1	OD2
100	0,293	0,301
500	0,511	0,547
1000	0,691	0,622
1000	0,053	0,051

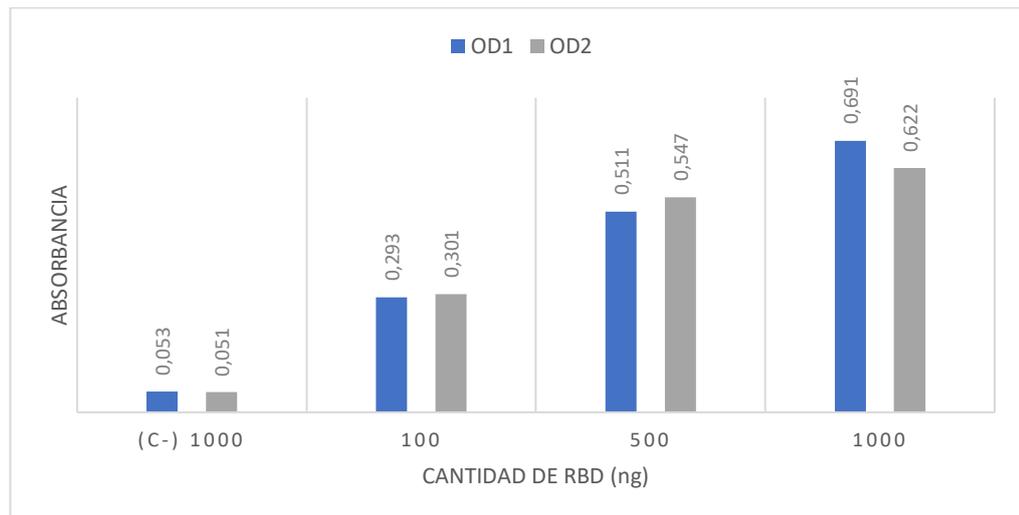


Figura 3.6 Gráfico de barras de los resultados obtenidos en la prueba ELISA.

3.4 Ensayos para la producción de grandes cantidades de RBD

Se realizó la digestión de 177.94 ug de RBD-RS-Fc para obtener una mayor cantidad RBD y realizar las pruebas para estandarizar y validar la prueba ELISA. Se propuso una modificación en la metodología aplicada previamente. En lugar de purificar la digestión por perlas magnéticas de proteína A se decidió purificar en las columnas cromatografía proteína A y, en seguida, purificar el flow-through que contiene el RBD y la proteasa por columnas de GST. En los ensayos de Western Blot realizados, tanto en el directo con el Anti-Human como en el indirecto con el Anti-HA y el Anti-Mouse, sólo se pudo detectar a la proteína recombinante utilizada como control positivo, pero las regiones RBD y Fc digeridas y purificadas no se lograron observar (Figura 3.2).

Debido a que en el ensayo anterior se había realizado la purificación de GST inmediatamente, no se pudo identificar qué ocurrió con la proteína. Se decidió realizar el proceso paso a paso, es decir, purificar por columnas de proteína A, verificar la presencia de las proteínas mediante SDS-PAGE y su tinción en Coomassie Blue y, dependiendo de los resultados, purificar por columnas de GST. Se realizó la digestión de 30 ug de proteína recombinante. Se recolectaron los flow-throughs de todos los pasos, pero en el paso del lavado la colección fue de 3 mL en 3 mL. Las fracciones se enumeraron del 1 al 5 con respecto al orden en que se

recolectaron. Guardar el flow-through del paso de lavado por fracciones permitiría determinar si las proteínas estaban siendo retenidas y por ello no se lograron detectar. Se tiñeron las muestras en coomassie blue, pero tampoco se lograron visualizar las bandas esperadas (Figura 3.7). Finalmente, se optó por concentrar todos los flow-throughs recolectados y teñirlos en coomassie blue para descartar que no se hayan visualizado las proteínas a causa de que estén tan diluidas que se encuentren fuera del límite de detección. Se concentraron todas las fracciones colectadas del lavado juntas. Se realizó la tinción de las muestras concentradas y el contenido filtrado, pero tampoco se observaron las bandas de interés (Figura 3.8).

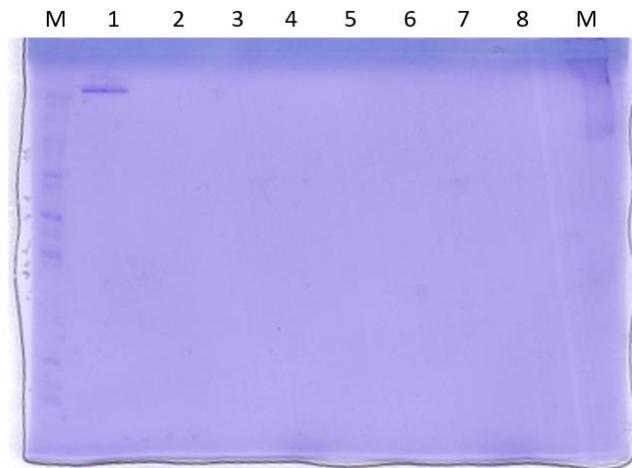


Figura 3.7 SDS-PAGE de los flow-throughs obtenidos tras la purificación en columnas de Proteína A. 1: RBD-RS-Fc (53 kDa), 2: Fracción 5, 3: Fracción 4; 4: Fracción 3, 5: Fracción 2, 6: Fracción 1. 7: RBD (27kDa) / Protosa (46 kDa) (Flow-through del binding step), 8: Región Fc (26 kDa), Proteína no digerida (53 kDa) (Elución).

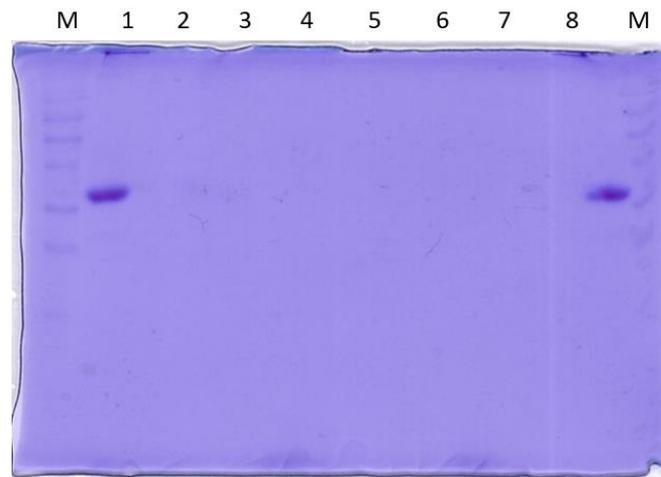


Figura 3.8 SDS-PAGE de los flow-throughs obtenidos de la purificación en columnas de proteína A concentrados y su contenido filtrado. 1 y 8: 10 ug BSA (Control), 2: Blank, 3: Elución (concentrada); 4: Elución (filtrado); 5: Binding (concentrado), 6: Binding-Washings (filtrado), 7: Lavados (concentrado), M: Marcador.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos y el análisis realizado al respecto, es posible concluir lo siguiente:

- Se implementó un protocolo de producción y purificación para la proteína recombinante RBD-RS-Fc y la obtención del antígeno RBD a partir de ella. Los inmunoensayos realizados luego de la digestión y purificación del RBD-RS-Fc muestran que la estructura y el tamaño de las proteínas y la proteasa eran los esperados.
- Se realizó la evaluación del diseño propuesto para la prueba ELISA utilizando un suero positivo para anticuerpos contra SARS-CoV-2. Los valores obtenidos al realizar la lectura de la placa indican que los anticuerpos del paciente y el RBD adherido al pocillo sí interaccionaron.
- Se debe optimizar la digestión y purificación de cantidades mayores de proteína recombinante para estudiar la interacción del RBD con muestras positivas y negativas para anticuerpos contra SARS-CoV-2.

4.2 Recomendaciones

- Se sugiere realizar pruebas en placas de microtitulación pre-tratadas cuya capacidad de adsorción sea mayor para facilitar la fijación de proteínas pequeñas como alternativa para incrementar la sensibilidad de la prueba.
- Se recomienda cuantificar las proteínas antes y después de utilizar los concentradores para calcular el porcentaje de pérdida.
- Se aconseja recolectar la elución de la proteína recombinante purificada a partir del sobrenadante de transfección en fracciones de 1 mL. Así se podría determinar hasta qué punto se obtiene proteína y evitar que se diluya.
- Se sugiere emplear muestras cuya concentración sea igual o mayor a 100 ng/uL. Esto podría ayudar a disminuir el porcentaje de pérdida al utilizar los

concentradores y evitar que la concentración final del RBD, luego de la digestión de la proteína recombinante y sus respectivas purificaciones, esté por debajo de los límites de detección.

- Se recomienda evaluar el diseño ELISA propuesto con proteínas que posean modificaciones estructurales que promuevan la formación de dímeros o trímeros del RBD, de manera que se podría obtener un antígeno más estable cuya interacción con los anticuerpos Anti-RBD sea mayor.
- Se sugiere estandarizar un protocolo que permita obtener mayores cantidades de RBD, así se podrían realizar ensayos para determinar la cantidad óptima de proteína que se debe imprimir en las placas.
- Se deben ejecutar ensayos con sueros positivos y negativos para anticuerpos contra SARS-CoV-2 para realizar los cálculos estadísticos requeridos para validar la prueba, como la curva estándar y la determinación del cut-off.
- Se debe determinar la especificidad y sensibilidad de la prueba ELISA desarrollada para compararla con pruebas ELISAs comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Achá Alarcón, L., Gonzales-Siles, L., Beck, E., & Iñiguez, V. (2022). Development and performance evaluation of an In-House ELISA for the detection of group A rotavirus in diarrheal stool samples from children and domestic South American camelids. *Journal of Virological Methods*, 301, 114453. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2021.114453>
- Amer, R. M., Samir, M., Gaber, O. A., EL-Deeb, N. A., Abdelmoaty, A. A., Ahmed, A. A., Samy, W., Atta, A. H., Walaa, M., & Anis, R. H. (2021). Diagnostic performance of rapid antigen test for COVID-19 and the effect of viral load, sampling time, subject's clinical and laboratory parameters on test accuracy. *Journal of Infection and Public Health*, 14(10), 1446–1453. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.06.002>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2015.04.012>
- Banerjee, A., Doxey, A. C., Mossman, K., & Irving, A. T. (2021). Unraveling the Zoonotic Origin and Transmission of SARS-CoV-2. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(3), 180–184. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2020.12.002>
- Bursa, F., Yellowlees, A., Bishop, A., Beckett, A., Hallis, B., & Matheson, M. (2020). Estimation of ELISA results using a parallel curve analysis. *Journal of Immunological Methods*, 486, 112836. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2020.112836>
- Büyükköroğlu, G., & Şenel, B. (2018). Engineering monoclonal antibodies: Production and applications. *Omics Technologies and Bio-Engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, 353–389. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>
- Bylicki, O., Delarbre, D., Mayet, A., Ferrier, A., Perisse, A., Malle, C., Cobola, J., Bronstein, A., Menoud, N., Valero-Bianche, E., Ferraris, O., Janvier, F., & Tournier, J. N. (2021). Neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 persists 9 months post symptom onset in mild and asymptomatic patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 112, 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2021.09.002>
- Chen, K.-W. K., Tsung-Ning Huang, D., & Huang, L.-M. (2022). SARS-CoV-2 variants – Evolution, spike protein, and vaccines. *Biomedical Journal*. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2022.04.006>

- Christensen, B. B., Azar, M. M., & Turbett, S. E. (2022). Laboratory Diagnosis for SARS-CoV-2 Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 36(2), 327–347. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2022.02.002>
- Craig, J. C., Parkinson, D., Goatley, L., & Knowles, N. (1989). Assay sensitivity and differentiation of monoclonal antibody specificity in ELISA with different coating buffers. *Journal of Biological Standardization*, 17(3), 281–289. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(89\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0092-1157(89)90020-6)
- Cumberland, W. N., Fong, Y., Yu, X., Defawe, O., Frahm, N., & de Rosa, S. (2015). Nonlinear Calibration Model Choice between the Four and Five-Parameter Logistic Models. <https://doi.org/10.1080/10543406.2014.920345>, 25(5), 972–983. <https://doi.org/10.1080/10543406.2014.920345>
- Datta, P., Ukey, R., Bruiners, N., Honnen, W., Carayannopoulos, M. O., Reichman, C., Choudhary, A., Onyuka, A., Handler, D., Guerrini, V., Mishra, P. K., Dewald, H. K., Lardizabal, A., Lederer, L., Leiser, A. L., Hussain, S., Jagpal, S. K., Radbel, J., Bhowmick, T., ... Gennaro, M. L. (2021). Highly versatile antibody binding assay for the detection of SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 499, 113165. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113165>
- Frumence, E., Lebeau, G., Viranaicken, W., Dobi, A., Vagner, D., Lalarizo Rakoto, M., Sandenon Seteyen, A. L., Giry, C., Septembre-Malaterre, A., Raffray, L., & Gasque, P. (2021). Robust and low-cost ELISA based on IgG-Fc tagged recombinant proteins to screen for anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 495, 113082. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113082>
- Gupta, N., Chaudhry, R., & Thakur, C. K. (2016). Determination of Cutoff of ELISA and Immunofluorescence Assay for Scrub Typhus. *Journal of Global Infectious Diseases*, 8(3), 97. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.188584>
- Hønge, B. L., Hindhede, L., Kaspersen, K. A., Harritshøj, L. H., Mikkelsen, S., Holm, D. K., Nilsson, A. C., Sækmose, S. G., Sørensen, E., Aagaard, B., Hjalgrim, H., Jørgensen, C. S., Krause, T. G., Ullum, H., Pedersen, O. B. V., Ostrowski, S. R., & Erikstrup, C. (2022). Long-term detection of SARS-CoV-2 antibodies after infection and risk of re-infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 116, 289–292. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2022.01.041>

- Hoste, A. C. R., Venteo, A., Fresco-Taboada, A., Tapia, I., Monedero, A., López, L., Jebbink, M. F., Pérez-Ramírez, E., Jimenez-Clavero, M. A., Almonacid, M., Muñoz, P., Guinea, J., Vela, C., van der Hoek, L., Rueda, P., & Sastre, P. (2020). Two serological approaches for detection of antibodies to SARS-CoV-2 in different scenarios: a screening tool and a point-of-care test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *98*(4), 115167. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115167>
- Ibrahim, E. H., Ghramh, H. A., & Kilany, M. (2021). Development of in-house ELISAs for the detection of anti-SARS-CoV-2 RBD and N IgG and IgM antibodies in biological samples. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(4), 101439. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101439>
- Kadam, L., Patel, K., Gautam, M., Thorat, S., Kale, P., Ghule, A. K., Gairola, A., Rao, H., Shinde, Y., Shaligram, U., & Gairola, S. (2019). Development and validation of magnetic bead pentaplex immunoassay for simultaneous quantification of murine serum IgG antibodies to acellular pertussis, diphtheria and tetanus antigens used in combination vaccines. *Methods*, *158*, 33–43. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2019.01.015>
- Krähling, V., Halwe, S., Rohde, C., Becker, D., Berghöfer, S., Dahlke, C., Eickmann, M., Ercanoglu, M. S., Gieselmann, L., Herwig, A., Kupke, A., Müller, H., Neubauer-Rädel, P., Klein, F., Keller, C., & Becker, S. (2021). Development and characterization of an indirect ELISA to detect SARS-CoV-2 spike protein-specific antibodies. *Journal of Immunological Methods*, *490*, 112958. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.112958>
- Lai, X., Gao, G., Watanabe, J., Liu, H., & Shen, H. (2017). Hydrophilic Polyelectrolyte Multilayers Improve the ELISA System: Antibody Enrichment and Blocking Free. *Polymers*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/POLYM9020051>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* *2022 20:5*, *20*(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Lardeux, F., Torrico, G., & Aliaga, C. (2016). Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(8), 501. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160119>

- Lin, C. Y., Wolf, J., Brice, D. C., Sun, Y., Locke, M., Cherry, S., Castellaw, A. H., Wehenkel, M., Crawford, J. C., Zarnitsyna, V. I., Duque, D., Allison, K. J., Allen, E. K., Brown, S. A., Mandarano, A. H., Estep, J. H., Gaur, A. H., Hoffman, J. M., Mori, T., ... McGargill, M. A. (2022). Pre-existing humoral immunity to human common cold coronaviruses negatively impacts the protective SARS-CoV-2 antibody response. *Cell Host and Microbe*, 30(1), 83-96.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2021.12.005>
- Ma, Y., To, D., Zeng, J., Shoute, L. C. T., Wu, M., Babiuk, S., Zhuo, R., Charlton, C., Kanji, J. N., Babiuk, L., & Chen, J. (2022). Improving immunoassay detection accuracy of anti-SARS-CoV-2 antibodies through dual modality validation. *Biosensors and Bioelectronics*: X, 11, 100176. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSX.2022.100176>
- Neurath, A. R. (2008). Immune Response to Viruses: Antibody-Mediated Immunity. *Encyclopedia of Virology*, 56–70. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00591-4>
- Nummer, S. A., Weeden, A. J., Shaw, C., Snyder, B. K., Bridgeman, T. B., & Qian, S. S. (2018). Updating the ELISA standard curve fitting process to reduce uncertainty in estimated microcystin concentrations. *MethodsX*, 5, 304–311. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2018.03.011>
- Olsen, A., Nielsen, H. V., Alban, L., Houe, H., Jensen, T. B., & Denwood, M. (2022). Determination of an optimal ELISA cut-off for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pigs using Bayesian latent class modelling of data from multiple diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 201, 105606. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2022.105606>
- Payne, S. (2017). Immunity and Resistance to Viruses. *Viruses*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00006-4>
- Pettipher, G. L., Jay, J. M., & Wang, H. H. (2004). Microbiological Techniques. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00374-5>
- Sahu, A., Dhanze, H., Singh, V., Mehta, D., Gupta, M., Singh, M., Vinod, V. K., & Gulati, B. R. (2022). Development of IgM-ELISA for diagnosis of recent infection of

- Japanese encephalitis virus in equines. *Biologicals*, 75, 16–20. <https://doi.org/10.1016/J.BIOLOGICALS.2022.01.001>
- Salgado, A., Cheung, A., Schibrowski, M. L., Wawegama, N. K., Mahony, T. J., Stevenson, M. A., Browning, G. F., Barnes, T. S., & Firestone, S. M. (2022). Bayesian latent class analysis to estimate the optimal cut-off for the MilA ELISA for the detection of *Mycoplasma bovis* antibodies in sera, accounting for repeated measures. *Preventive Veterinary Medicine*, 105694. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2022.105694>
- Sekirov, I., Barakauskas, V. E., Simons, J., Cook, D., Bates, B., Burns, L., Masud, S., Charles, M., McLennan, M., Mak, A., Chahil, N., Vijh, R., Hayden, A., Goldfarb, D., Levett, P. N., Krajden, M., & Morshed, M. (2021). SARS-CoV-2 serology: Validation of high-throughput chemiluminescent immunoassay (CLIA) platforms and a field study in British Columbia. *Journal of Clinical Virology*, 142, 104914. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2021.104914>
- Shi, A. C., & Ren, P. (2021). SARS-CoV-2 serology testing: Progress and challenges. *Journal of Immunological Methods*, 494, 113060. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113060>
- Shrivastava, N., Kumar, J. S., Yadav, P., Sharma, S., Shete, A. M., Jain, R., Shrivastava, A., & Dash, P. K. (2022). Development and evaluation of indirect antibody ELISA assay for early diagnosis and surveillance of Crimean-Congo hemorrhagic fever infection in humans. *Virus Research*, 313. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2022.198717>
- Sykes, J. E., & Rankin, S. C. (2014). Immunoassays. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00002-8>
- Toyoshima, Y., Nemoto, K., Matsumoto, S., Nakamura, Y., & Kiyotani, K. (2020). SARS-CoV-2 genomic variations associated with mortality rate of COVID-19. *Journal of Human Genetics* 2020 65:12, 65(12), 1075–1082. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0808-9>
- Vieira, T., Cunha, S., & Casal, S. (2015). Analysis of the Mycotoxin Ochratoxin A in Coffee. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 1023–1031. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00112-1>

Villafañe, L., Vaulet, L. G., Viere, F. M., Klepp, L. I., Forrellad, M. A., Bigi, M. M., Romano, M. I., Magistrelli, G., Fermepin, M. R., & Bigi, F. (2022). Development and evaluation of a low cost IgG ELISA test based in RBD protein for COVID-19. *Journal of Immunological Methods*, 500, 113182. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113182>

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. (n.d.). Retrieved June 16, 2022, from <https://covid19.who.int/>

Zanella, I., Degli Antoni, M., Marchese, V., Castelli, F., & Quiros-Roldan, E. (2022). Non-neutralizing antibodies: deleterious or propitious during SARS-CoV-2 infection? *International Immunopharmacology*, 108943. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2022.108943>