



ANÁLISE DO POTENCIAL USO DO ANTÍGENO ORF8 COMO INSUMO IMUNOBIOLOGICO PARA TESTES DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA COVID-19

DIAGO DUTRA LIMA¹; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA²; MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES³; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴; ANGELA NUNES MOREIRA⁵

¹*Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – luizamariliana@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.b*

1. INTRODUÇÃO

SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) é um vírus de RNA envelopado que pertence ao subgênero Sarbecovirus gênero Betacoronavirus. Em dezembro de 2019 este vírus foi apontado como o responsável pela pandemia de COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) que já causou a morte e infecção de 4,192 milhões e 196 milhões de pessoas, respectivamente (Johns Hopkins University & Medicine 2021). Uma das características relevantes desta nova doença é a presença de pacientes assintomáticos com alta carga viral, o que contribui para a sua alta taxa de transmissão (WANG et al 2020, ZUH et al 2020).

Portanto, estratégias que permitam a identificação de indivíduos infectados são importantes no enfrentamento à pandemia e a detecção de isótipos específicos do soro fornece informações importantes sobre o curso de infecção do vírus. Além disso, testes sorológicos quantitativos, tais como o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, devem desempenhar um papel importante na avaliação dos níveis de anticorpos produzidos após o contato direto com o vírus, determinando sua durabilidade e identificando limites de proteção.

Atualmente, as principais proteínas utilizadas em testes de diagnóstico da COVID-19 são as proteínas S (*spike protein*) e N (*nucleoprotein*) (WANG et al 2020; HACHIM et al 2020), mas anticorpos anti-S e anti-N não podem ser detectados nos estágios iniciais da doença. Assim, estudos têm sugerido que a produção de anticorpos anti-ORF8 é mais precoce do que a de anticorpos anti-N (WANG et al 2020). ORF8 é uma proteína extracelular exclusiva de SARS-CoV-2, relatada como altamente imunogênica em pacientes positivos para COVID-19, e com soropositividade precoce para IgG, IgM e IgA (WANG et al 2020).

Os抗ígenos comerciais disponíveis para uso em testes de diagnósticos são produzidos em células eucarióticas, cuja produção é cara e demorada, com grande chance de contaminação. Uma alternativa a este processo são as expressões em *E. coli*, mais baratas e com pleoras de artigos aperfeiçoando seu uso.

Logo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial da ORF8 recombinante produzida em *E. coli* no diagnóstico sorológico de COVID-19 por método de ELISA. Para isso, o antígeno recombinante purificado foi utilizado na diferenciação de soros COVID-19 positivos para COVID-19 de pacientes brasileiros.



2. METODOLOGIA

Para avaliar o potencial de diagnóstico do antígeno recombinante ORF8, soros de pacientes positivos para infecção de SARS-CoV-2, segundo a técnica padrão ouro de diagnóstico da COVID-19 *Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR* (RT-qPCR), foram coletados no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL). As amostras de soro negativas foram adquiridas de indivíduos saudáveis antes pandemia de COVID-19 (2004 – 2019), gentilmente cedidas pela Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Todos os participantes concordaram em participar desse estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para a expressão, a cepa usada foi *E. coli* BL21 (DE3) Star. O plasmídeo usado foi o pET28a, no qual a sequência de nucleotídeos que codificam para ORF8 foi inserida após a otimização de códons para a expressão em *E. coli*. Foi feita transformação por choque térmico e cultivo em caldo Luria Bertania a 37°C. Quando a cultura apresentou DO_{600nm} = 0,6-0,8, a expressão foi induzida com IPTG 0,5 M por 3 horas. O produto da expressão foi purificado e confirmado por SDS-PAGE (12%).

O ELISA indireto foi realizado. Após a otimização de tal, placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Nunc Immuno Maxisorp, Thermo Fischer Scientific, EUA) foram revestidas com o antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (100 µL/poço), e incubadas a 4 °C durante a noite. Para remoção do antígeno não adsorvido, as placas foram lavadas (em lavadora automática série 50TS, BioTek) utilizando PBS-T. Posteriormente, fez-se o bloqueio dos poços com 100 µL de solução de leite em pó a 5% (w/v) (Elegê, Brazil) diluído em PBS-T, seguido de incubação (1 h a 37 °C). As placas foram novamente lavadas conforme descrito anteriormente, adicionadas de 100 µL de soro em triplicata e incubadas a 37°C por 1 h.

Foram utilizados 31 soros (15 positivos e 16 negativos para COVID-19). Após a lavagem, os poços foram incubados (37 °C por 1 hora) com anticorpo monoclonal anti-IgG conjugado com enzima peroxidase (Invitrogen™) diluídos em PBS-T. Após uma etapa de lavagem final, a solução de revelação com substrato de dicloridrato de o-fenilenodiamina (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionada e incubada no escuro por 15 min (temperatura ambiente). A reação foi interrompida com solução de parada (3% v/v ácido sulfúrico) e a densidade óptica a 492nm (OD_{492nm}) foi medida usando espectrofotômetro (Biocrom EZ Read 400, Reino Unido). De modo a remover reações de fundo, a absorbância (OD) das amostras foram subtraídas da absorbância do poço em branco (sem soro).

A acurácia dos testes foi avaliada por curva ROC. A diferença de absorbância entre soros positivos e negativos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Um valor de p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad PRISM.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O antígeno ORF8 foi expresso com sucesso, purificado e avaliado em gel de SDS-PAGE.

Nas condições avaliadas, o antígeno ORF8 não foi capaz de diferenciar soros positivos de negativos, ou seja, não houve diferença significativa entre a OD_{492nm} obtida de soros positivos e negativos ($p = 0,0597$) e o ELISA indireto utilizando o antígeno ORF8 apresentou uma baixa sensibilidade (33,33%) (Tabela 1, Figura 1). Entretanto, o ELISA utilizando o antígeno ORF8 apresentou uma elevada especificidade, de 93,75%, e a AUC (*Area Under the Curve*) do antígeno foi de 0,7 (Tabela 1, Figura 2), valor considerado aceitável (“*acceptable discrimination*”) segundo Hosmer, Lemeshow e Sturdivant (2013). A curva ROC compara os valores de sensibilidade e especificidade encontrados. Segundo a curva, consegue-se estipular o AUC do antígeno. Quanto mais próximo do valor de 1 mais exato o teste é, ou seja, amostras positivas são mostradas como tal e negativas também, e quanto mais longe de 1, menos confiável o teste é. Wang et al (2020) detectou IgG anti-ORF8 em todos os soros positivos (29 amostras). Os soros foram coletados do dia 0 de hospitalização até o dia 8. As informações coletadas nos testes deles os permitiram afirmar que o antígeno ORF8 pode ser usado como ferramenta imunológica. O estudo de Wang et al (2020) utilizou a proteína ORF8 expressa em Expi293 (*Thermo Fisher Scientific*)

Tabela 1: Performance do ELISA indireto utilizando o antígeno ORF8 e soros negativos e positivos confirmados por RT- qPCR para COVID-19 avaliada por testes estatísticos e pela curva ROC .

Performance do antígeno	Resultados
AUC (95% confidence interval)	0,7 (0,51— 0,89%)
Sensibilidade (95% CI)	33,33 (11,82% — 61,62%)
Especificidade (95% CI)	93,75 (69,77% — 99,84%)

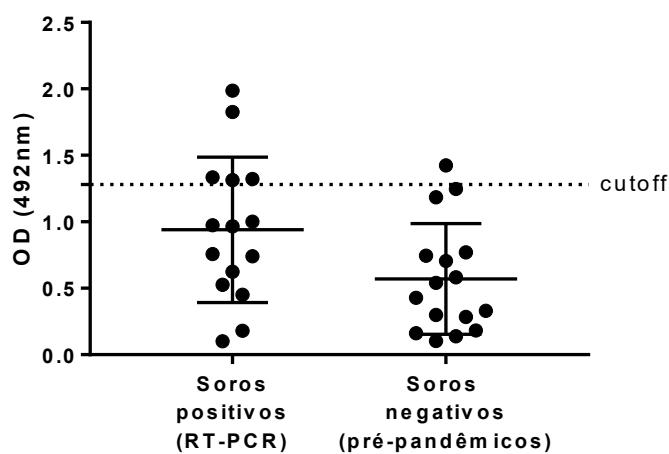


Figura 1: Comparação entre os valores de OD_{492nm} encontrados no teste de ELISA indireto e soros negativos e positivos confirmados por RT-qPCR para COVID-19 observada para avaliar a sensibilidade e especificidade do teste.

Os resultados de sensibilidade encontrados no presente estudo diferem dos encontrados na literatura. Segundo Hachin et al. (2020), o antígeno ORF8 demonstrou níveis de sensibilidade de 100% nos testes realizados pela técnica *luciferase immunoprecipitation sistem* (LISP), resultado bem superior ao encontrado no presente estudo, o qual apontou uma sensibilidade de 33,33%. Entretanto, no presente estudo foram testados apenas 15 soros, enquanto Hachin et al. (2020) testaram 84 amostras, o que pode ter sido um limitante na nossa comparação.

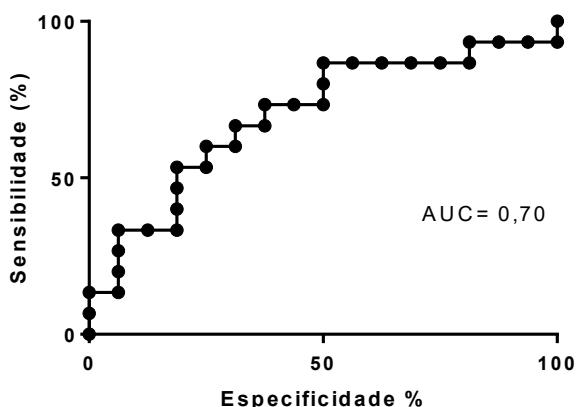


Figura 2: Curva tipo ROC obtida após o ELISA indireto utilizando o antígeno ORF8 e soros negativos e positivos confirmados por qRT- PCR para COVID-19.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, o antígeno ORF8 não demonstrou ser potencialmente aplicável como imunobiológico em testes de diagnóstico da COVID-19 quando testado em ELISA indireto e com soros positivos para COVID-19 brasileiros, contrariando as literaturas que fundamentaram o presente estudo. Entretanto, somente 15 amostras positivas foram utilizadas.

Agradecemos os órgãos de fomento FAPERGS e CNPq, o HE-UFPEL e a FURG pelo apoio na execução desse estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Paules, C. I., Marston, H. D. & Fauci, A. S. Coronavirus infections—more than just the common cold. *JAMA* Harrisburg, EUA DOI 10.1001/jama.2020.0757. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2759815>
- Johns Hopkins University & Medicine (JHU) 2021. **Coronavirus Resource Center global map**. Baltimore, Maryland, USA <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- HACHIM, Asmaa et al. ORF8 and ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology*, Hong Kong, China, v. 21, p. 1293-1301, 17 ago. 2020.
- HOSMER, David W.; LEMESHOW, Stanley; STURDIVANT, Rodney X. **Applied Logistic Regression**. 3. ed. [S. I.:s. n.], 2013.
- WANG, Xiaohui et al. Accurate Diagnosis of COVID-19 by a Novel Immunogenic Secreted SARS-CoV-2 orf8 Protein. *American Society for Microbiology*, Hong Kong, China, 20 out. 2020. DOI 10.1128/mBio.02431-20. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02431-20>. Acesso em: 14 jul. 2021.
- World Health Organization. 2020. **WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard**. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://covid19.who.int/>.
- ZHU, Na et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, Wuhan- China, 24 jan. 2020. DOI 10.1056/nejmoa2001017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2001017>. Acesso em: 18 jul. 2021.