

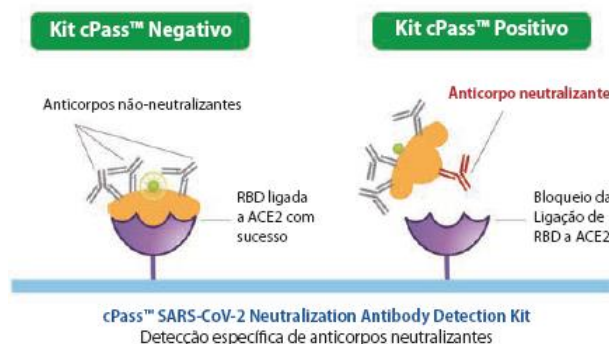
Nota técnica sobre novas variantes SARS CoV-2 e impacto no kit cPass SARS CoV-2 neutralizing antibody

Fevereiro de 21

Com o início da Campanha de Imunização Nacional contra o vírus SARS CoV-2 e a divulgação de novas cepas circulantes sequenciadas, a NL Diagnóstica vem esclarecer aos seus clientes que o **cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit** mantém sua eficácia mesmo com o aparecimento das novas cepas.

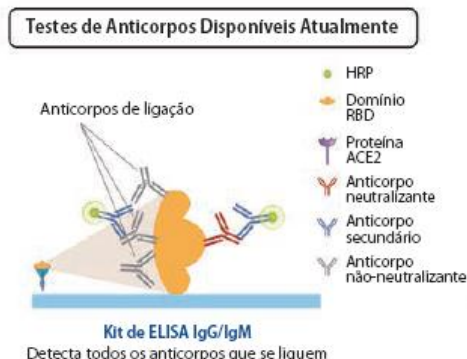
O ensaio de metodologia ELISA é o primeiro ensaio funcional, capaz de substituir um ensaio de metodologia Neutralização Viral em Placa (PRNT) para SARS-CoV-2. Então o mais correto seria compará-lo ao PRNT e não aos demais ensaios sorológicos para detecção de anticorpos ligantes (ligação a epítopos específicos, mas não da capacidade neutralizante). Diferente da maioria dos testes no mercado, o c-Pass detecta a capacidade de um anticorpo em bloquear (neutralizar) a entrada do vírus na célula pela via de interação RBD-ACE-2, via responsável pela infecção viral. Veja a seguir o esquema ilustrativo do princípio do teste c-Pass e dos demais kits sorológicos.

c-Pass:



Quando não há anticorpos neutralizantes, o RBD se liga ao receptor celular humano (ACE-2), mimetizando a infecção da célula humana. Na presença de anticorpos com capacidade neutralizante, essa ligação é bloqueada, neutralizando a infecção celular, daí o nome "anticorpo neutralizante".

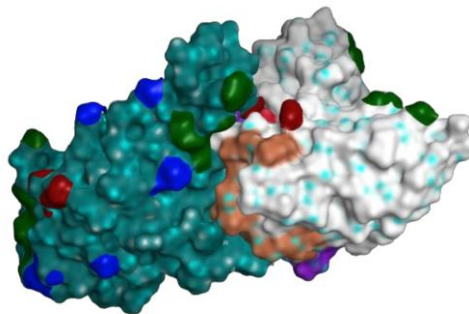
Demais kits sorológicos:



São detectados todos os anticorpos que se ligam, mas nem todos têm a capacidade de neutralização.

No kit c-Pass são utilizadas as proteínas da terminação RBD da proteína S1 da cepa original de Wuhan conjugadas com peroxidase para que o soro do paciente seja testado. No próximo passo, esse soro com conjugado é transferido para a microplaca do kit c-Pass, a qual é recoberta com ACE-2 humano (receptor celular)

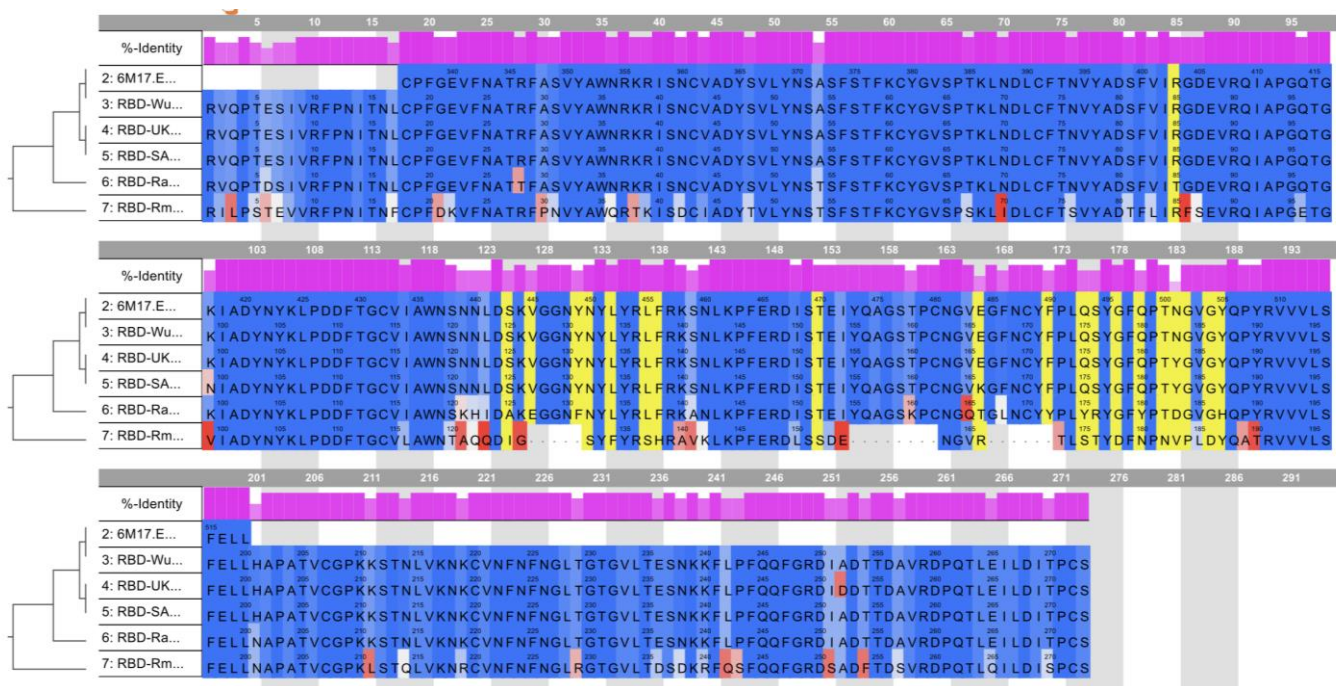
Desenvolvido pela GenScript e aprovado pelo FDA e pela ANVISA ainda em 2020, o kit utiliza a porção RBD da proteína S1 identificada originalmente na primeira cepa caracterizada de Wuhan, não sendo direcionado contra apenas um epítipo específico (representados por pontos coloridos na porção verde da imagem a seguir).



Representação esquemática do complexo S1-RBD e ACE-2, sendo a porção em branco representativa do receptor.

Com relação às novas cepas, o fabricante GenScript já realizou uma pesquisa com modelagem computacional. Vale salientar que a GenScript é uma empresa que tem em sua equipe excelentes cientistas e historicamente é extremamente reconhecida na área de desenvolvimento de primers e pesquisa científica.

A seguir, apresentamos as sequências de aminoácidos de diferentes cepas de SARS-Cov-2 circulantes. Em amarelo, destacamos os aminoácidos que na estrutura quaternária formam o sítio de ligação do RBD ao ACE-2. Repare o quanto são conservados os mesmos aminoácidos nas diferentes cepas:



Sequenciamento de aminoácidos da região RBD. Linha 3: Cepa de Wuhan (RBD-Wuhan-HU1); Linha 4: Cepa descoberta na Inglaterra (RBD-UK-B117); Linha 5: Cepa descoberta na África do sul (RBD-SA-501-V2). cepas menos comuns, prevalente em morcegos: Linha 6: Cepa RBD-RaTG13 e; Linha 7: Cepa RBD-RmYN02).

Em análise “*in silico*” (modelagem computacional), as mutações da sequência de aminoácidos presentes no sítio de ligação (evidenciado em amarelo na figura anterior) foram comparadas com a cepa original, quanto à estabilidade e afinidade. As 3 cepas circulantes entre humanos são muito parecidas nestes sítios (3, 4 e 5), enquanto as que mais divergem são as de morcego (RBD-RaTG13 e RBD-RmYN02):

mutation	dAffinity	dStability	RBD-Wuhan-HU1	RBD-UK-B117	RBD-SA-501-V2	RBD-RaTG13	RBD-RmYN02	mutation	dAffinity	dStability	RBD-Wuhan-HU1	RBD-UK-B117	RBD-SA-501-V2	RBD-RaTG13	RBD-RmYN02
1:R403R	0.00000	0.00000	1					1:Q493Q	0.00000	0.00000	1				
1:R403T	2.54616	1.64353	1			1		1:Q493Y	0.12853	-0.20797				1	
1:S443S	0.00000	0.00000	1					1:Q493S	3.80278	1.56762					1
1:S443A	0.00712	0.44050				1		1:S494S	0.00000	0.00000	1				
1:S443I	-0.48690	0.06957					1	1:S494R	-1.31225	-0.40689				1	
1:V445V	0.00000	0.00000	1					1:S494T	2.51409	0.28273					1
1:V445E	-0.05128	0.64433				1		1:G496G	0.00000	0.00000	1				
1:Y449Y	0.00000	0.00000	1					1:G496D	3.95179	1.08881					1
1:Y449F	1.54318	-0.06402				1		1:Q498Q	0.00000	0.00000	1				
1:N450N	0.00000	0.00000	1					1:Q498Y	-0.37417	-0.13248				1	
1:N450S	-2.22704	-0.43480					1	1:Q498N	2.63281	1.05966					1
1:L452L	0.00000	0.00000	1					1:T500T	0.00000	0.00000	1				
1:L452F	-1.85592	0.67914					1	1:T500N	-1.48191	0.09541					1
1:L455L	0.00000	0.00000	1					1:N501N	0.00000	0.00000	1				
1:L455S	2.94680	1.37065					1	1:N501Y	-0.20838	0.29124		1	1		
1:F456F	0.00000	0.00000	1					1:N501D	0.56460	0.84568					
1:F456H	-0.70906	1.63534					1	1:N501V	0.16666	0.19578					
1:T470T	0.00000	0.00000	1					1:G502G	0.00000	0.00000	1				
1:T470S	-0.06713	0.99457					1	1:G502P	-0.18032	0.85035					1
1:E484E	0.00000	0.00000	1					1:G504G	0.00000	0.00000	1				
1:E484K	-0.27639	1.23813			1			1:G504D	0.48814	1.30883					1
1:F490F	0.00000	0.00000	1					1:Y505Y	0.00000	0.00000	1				
1:F490Y	0.22525	0.74939					1	1:Y505H	0.98894	1.02570				1	

As maiores variações ocorrem com as cepas de morcego. Por isso foram escolhidas para teste com o c-Pass para verificação de neutralizantes. Anteriormente, Andersen et. al (2020) discutiram que o RBD da cepa RaTG13, mesmo sendo cerca de 96% idêntico ao SARS-CoV-2, poderia não se ligar de forma eficiente ao ACE2 humano. Recentemente, Wacharapluesadee et. al (2021), verificaram que o anti-soro gerado contra o domínio de ligação ao receptor (RBD) de RmYN02 foi capaz de neutralização cruzada ao SARS-CoV-2, apesar do fato de que o RBD de RacCS203 ou RmYN02 ter falhado na ligação ao ACE2.

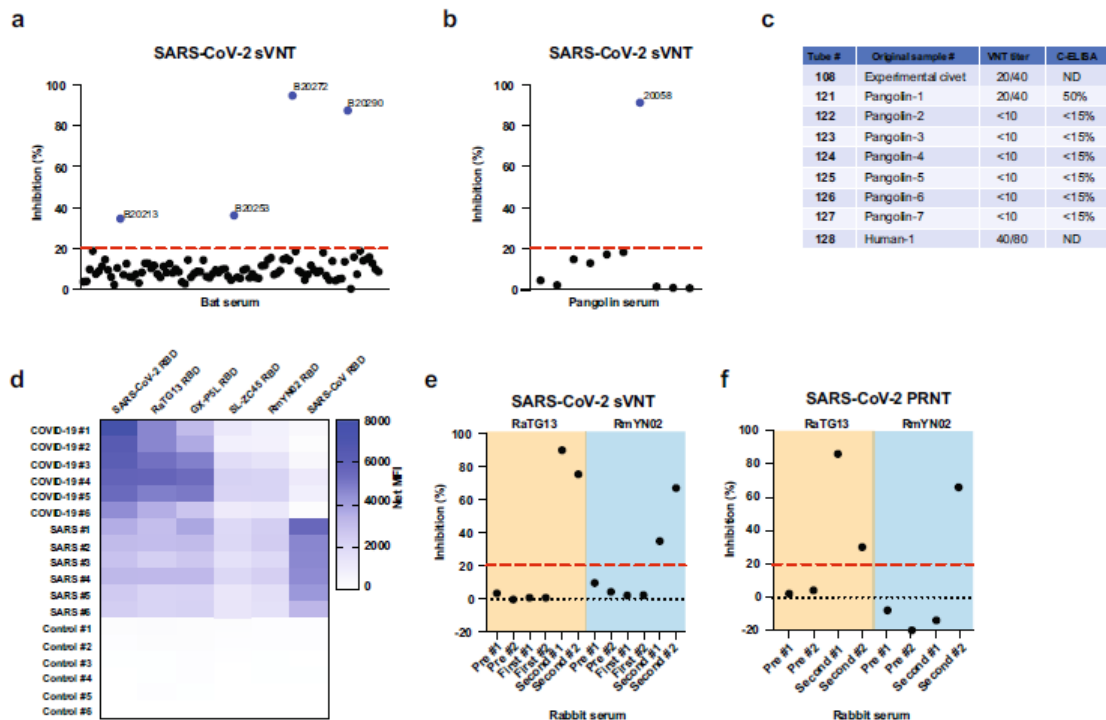


Fig. Investigação sorológica. **a.** resultado de neutralização com soros de morcegos na Tailândia testados com c-Pass. **b** resultado de neutralização com soros de pangolim na Tailândia SARS-CoV-2 sVNT. **c** Teste de SARS-CoV VNT e C-ELISA para amostras de soro de pangolim originários do Sudeste Asiático. **d** Estudo de ligação Multiplex-RBD para examinar a reatividade cruzada antigênica entre soros humanos e diferentes RBDs. **e** Ensaio SARS-CoV-2 sVNT para examinar a capacidade de neutralização cruzada de diferentes soros anti-RBD de coelho. Os dados indicam a porcentagem de inibição na diluição de 1:20. **f** Ensaio SARS-CoV-2 PRNT para examinar a capacidade de neutralização cruzada de diferentes soros de coelho anti-RBD. Os dados indicam a porcentagem de inibição na diluição de 1:10. A linha pontilhada vermelha indica corte com inibição de 20%. Pré indica soros pré-imunizados; Primeiro e Segundo indicam soros obtidos após a primeira imunização e segunda imunização, respectivamente. Todos os gráficos e mapas de calor apresentados foram gerados usando GraphPad Prism 8. (Imagem dos resultados gentilmente cedida pelos autores Lin-Fa Wang, Chee Wah Tan e Wan Ni Chia, do artigo de Wacharapluesadee et. al (2021))

O kit c-Pass foi capaz de identificar a positividade para anticorpos neutralizantes contra as cepas de morcego, que apresentaram a maior variação de afinidade, indicando que, frente às novas cepas de origem Sul Africana e inglesa, cujas mutações são menos significativas em relação à cepa original, também têm anticorpos neutralizantes detectados pelo kit. Esses estudos corroboram com a permanência da aplicabilidade e adequação do **cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit** frente às novas variantes.

Nota: Lin-Fa Wang, Chee Wah Tan e Wan Ni Chia, do artigo de Wacharapluesadee et. al (2021) são inventores de um pedido de patente para o SARS-CoV-2 sVNT, que foi comercializado pela GenScript Biotech sob o nome comercial c-Pass™.

Referências:

- Andersen et. al (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v.26, n.April, pp. 450–455, 2020.
- Wacharapluesadee, S.; Tan, C.W.; Maneeorn, P. *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nature Communications** , 12, 972 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21240-1>

Nota técnica informativa sem caráter oficial elaborada pela equipe de Assessoria Científica da NL Diagnóstica. Fevereiro de 2021.