


## ANEXO B – POP ELISA murino

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001
		Edição	1
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021
		Página	1 de 4

**Objetivo:**

Orientar e execução do teste de ELISA para detecção de IgG anti-RBD em soro de camundongos.

**Materiais e Reagentes:**

- Placa simples para diluição;
- Placa de alta adsorção para ELISA (Corning);
- Tubos do tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- RBD recombinante;
- PBS 1X;
- PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (500 mL de PBS + 250 uL de Tween 20);
- PBS 1X + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 (50 mL de PBS + 1 g de BSA + 25 µL de Tween);
- Anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a HRP;
- TMB (substrato para peroxidase);
- HCl 1 N (45,8 mL de H<sub>2</sub>O destilada + 4,2 mL de HCl 37%);
- Micropipetas e ponteiras;
- Espectrofotômetro com filtro para leitura em 450 nm.

**Controle de Qualidade:**

Manter no mínimo 2 soros controle positivos, 5 soros controle negativos e 2 brancos por placa.

**Descrição do Procedimento:****Sensibilização**

1. Adicionar 50 µL por poço de solução de RBD em PBS na concentração de 1 µg/mL;
2. Rotacionar a placa por 1 min ~300 g para garantir que o fundo dos poços sejam cobertos homogeneamente com a solução protéica;
3. Incubar *overnight*, em geladeria (2-8°C);
4. Descartar a solução de proteína e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

**Bloqueio**

5. Adicionar 150 µL por poço da solução de bloqueio (PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20) à placa;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001
		Edição	1
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021
		Página	2 de 4

6. Incubar em temperatura ambiente por 1 hora;

#### Incubação com as amostras

7. Centrifugar as amostras a 14.000 *g* por 10 min para retirar resíduos de fibrina (podem interferir na reação);
8. Diluir os soros em PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 em placas simples para diluição:
  - **Triagem:** Diluir amostras 1:100.
9. Descartar o PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;
10. Transferir 50  $\mu$ L dos soros diluídos para a placa de ELISA;
11. Incubar por 2 h a temperatura ambiente;

12. Lavar a placa 3x com aproximadamente 200  $\mu$ L de solução de lavagem/poço (PBS 1x + 0,05% de Tween 20), usando uma pisseta;

13. Bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

#### Incubação com o anticorpo secundário

14. Preparar o anticorpo secundário anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling cód.: 7076S 1:5.000) em PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20;
15. Adicionar 50  $\mu$ L/poço da solução de anticorpo secundário diluída;
16. Incubar por 1,5 horas a temperatura ambiente;
17. Lavar a placa 3x com aproximadamente 200  $\mu$ L de solução de lavagem/poço (PBS 1x + 0,05% de Tween 20), usando uma pisseta;
18. Bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

#### Adição do substrato

19. Adicionar 50  $\mu$ L/poço do substrato TMB Scienco;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001
		Edição	1
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021
		Página	3 de 4

20. Contar 10 minutos a partir da adição no primeiro poço;  
 → monitorar a reação, comparando o branco com o controle negativo e positivo;

**Parada da reação**

21. Adicionar 50 µL/poço de HCl 1 N para parar a reação;  
 22. Ler a absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro.


**Comentários:**

- Fazer todas as incubações em câmara úmida (pote plástico com algodão ou papel molhado no fundo, a fim de evitar perda do líquido por evaporação);
- Utilizar o TMB da Scienco (cód.: S1TMB) que desenvolve a reação enzimática mais lentamente;
- O ponto de corte será calculado através da média das amostras controle negativas + 3x o seu desvio padrão.

**Normas de segurança:**

Utilizar luvas de procedimento e jaleco para todas as etapas do procedimento.

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021


	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021	
		Página	4 de 4	

**ANEXO A:****Sugestão de desenho de placa para Triagem:**

Soro controle positivo 1	Soro controle positivo 2	Soro Controle negativo 1	Soro Controle negativo 2	Soro Controle negativo 3	Soro Controle negativo 4	Soro Controle negativo 5	Branco (Sem soro)	Branco (Sem soro)	Soro teste 1	Soro teste 2	Soro teste 3
Soro teste 4	...										

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicolí De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

## ANEXO C – POP ELISA humano

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti- SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	1 de 4	

**Objetivo:**

Orientar e execução do teste de ELISA para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 em soro humano.

**Materiais e Reagentes:**

- Placa simples para diluição;
- Placa de alta adsorção para ELISA (*Nunc Maxisorp*);
- Tubos do tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- Spike recombinante;
- PBS 1X;
- PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (500 mL de PBS + 250 µL de Tween 20);
- PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20 (50 mL de PBS + 1 g de BSA + 25 µL de Tween);
- Anticorpo secundário anti-human IgG conjugado a HRP;
- TMB (substrato para peroxidase);
- HCl 1 N (45,8 mL de H<sub>2</sub>O destilada + 4,2 mL de HCl 37%);
- Micropipetas e ponteiros;
- Espectrofotômetro com filtro para leitura em 450 nm.

**Controle de Qualidade:**


Manter no mínimo 2 soros controle positivos, 8 soros controle negativos e 2 brancos por placa.

**Descrição do Procedimento:**

**Sensibilização**

1. Adicionar 50 µL por poço de solução de antígeno em PBS
  - Spike na concentração de 3 µg/mL;
  - RBD na concentração de 1 µg/mL;
2. Rotacionar a placa por 1 min ~300 g para garantir que o fundo dos poços sejam cobertos homogeneamente com a solução protéica;
3. Incubar *overnight*, em geladaria (2-8°C);
4. Descartar a solução de proteína;
5. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com  $\cong$ 200 µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	2 de 4	

#### Bloqueio

6. Adicionar 150 µL por poço da solução de bloqueio (PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20) à placa;
7. Incubar em temperatura ambiente por 2 horas;
8. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com  $\cong 200$  µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;


#### Incubação com as amostras

9. Centrifugar as amostras a 14.000 g por 10 min para retirar resíduos de fibrina (podem interferir na reação);
10. Diluir os soros em PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20 em placas simples para diluição:
  - ➔ Diluir amostras 1:100.
11. Descartar PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20;
12. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com  $\cong 200$  µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;
13. Transferir 50 µL dos soros diluídos para a placa de ELISA;
14. Incubar por 2 h a temperatura ambiente;
15. Lavar a placa 5x, com auxílio de uma pisseta, com  $\cong 200$  µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as 4 primeiras lavagens e 5 min na última e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

#### Incubação com o anticorpo secundário

16. Preparar o anticorpo secundário a anti-human IgG-horseradish peroxidase (HRP) (Invitrogen cód.: A18811 1:5.000) em PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	3 de 4	

17. Adicionar 50 µL/poço da solução de anticorpo secundário diluída;

18. Incubar por 1,5 horas a temperatura ambiente;

19. Lavar a placa 5x, com auxílio de uma pisseta, com  $\cong 200$  µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as 4 primeiras lavagens e 5 min na última e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

**Adição do substrato**

20. Adicionar 50 µL/poço do substrato TMB Scienco;

21. Contar 5 minutos a partir da adição no primeiro poço;

→ monitorar a reação, comparando o branco com o controle negativo e positivo;

**Parada da reação**

22. Adicionar 50 µL/poço de HCl 1 N para parar a reação;

23. Ler a absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro.


**Comentários:**

- Fazer todas as incubações em câmara úmida (pote plástico com algodão ou papel molhado no fundo, a fim de evitar perda do líquido por evaporação);
- Utilizar o TMB da Scienco (cód.: S1TMB) que desenvolve a reação enzimática mais lentamente;
- O ponto de corte será calculado através da média das amostras controle negativas + 3x o seu desvio padrão.


**Normas de segurança:**

Utilizar luvas de procedimento e jaleco para todas as etapas do procedimento.

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	4 de 4	

## ANEXO A:

 Sugestão de desenho de placa:

Soro controle positivo 1	Soro controle positivo 2	Soro Controle negativo 1	Soro Controle negativo 2	Soro Controle negativo 3	Soro Controle negativo 4	Soro Controle negativo 5	Soro Controle negativo 6	Soro Controle negativo 7	Soro Controle negativo 8	Branco (Sem soro)	Branco (Sem soro)
Soro teste 1	Soro teste 2	Soro teste 3	Soro teste 4	...							

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021