

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Implementación de un diagnóstico tipo ELISA para detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV-2.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Alcivar Molina María Michelle

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

A mis padres que me han encaminado toda la vida a seguir mis sueños. Quienes me han demostrado que, con amor y esfuerzo, todo lo que uno se propone se puede lograr. A mis hermanos y mis mejores amigos con quienes he compartido momentos que guardo de manera permanente en mi alma.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas por compartir sus instalaciones para realizar este proyecto. A su equipo de trabajo, quienes me han brindado experiencia profesional. A mi tutor Washington B. Cárdenas, Ph.D, quien me ha impartido conocimientos y ha sido un gran guía en este camino.

Agradezco a ESPOL, a sus maestros, de quienes he obtenido una educación de calidad y me han permitido crecer profesionalmente en esta etapa de mi vida.

Agradezco a mis grandes amistades de la carrera, me emociona que juntas estamos culminando esta etapa de manera exitosa, ha sido un gran viaje.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *María Michelle Alcivar Molina*, 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”



María Michelle Alcivar
Molina

EVALUADORES

.....
Diego Gallardo Polit, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Washington B. Cárdenas, Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Con la aparición del COVID-19 se evidenció una escasez de reactivos y pruebas por la demanda de diagnósticos contra esta enfermedad. Por otro lado, con la vacunación surgió la necesidad de un seguimiento de la inmunidad de la población. Por esta razón se busca implementar un diagnóstico tipo ELISA localmente que detecte los anticuerpos contra la espícula de este virus. Propuesta que cumple con el objetivo de Salud y Bienestar de la ONU, y permitirá estar preparado ante la necesidad de dosis de refuerzo y de diagnósticos de futuras variantes.

Se escogió una región de la espícula, y se clonó en un vector adecuado para células de mamíferos. Se transfectó en células HEK293. Se realizaron dos Western Blots, probando un Anti-Flag y un suero positivo contra el virus.

La construcción del plásmido fue obtenida de manera exitosa, y comprobada por secuenciación. La proteína fue detectada solo por el suero positivo contra el virus, sin embargo, su tamaño fue menor al que se esperaba. Para el diseño del ensayo tipo ELISA se establecieron las variables a tomar en cuenta, y se propuso un ensayo base.

La obtención de construcción genética y el diseño del ELISA representan un gran avance para la implementación de este inmunodiagnóstico de manera local, el cual encaminará al Ecuador a la soberanía sanitaria que necesita.

Palabras Clave: COVID-19, ELISA, SARS-CoV-2, proteína recombinante, diagnóstico

ABSTRACT

The emergence of COVID-19 led to a shortage of reagents and tests due to the demand for diagnostics against this disease. On the other hand, along with vaccination, there is a need to follow up the immunity of the population. For this reason, an ELISA type diagnosis is sought to be implemented locally to detect antibodies against the Spike of this virus. This proposal fulfills the objective of Good Health and Well Being of the UN and will allow to be prepared for the need of booster doses and diagnosis of future variants.

A region of the spike was selected and cloned into a vector suitable for mammalian cells. It was transfected into HEK293 cells. Two Western Blots were performed, testing an Anti-Flag and a positive serum against the virus.

The plasmid construct was successfully obtained and verified by sequencing. The protein was detected only by the virus-positive serum; however, its size was smaller than expected. For the design of the ELISA assay, the variables to be considered were established, and a base assay was proposed.

The obtaining of the genetic construct and the design of the ELISA represent a great achievement for the implementation of this immunodiagnostic locally, which will lead Ecuador to the sanitary sovereignty the country needs.

Keywords: COVID-19, ELISA, SARS-CoV-2, recombinant protein, diagnostic

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
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 Generalidades de SARS-CoV-2	2
1.4.2 Características de la proteína Spike (espícula)	4
1.4.3 Vacunas para SARS-CoV-2 administrada en Ecuador	4
1.4.4 Componentes de proteínas recombinantes para ensayos tipo ELISA.....	6
1.4.5 Ensayos tipo ELISA para diagnóstico de anticuerpos contra SARS-CoV-2	7
CAPÍTULO 2.....	8
2. Metodología.....	8
2.1 Construcción de la proteína recombinante de la espícula de SARS-CoV-2.....	8
2.1.1 Amplificación de región de interés.....	8
2.1.2 Digestión/ligación del inserto purificado y el vector escogido	9
2.1.3 Transformación y extracción del plásmido de interés.....	11

2.2	Transfección y expresión de la proteína recombinante en células de mamífero	12
2.3	Purificación de proteínas	13
2.4	Diseño experimental de ensayos ELISA para la detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV2:.....	13
CAPÍTULO 3.....		15
3.	Resultados y análisis.....	15
3.1	Clonación del gen que expresa la región de la espícula	15
3.2	Secuenciación del plásmido purificado.....	16
3.3	Detección de la proteína expresada.....	18
3.4	Diseño del ensayo ELISA.....	20
3.5	Viabilidad del proyecto.....	21
BIBLIOGRAFÍA		25

ABREVIATURAS

COVID-19	Corona Virus Disease 2019
OMS	Organización Mundial de Salud
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo
RBD	Receptor-binding domain
ARN	Ácido ribonucleico
ORF	Open reading frame - Marco abierto de lectura
ARNm	ARN mensajero
S	Spike
S1	Subunidad 1
S2	Subunidad 2
NTD	Dominio N-terminal
HR	Regiones heptadas
TM	Región transmembrana
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina II
PS	Poliestireno
CIAP	Fosfatasa alcalina intestinal de ternera
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Suero fetal bovino
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
TBS	Tris Buffer Saline
BSA	Albúmina de suero bovino

SIMBOLOGÍA

pb	Pares de base
kDa	Kilo Dalton

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de SARS-CoV-2.....	3
Figura 1.2 Subgenoma de la espícula de SARS-CoV-2.....	4
Figura 2.1 Resumen de la metodología empleada en el proyecto.....	8
Figura 2.2 Representación de la amplificación de región seleccionada de la espícula de SARS-CoV-2.....	9
Figura 2.3 Estructura del vector escogido para la clonación de la proteína.....	10
Figura 2.4 Representación de la ligación de la región de la espícula de SARS-CoV-2 en el vector escogido.....	11
Figura 2.5 Representación de transformación en bacterias ultracompetentes y extracción de plásmido conseguido.....	11
Figura 2.6 Representación de la transfección del plásmido conseguido en células de mamífero y detección de la proteína expresada.....	12
Figura 2.7 Representación de la purificación de las proteínas por columnas de afinidad a histidinas.....	13
Figura 2.8 Representación de ensayo ELISA indirecto.....	14
Figura 3.1 Electroforesis de la PCR de colonias.....	15
Figura 3.2 Electroforesis de la digestión de comprobación de los plásmido extraídos de las colonias seleccionadas.....	16
Figura 3.3 Gráfico que muestra la compatibilidad con las secuencias subidas a la base de datos de NCBI.....	18
Figura 3.4 Western Blot para la detección del Flag- Tag al final de la proteína.....	19
Figura 3.5 Western Blot para observación de la interacción del Suero positivo contra SARS-CoV-2 con la proteína producida.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Secuencias que se alinearon significativamente con el resultado de la secuenciación.....	17
--	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

SARS-CoV-2 es un coronavirus que causa COVID-19, una enfermedad respiratoria que se reportó por primera vez en Wuhan en diciembre 2019, se expandió globalmente y fue declarada pandemia en marzo del 2020. Este mismo mes, después de que Ecuador se declaró en emergencia sanitaria por la pandemia de COVID-19, la demanda de diagnósticos de esta enfermedad tuvo un gran incremento. A finales del 2021 e inicios del 2022, con la aparición de la variante ómicron, nos encontramos con la misma situación. En ambos casos se evidenció escasez de pruebas y reactivos debido a que dependemos de terceros para la obtención de estos diagnósticos. Por otro parte, actualmente se han desarrollado varias vacunas contra esta enfermedad, y junto a esto surge la necesidad de monitorear la inmunidad de las personas que las han recibido. La producción de una proteína específica para la elaboración de ensayos ELISA que permitan la detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV-2 es fundamental para poder responder a necesidades de la población ecuatoriana que podrían presentarse por motivo de este virus.

1.2 Justificación del problema

Este proyecto se encuentra alineado al Tercer Objetivo de Desarrollo Sostenible de la ONU (Salud y Bienestar) donde se establece la importancia de estar preparados ante emergencias sanitarias que suponen un riesgo mundial, como la COVID-19 (Naciones Unidas, 2020). Por esta razón se considera primordial que se haga un seguimiento de las personas vacunadas, ya que no hay información definida sobre el tiempo que durará la inmunidad otorgada por las diferentes vacunas. La detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV-2 permitirá estar preparados ante la necesidad de futuras dosis de vacunación, de acuerdo con la vacuna administrada. Así

mismo, permitirá realizar el diagnóstico de la enfermedad. Un diagnóstico tipo ELISA autóctono con una proteína específica actualizable, en un futuro, podría resultar en una alternativa más económica y óptima para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2. Es un paso en la búsqueda de la soberanía sanitaria que necesita el país.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Implementar un diagnóstico tipo ELISA para el seguimiento de la inmunidad de la población a SARS-CoV-2 mediante la detección de anticuerpos contra la espícula de este virus.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Generar una proteína recombinante que contenga la espícula de SARS-CoV-2 para ensayos tipo ELISA que detecten anticuerpos contra esta proteína.
2. Diseñar el proceso del ensayo tipo ELISA para la detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV-2.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades de SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (Figura 1.1) es un betacoronavirus descrito en 2019, capaz de infectar humanos produciendo la enfermedad del COVID-19 (Lu et al., 2020). Esta enfermedad puede provocar síntomas como dolor de cabeza, fiebre, tos seca, problemas respiratorios e incluso la muerte; los primeros casos se asocian al contacto con mariscos del mercado de Wuhan, pero actualmente su transmisión es de humano a humano (Zhou et al., 2020). COVID-19 impactó a Latino América porque tuvo problemas controlando su transmisión, y Ecuador fue uno de los países latinoamericanos más afectados durante el 2020. La población ecuatoriana tuvo una tasa de 64% más de muertes esperadas, que es una de las más altas a nivel mundial (Cuéllar et al., 2021). En Ecuador, según las estadísticas otorgadas por la Organización Mundial de

la Salud (WHO) se han reportado 521.792 casos confirmado de COVID-19 con 33.088 muertes desde el 3 de Enero del 2020 hasta 12 de Noviembre del 2021 (WHO, 2021). Otros estudios sugieren que el impacto de la pandemia fue mucho peor que lo indicado por los reportes de las instituciones nacionales (Cevallos-Valdiviezo et al., 2021).

SARS-CoV-2 ingresa al huésped por medio de diferentes receptores que permiten su entrada, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) funciona como un receptor primario de internalización que interactúa con la proteína Spike (S) del virus (Yan et al., 2020). Existen otros receptores alternativos como CD147 y NRP que están asociados a la entrada del virus por la proteína S (Masre et al., 2021). Por esta razón, la glicoproteína Spike se considera clave para la producción de vacunas y diagnósticos (Wrapp et al., 2020).

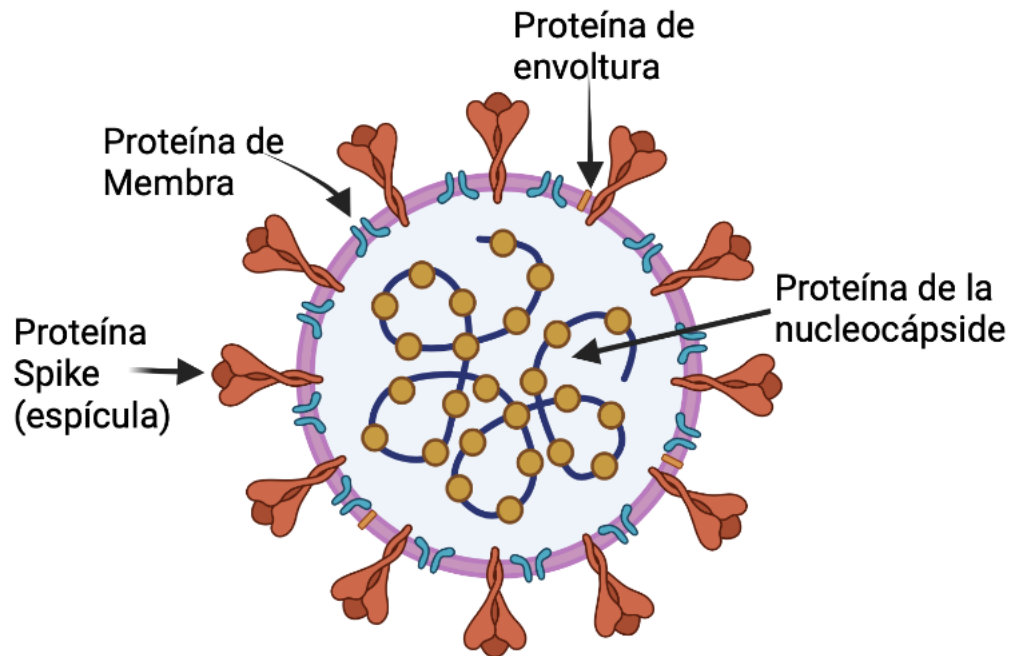


Figura 1.1 Estructura de SARS-CoV-2 (Kim et al., 2020). Elaborado en BioRender.com

1.4.2 Características de la proteína Spike (espícula)

Spike (Figura 1.2) es una glicoproteína viral de superficie del SARS-CoV-2 que comprende dos subunidades funcionales (S1 y S2), el dominio transmembranal y la cola citosólica. S1 está compuesta del dominio N-terminal (NTD), el dominio de unión al receptor (RBD), y dos subdominios (SD1 y SD2). S2 se conforma de un péptido de fusión y dos regiones heptadas (HR1 y HR2). (Pillay, 2020; Walls et al., 2020).

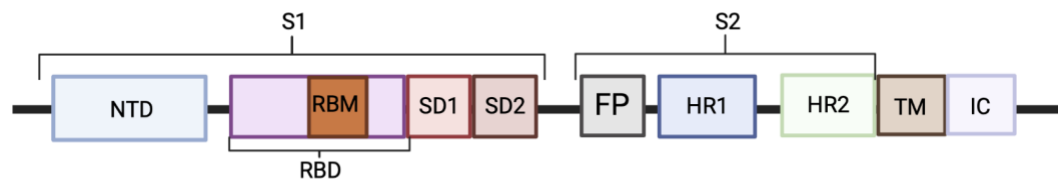


Figura 1.2 Subgenoma de la espícula de SARS-CoV-2 (Jaimes et al., 2020; Sternberg & Naujokat, 2020). **Elaborado en BioRender.com**

1.4.3 Vacunas para SARS-CoV-2 administradas en Ecuador

Actualmente, se han desarrollado varias vacunas contra SARS-CoV-2 y cerca del 60% de la población ecuatoriana ha sido completamente vacunada con las dosis sugeridas (Ritchie et al., 2021). Las vacunas de Pfizer/BioNTech, Oxford/AstraZeneca, Sinovac y CanSino son las que han sido administradas dentro del territorio ecuatoriano hasta el momento de este escrito (Observatorio Social del Ecuador, 2021).

Pfizer/BioNTech (BNT162b2) es una plataforma de ARNm, fue diseñada para ser administrada en dos dosis separadas por 21 días; se encarga de dar instrucciones a las células para hacer copias de la proteína Spike del SARS-CoV-2. Los datos proporcionados por Pfizer-BioNTech demuestran un 95% de efectividad contra COVID-19 una semana después de administrarse la segunda dosis (Kyriakidis et al., 2021). Sin embargo, se ha evidenciado una

reducción en su efectividad con algunas variantes del virus (Kustin et al., 2021).

La vacuna desarrollada por Oxford y AstraZeneca (AZD1222) comprende un vector viral. El vector ha sido modificado de tal manera que la proteína Spike de SARS-CoV-2 pueda ser codificada. Utiliza como plataforma un adenovirus debilitado de chimpancé (Kyriakidis et al., 2021). La eficiencia depende del intervalo de tiempo que existe entre las dos dosis. Se recomienda que la segunda dosis se administre después de las 12 semanas porque se reportó que la eficiencia aumentaba a un 81.3% cuando el intervalo entre las dosis era mayor (Voysey et al., 2021).

La vacuna de Sinovac se trata de un virus inactivado, producida de la cepa aislada de SARS-CoV-2 CN2. Las vacunas de virus inactivados son un desafío ya que pueden dar regiones de los antígenos necesarios para crear la inmunogenicidad y requerir muchas dosis para que se de una respuesta inmune fuerte. Así que, para inducir una mayor respuesta por parte del huésped, a esta vacuna se le agregan adyuvantes (Kyriakidis et al., 2021). Un ensayo clínico de fase 3 en Turquía demostró que tenía una alta eficacia contra COVID-19, con un buen perfil de protección; sin embargo, como el estudio se realizó en corto tiempo, requiere más pruebas con las variantes del virus para determinar que tan efectiva es y cuánto es su tiempo de protección (Tanriover et al., 2021).

Ad5-nCoV de CanSino es una vacuna que utiliza el adenovirus humano serotipo 5 como vector, que entrega la información para que se codifique la Spike completa en las células huésped. Como es un serotipo común, lo más probable es que ya exista inmunidad contra el mismo y esto sirve de ayuda para que se genere la inmunidad contra el antígeno presentado (Kyriakidis et al., 2021). Se ha detectado la generación de anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmune óptima (Hernández-Bello et al., 2021). Su protección,

efectividad e inmunogenicidad no es totalmente conocida, pero se ha observado que un estudio de México que un 88.89% de vacunados con Ad5-nCoV han generado anticuerpos contra la subunidad 1 de la SPIKE (Guzmán-Martínez et al., 2021).

1.4.4 Componentes de proteínas recombinantes para ensayos tipo ELISA

En el diseño de proteínas recombinantes se suele implementar una secuencia Kozak. Esta secuencia apunta al proceso de traducción de proteínas en la célula, aumenta la eficiencia con la regulación del reconocimiento del codón de inicio (Ambrosini et al., 2021). ACCAUGG fue la secuencia original definida (Kozak, 1986). Cuando se ubica el codón de inicio es importante que se mantenga el marco de lectura, un cambio de este podría provocar la producción de una proteína distinta o que la proteína no se exprese (Peng et al., 2019).

Para la purificación, detección y plegamiento de proteínas recombinantes, la presencia de un “tag” ayuda a facilitar el trabajo. Cuando se busca purificar la proteína, normalmente, se encuentran fusionados al N o C -terminal de la proteína objetivo y permiten su captura generalmente por afinidad. Entre los tipos de tags encontramos a las histidinas, péptidos cortos como el FLAG o c-Myc, dominios de plegamientos de proteínas como el MBP o GST, entre otros. Todos presentan ventajas y limitaciones, su funcionamiento dependerá de la proteína objetivo y lo que se desee hacer con ella, requiere de prueba y error (Wood, 2014).

Cuando hablamos de proteínas recombinantes diseñadas para ser usadas en ensayos ELISA, existen tags específicos que tienen afinidad hacia las superficies de poliestireno (PS) denominados PS-tags, que mejoran la inmovilización de la proteína en la placa. PS23 y PS19 son péptidos que han demostrado tener una alta afinidad y resultan efectivos para en el proceso de

inmovilización de proteínas en las superficies de PS (Kumada et al., 2006, 2010).

1.4.5 Ensayos tipo ELISA para diagnóstico de anticuerpos contra SARS-CoV-2

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, denominado ELISA por sus siglas en inglés, es un ensayo sensible y eficaz para la detección de antígenos o anticuerpos por medio de un anticuerpo marcado con una enzima (Lin, 2015). Actualmente, los cuatro tipos de ELISA que existen son directo, indirecto, sánduche y competitivo. Un ELISA indirecto, que es el tipo de técnica que se usará, es un proceso que comprende dos pasos. El primero es la detección del antígeno, que se encuentra inmovilizado en la placa, a partir de su unión con un anticuerpo primario que no está etiquetado; el segundo consiste en la detección del anticuerpo primario por un anticuerpo conjugado en contra de la especie huésped. Entonces, el antígeno es detectado de manera indirecta por el anticuerpo conjugado o “anticuerpo secundario” (Clark et al., 1986).

A diferencia de un ensayo genómico que solo mide la exposición cuando el virus se encuentra en el tracto respiratorio, el ELISA detecta anticuerpos específicos que se desarrollan durante y después de la infección (Zhao et al., 2020). Es un biomarcador de la inmunidad generada por el individuo. El desarrollo de un ensayo ELISA validado, resulta en una herramienta para el monitoreo de pacientes que se hayan infectado con SARS-CoV-2, y para evaluación de la inmunogenicidad generada por las vacunas (Okba et al., 2020). Con un ensayo tipo ELISA automatizado se podría llegar a detectar medidas cuantitativas de exposición e inmunidad de miles de muestras a diario (Roy et al., 2020).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Los procesos y técnicas se realizaron de acuerdo a protocolos establecidos por el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas.

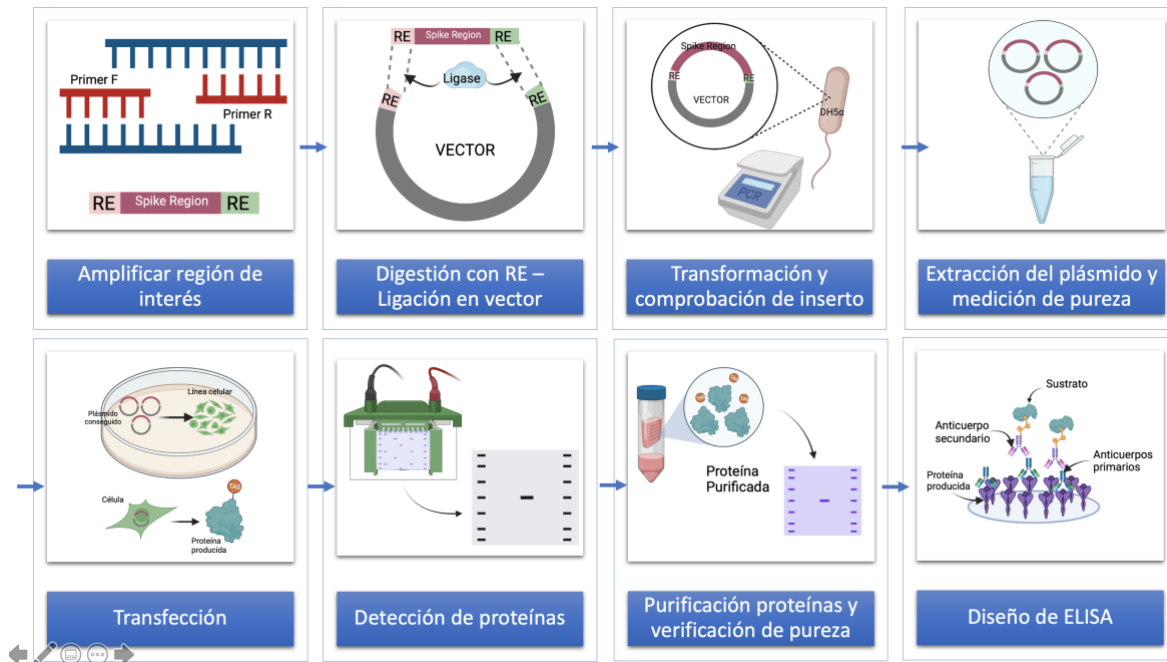


Figura 2.1 Resumen de la metodología empleada en el proyecto. Elaborado en Biorender.com

2.1 Construcción de la proteína recombinante de la espícula de SARS-CoV-2

2.1.1 Amplificación de región de interés

Se diseñaron primers específicos de la región deseada de la proteína Spike (espícula) que añadieron en ambos extremos regiones de restricción, las cuales permiten realizar cortes con enzimas. Se usó como base una muestra positiva para SARS-CoV-2 secuenciada. De esta muestra se extrajo el ARN por el método de trizol y se sintetizó su ADN complementario (cDNA). Luego se realizó la amplificación (PCR) de esta región con los primers diseñados (Figura 2.2) y una polimerasa de alta fidelidad (ThermoFisher Scientific), se corrieron las reacciones por gel de

agarosa 1% y se cortó el fragmento del tamaño deseado para purificarlo con el Kit de Extracción de Gel E.Z.N.A (Omega Bio-tek, Inc).

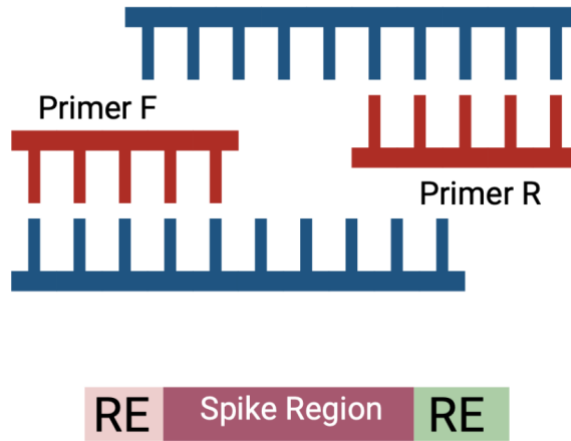


Figura 2.2 Representación de la amplificación de región seleccionada de la espícula de SARS-CoV-2. Elaborado en BioRender.com

2.1.2 Digestión/ligación del inserto purificado y el vector escogido

Para la clonación se eligió un vector que pueda ser expresado eficientemente en células de mamíferos. El vector posee en su estructura una región KozaK, y regiones de plegamiento, adhesión a la placa ELISA, una cola de histidinas para su purificación y otra para detección (Figura 2.3).

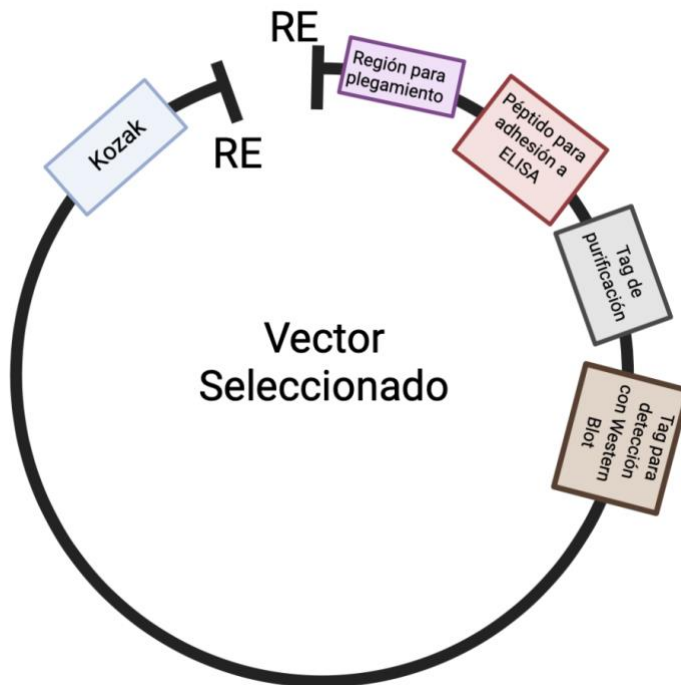


Figura 2.3 Estructura del vector escogido para la clonación de la proteína. Elaborado en BioRender.com

Se digirió la región amplificada y el vector escogido con las enzimas de restricción. Para ambas reacciones se corrió por gel de agarosa 1% y se cortaron los fragmentos esperados que luego se purificaron con el Kit de Extracción de Gel E.Z.N.A (Omega Bio-tek, Inc). Al vector se le desfosforilaron sus extremos con Fosfatasa Alcalina Intestinal Bovina “CIAP” (ThermoFisher Scientific) y se volvió a purificar con el Kit de Extracción de Gel E.Z.N.A (Omega Bio-tek, Inc). Se procedió a ligar (Figura 2.4) el inserto en el vector con la ligasa de ADN T4 (ThermoFisher Scientific).

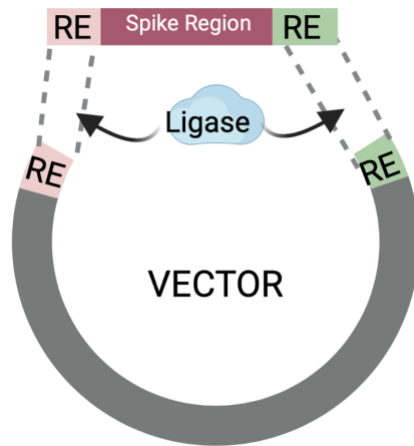


Figura 2.4 Representación de la ligación de la región de la espícula de SARS-CoV-2 en el vector escogido. Elaborado en BioRender.com

2.1.3 Transformación y extracción del plásmido de interés

La reacción de ligación se transformó en bacterias ultracompetentes DH5 α y se realizó PCR a las colonias obtenidas para determinar cuáles poseían el plásmido construido. Luego las colonias de las bacterias positivas se cultivaron en medio líquido toda la noche, para extraer el plásmido con el Kit de Miniprep “PureYield Plasmid Miniprep System-Promega” (Figura 2.5). Para comprobar y verificar la presencia del inserto de interés se realizó nuevamente digestión con las enzimas de restricción.

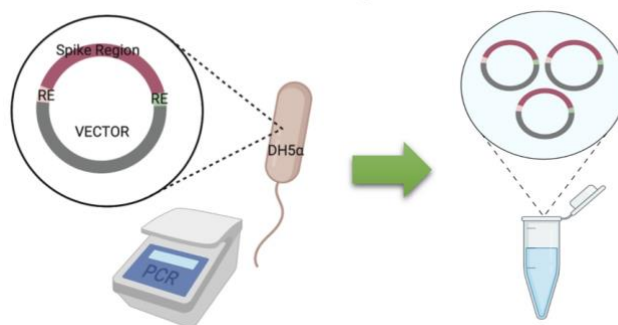


Figura 2.5 Representación de transformación en bacterias ultracompetentes y extracción de plásmido conseguido. Elaborado en BioRender.com

2.2 Transfección y expresión de la proteína recombinante en células de mamífero

Para probar la expresión de nuestra proteína, el plásmido obtenido se transfectó siguiendo el método de lipofectamina (ThermoFisher Scientific) por suspensión en las células de mamíferos crecidas en media DMEM (ThermoFisher Scientific) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS). 3 ug de ADN plasmídico se transfectó en 1 millón de células. Los sobrenadantes se cosecharon 168 horas post-transfección.

Con el fin de detectar la presencia de la proteína de interés, se realizó SDS-PAGE. Previamente, los sobrenadantes fueron tratados con buffer de carga, el cual contiene dodecilsulfato sódico (SDS). Los sobrenadantes se corrieron a 150 voltios por 1 hora en gel de poliacrilamida al 10%. Luego se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó toda la noche a 4° C con Tris Buffer Salino + 0.1% Tween-20 + 3% BSA (TBS-T BSA). El anticuerpo primario fue incubado con TBS-T BSA por 1 hora a 4° C y se procedió a realizar 3 lavados con TBS-T. Luego se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a 4° C y se procedió a realizar 3 lavados con TBS-T. Finalmente, a la membrana de PVDF se le quitó el exceso de TBS-T y se usó el Kit de Quimioluminiscencia Novex (ThermoFisher Scientific) para revelar si la proteína de interés fue expresada por las células (Figura 2.6).

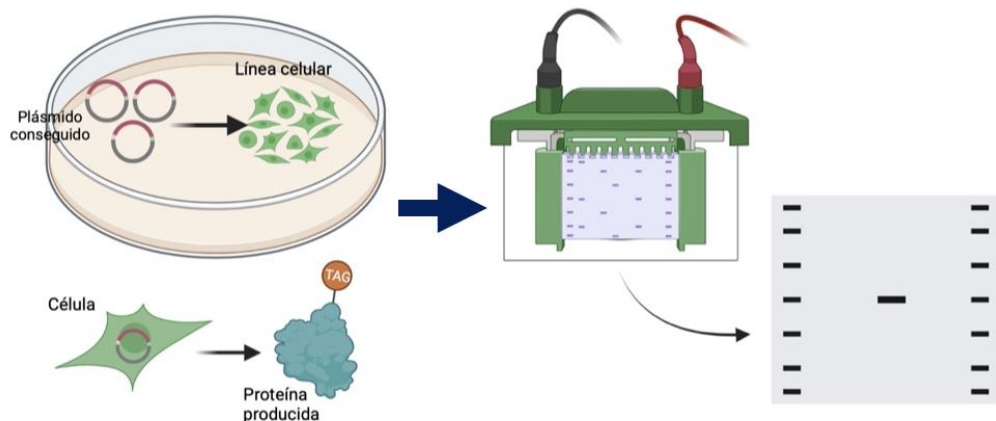


Figura 2.6 Representación de la transfección del plásmido conseguido en células de mamífero y detección de la proteína expresada. Elaborado en BioRender.com

2.3 Purificación de proteínas

Una vez detectada la proteína se procedió a purificar el sobrenadante cosechado con las columnas de purificación de histidinas “His SpinTrap - GE Healthcare” (Figura 2.7). Se realizó SDS PAGE al producto de purificación, se verificó su pureza mediante la técnica de tinción por Coomassie Blue.

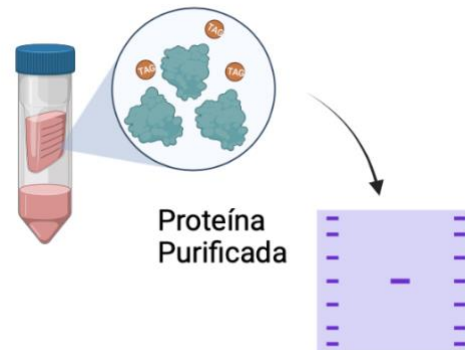


Figura 2.7 Representación de la purificación de las proteínas por columnas de afinidad a histidinas. Elaborado en BioRender.com

2.4 Diseño experimental de ensayos ELISA para la detección de anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV2:

Un ELISA es un ensayo flexible, gracias a esto su procedimiento se puede adaptar a los reactivos y condiciones disponibles en el laboratorio. Para realizar este diseño de experimento se hizo una revisión literaria. Se decidió que el mejor ensayo a desarrollar es el ELISA indirecto (Figura 2.8). Distintas variables que pueden ser modificadas para optimizar el experimento se pusieron a prueba, así se estandarizará un protocolo con el fin de que sea reproducible y certero. Se decidió hacer pruebas con las concentraciones con las concentraciones del sustrato TMB que ayuda a la detección de la proteína y con el ácido sulfúrico para la parar la reacción.

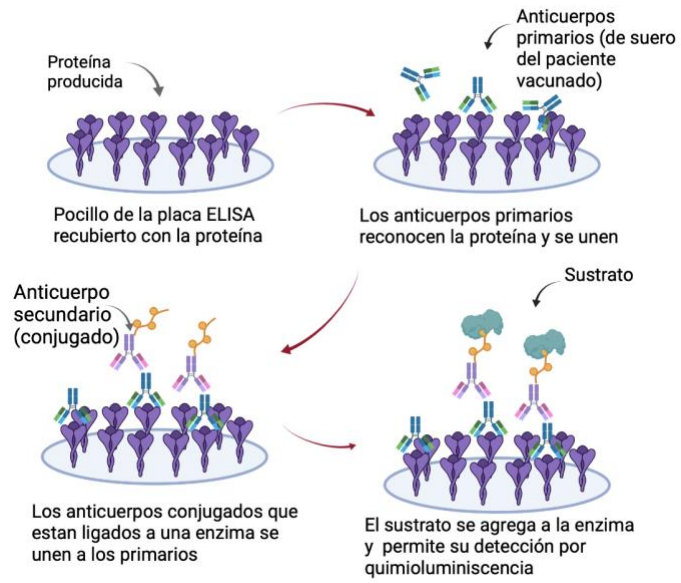


Figura 2.8 Representación de ensayo ELISA indirecto. Elaborado en BioRender.com

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Clonación del gen que expresa la región de la espícula

Se logró amplificar la región escogida de la espícula con primers específicos de la muestra base. Esta región fue purificada, digerida con enzimas de restricción, y ligada en el vector que se escogió. Después de transformar la ligación, se escogieron 3 colonias que crecieron en medio selectivo con ampicilina. Se realizó una PCR de colonias (Figura 3.1), la cual confirmó la presencia del inserto dentro del vector. El tamaño esperado del inserto era aproximadamente 2400 pares de bases.

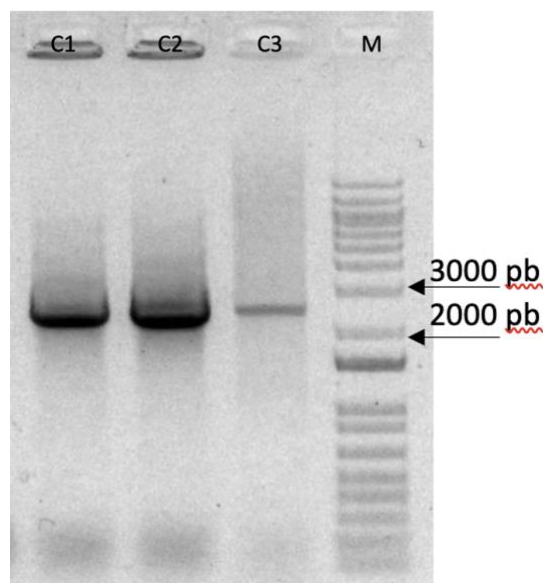


Figura 3.1 Electroforesis de la PCR de colonias. C1: Colonia 1, C2: Colonia 2, C3: Colonia 3, M: Marcador. Las colonias se escogieron de manera aleratorio de la placa donde se sembró la transformación.

Se crecieron las 3 colonias en medio líquido selectivo y se extrajo el plásmido a partir de la miniprep. Luego, se realizó una digestión con enzimas EcoRI/NheI y se hizo electroforesis en gel de agarosa. Se observaron 3 bandas (Figura 3.2), lo que coincidió con los sitios de restricción y resultaron ser del tamaño esperado, indicando que se logró realizar la construcción del plásmido propuesta.

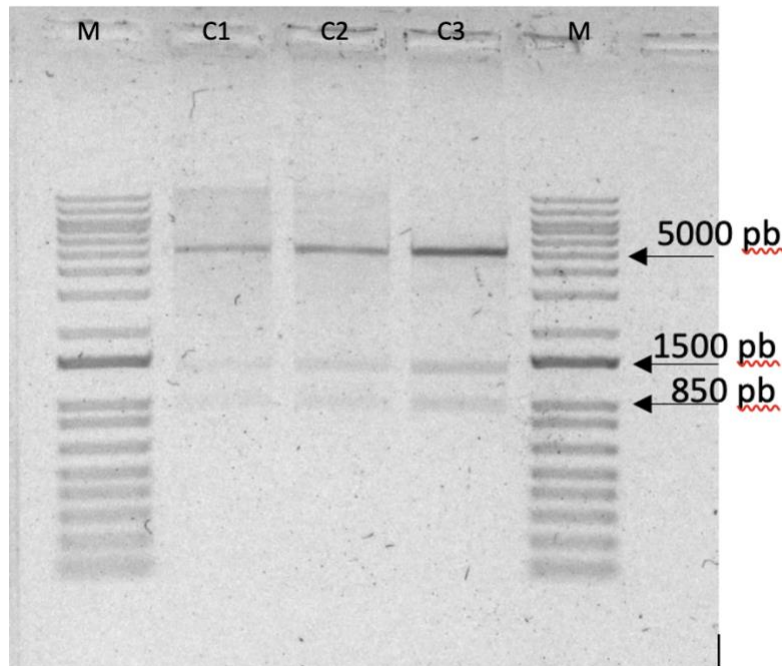


Figura 3.2 Electroforesis de la digestión de comprobación de los plásmido extraídos de las colonias seleccionadas. C1: Plásmido de colonia 1, C2: Plásmido de colonia 2, C3: Plásmido de colonia 3, M: Marcador.

3.2 Secuenciación del plásmido purificado.

Una vez purificada la construcción del plásmido, se mandó a sintetizar primers que se unieran a diferentes regiones del plásmido y permitieran realizar su secuenciación. Se ordenó una secuenciación por el método de Sanger para el fragmento de aproximadamente 2400 pares de bases. La secuencia de nucleótidos obtenida fue consistente en un 100% con el fragmento que expresa la región de la espícula escogida, se realizó un blast en NCBI separando las regiones que se agregaron a la proteína (Tabla 3.1 y Figura 3.3). También se logró observar la presencia de el péptido de señal, los regiones de restricción, y los tags que permiten purificar y detectar. Además, mantuvo el marco abierto de lectura.

Tabla 3.1 Secuencias que se alinearon significativamente con el resultado de la secuenciación. Resultado de un Blast de nucleótidos en NCBI. Se escogieron las 10 primeras secuencias.

03RJP5P6016-Alignment-Descriptions

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len	Accession
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P028B02/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29858	QM486838.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026G11/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29864	QM486824.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026G10/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29823	QM486823.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026I0/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29820	QM486806.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026D10/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29828	QM486797.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026D02/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29830	QM486793.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026D01/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29867	QM486792.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026C12/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29856	QM486791.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026C01/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab) gene, partial cds; ORF1a polyprotein (ORF1a) gene, complete cds; surface glycoprotein (S) gene, partial cds; ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29763	QM486783.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/ human/USA/MA-UMASSMED-P026B03/2021 ORF1ab polyprotein (ORF1ab), ORF1a polyprotein (ORF1a), surface glycoprotein (S), ORF3a protein (ORF3a), envelope protein (E), membrane glycoprotein (M), ORF6 protein (ORF6), ORF7a protein (ORF7a), and ORF7b (ORF7b) genes, complete cds; ORF8 gene, complete sequence; and nucleocapsid phosphoprotein (N) and ORF10 protein (ORF10) genes, complete cds	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	3679	3679	100%	0.0	100.00	29763	QM486778.1

Distribution of the top 10 Blast Hits on 10 subject sequences



Figura 3.3 Gráfico que muestra la compatibilidad con las secuencias subidas a la base de datos de NCBI. El tono rojo y la franja lisa muestran un 100% de compatibilidad entre los nucleótidos.

3.3 Detección de la proteína expresada

Se transfectó el plásmido purificado y secuenciado en células HEK293. Se recogió el sobrenadante y se realizó una lisis celular para extraer las proteínas citoplasmáticas de las células que fueron transfectadas. Abriéndonos a la posibilidad que la proteína pueda producirse al interior de la célula. Con estas muestras se hicieron dos ensayos. En el primer ensayo se utilizó como anticuerpo primario un Anti-Flag y un Anti-Mouse como anticuerpo secundario. Esto con el fin de detectar la proteína producida, ya que le agregamos un Flag-Tag al final de la proteína.

No se logró observar ninguna interacción con el Flag (Figura 3.4). De este resultado se podría inferir que la proteína no se está produciendo, o al menos, no de manera completa. Debido a que esta región se encuentra al final de la proteína. Por esta razón, no fue posible purificarla, ya que la cola de histidinas fue ubicada después del Flag-Tag.

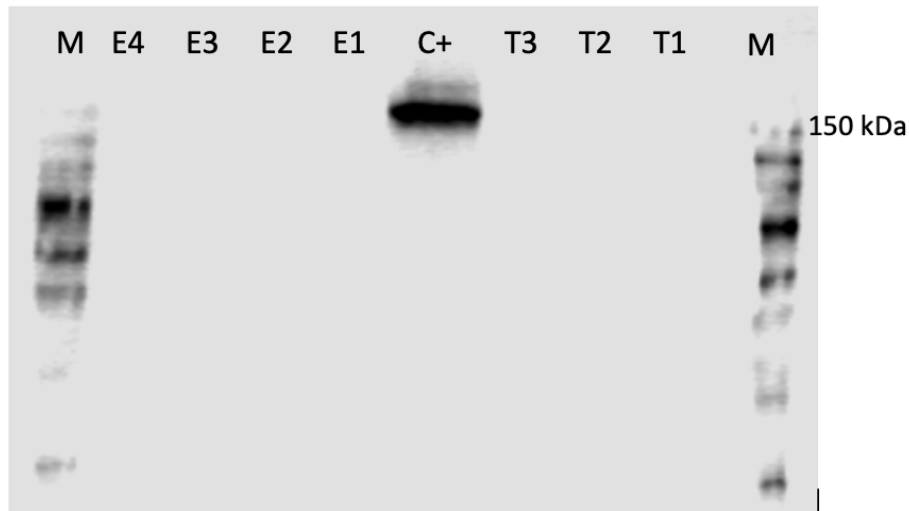


Figura 3.4 Western Blot para la detección del Flag-Tag al final de la proteína. E1: Extracción citoplasmática de la transfección 1, E2: Extracción citoplasmática de la transfección 2, E3: Extracción citoplasmática de la transfección 3, E4: Extracción citoplasmática de la transfección 4, C+: Control positivo, T1: Sobrenadante de la transfección 1, T2: Sobrenadante de la transfección 2, T3: Sobrenadante de la transfección 3.

En el segundo ensayo se quería probar si los anticuerpos de un suero positivo contra SARS-CoV-2 interactuaban con las proteínas producidas. Este suero se usó como anticuerpo primario, y un Anti-human IgG Fab Specific como anticuerpo secundario.

Los resultados indicaron que definitivamente no hubo interacción con el sobrenadante de los plásmidos transfectados. Por otro lado, se detecta ligeramente la interacción del suero con las cuatro muestras de extracción citoplasmática que se probó (Figura 3.5). El tamaño de la proteína detectada está entre los 30 y 40 kDa. Sin embargo, se esperaba un tamaño aproximado de 70 kDa. Se dedujo que el péptido de secreción utilizado no es el adecuado para producir la proteína escogida, ya que no se está produciendo de manera externa. Además, aunque se la haya logrado producir en la parte citoplasmática, puede que alguna proteasa cortara la proteína e impidió que se traduzca como se esperaba, y por esta razón no alcanzó el tamaño supuesto.

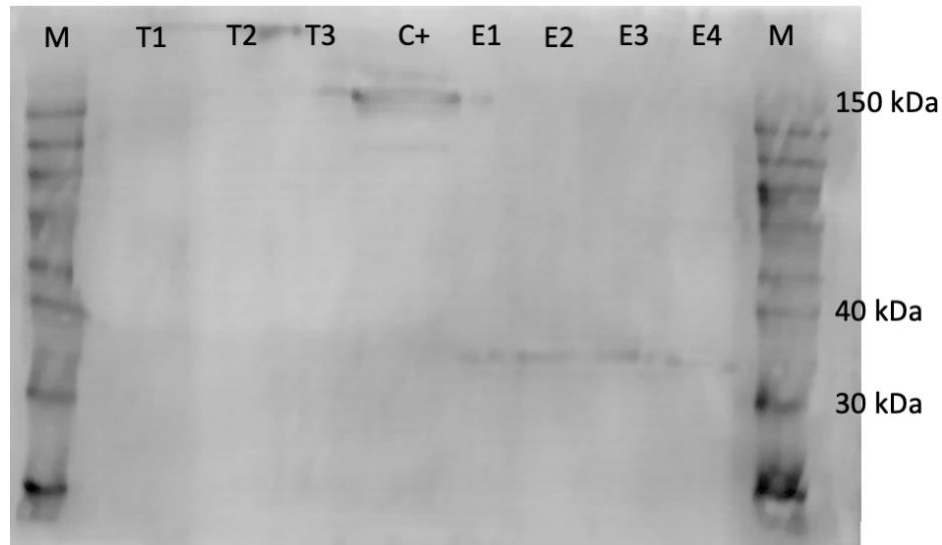


Figura 3.5 Western Blot para observación de la interacción del Suero positivo contra SARS-CoV-2 con la proteína producida. E1: Extracción citoplasmática de la transfección 1, E2: Extracción citoplasmática de la transfección 2, E3: Extracción citoplasmática de la transfección 3, E4: Extracción citoplasmática de la transfección 4, C+: Control positivo, T1: Sobrenadante de la transfección 1, T2: Sobrenadante de la transfección 2, T3: Sobrenadante de la transfección 3.

3.4 Diseño del ensayo ELISA.

Las guías principales para el diseño de este ensayo fueron: “ELISA Development Guide” (R&D Systems, n.d.), “ELISA technical guide and protocols” (Thermo Fisher Scientific, 2010) y “Helpful ELISA Hints” (Bio-Rad, n.d.).

El diseño de este ensayo propone las cantidades y pasos bases a realizar para sensibilizar y optimizar el diagnóstico tipo ELISA acorde a la disponibilidad de los materiales y reactivos presentes en el laboratorio. De acuerdo a los resultados obtenidos, las variables pueden ser modificadas con el fin de mejorar el diagnóstico. Se propuso que para el tapizado del antígeno se use PBS, incubándolo toda la noche, varios estudios han reportado que funciona con resultados exitosos. Se

descartó el uso de Carbonato/Bicarbonato porque implica la obtención de permisos, ya que son reactivos regulados.

Para el bloqueo se propone usar PBS+ 0.05% Tween®-20 + 5% Leche. De 200 a 300 ul, lo suficiente para que el pocillo quede totalmente cubierto. Esto ayudará a disminuir el ruido.

Se planteó usar un dilución 1:200 del suero en el PBS+ 0.05% Tween®-20 + 5% Leche para la primera incubación como punto de partida, debido a que en otros ensayos realizados en el laboratorio ha resultado eficiente para que se detecte una interacción con la proteína.

Para la segunda incubación se sugiere usar una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario conjugado tomando en cuenta previos ensayos realizados en el laboratorio.

Los lavados deberán realizarse con PBS+ 0.05% Tween®-20. Después de la primera incubación como 3 lavados de 5 minutos, y luego de la segunda incubación 6 lavados de 3 minutos.

Finalmente, como sustrato se usará TMB, y como sustancia de parada ácido sulfúrico 0.18 N. En un ensayo realizado se observó que 50ul de cada uno podría resultar suficiente para la detección de los anticuerpos.

3.5 Viabilidad del proyecto.

Se evidenciaron varios beneficios que ofrece este proyecto:

- La disminución de los trámites y los condicionamientos que implica la importación.
- La obtención de una independencia para generar la cantidad de diagnósticos que se requieran.
- Se considera económicamente rentable. Un kit ELISA comercial de SARS-CoV-2 puede llegar a costar aproximadamente \$600 y está limitado a 96 pruebas.
- Al ser realizado localmente, existe la posibilidad de actualización de la proteína de acuerdo diferentes variantes del SARS-CoV-2.

- Es tecnológicamente factible porque el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas cuenta con los equipos e insumos necesarios para realizarlo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Con los resultados obtenidos, y el análisis realizado se concluye lo siguiente:

- La construcción genética que contiene el gen del SARS-CoV-2 que expresa la proteína escogida para el inmunodiagnóstico se realizó de manera exitosa. La presencia del inserto en el vector por técnicas moleculares en el laboratorio fue comprobada. Además, por medio de secuenciación fue validada en un 100%. La proteína recombinante producida con esta construcción fue detectada por anticuerpos positivos al coronavirus. Sin embargo, no tuvo el tamaño esperado, ni se detectó por medio del tag que fue añadido.
- El proceso del ensayo tipo ELISA a realizar para la detección de los anticuerpos contra la espícula de SARS-CoV-2 fue propuesto. Con esta información se puede llevar a cabo un ensayo base, el cual es el punto de inicio de las diferentes pruebas que se deben tomar en consideración para lograr su optimización.
- La implementación de este diagnóstico tipo ELISA localmente, es un paso hacia la soberanía sanitaria que necesita el país. Además, una vez efectuado, implica un inicio para futuras investigaciones como la del seguimiento de la inmunidad de la población a partir de la vacunación contra COVID-19.
- Debido a los problemas de expresión de la región S1, se decidió realizar la construcción con la región RBD para verificar su factibilidad de expresión. Se logró la expresión de la proteína, y se detectó con suero de personas infectadas con SARS-CoV-2. Actualmente, esta proteína es la base del

ELISA que se está desarrollando para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda probar con diferentes péptidos de señal para la expresión de la proteína. Esta puede ser la causa por la que no se está expresando la proteína correctamente.
- Se sugiere darle seguimiento a este proyecto porque es de suma importancia para el país, y nos va a permitir estar preparados para diagnosticar futuras variantes. Incluso diagnosticar otras enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosini, C., Garilli, F., & Quattrone, A. (2021). Chapter Thirteen—Reprogramming translation for gene therapy. In G. Petris (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 182, pp. 439–476). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.028>
- Bio-Rad. (n.d.). *Helpful ELISA Hints*. Bio-Rad. Retrieved November 24, 2021, from <https://www.bio-rad-antibodies.com/helpful-elisa-hints.html>
- Cevallos-Valdiviezo, H., Vergara-Montesdeoca, A., & Zambrano-Zambrano, G. (2021). Measuring the impact of the COVID-19 outbreak in Ecuador using preliminary estimates of excess mortality, March 17–October 22, 2020. *International Journal of Infectious Diseases*, 104, 297–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.045>
- Clark, M. F., Lister, R. M., & Bar-Joseph, M. (1986). ELISA techniques. In *Methods in Enzymology* (Vol. 118, pp. 742–766). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6)
- Cuéllar, L., Torres, I., Romero-Severson, E., Mahesh, R., Ortega, N., Pungitore, S., Ke, R., & Hengartner, N. (2021). Excess deaths reveal unequal impact of COVID-19 in Ecuador. *BMJ Global Health*, 6(9), e006446. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-006446>
- Guzmán-Martínez, O., Guardado, K., de Guevara, E. L., Navarro, S., Hernández, C., Zenteno-Cuevas, R., & Montero, H. (2021). IgG Antibodies Generation and Side Effects Caused by Ad5-nCoV Vaccine (CanSino Biologics) and BNT162b2

- Vaccine (Pfizer/BioNTech) among Mexican Population. *Vaccines*, 9(9), 999.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9090999>
- Hernández-Bello, J., Morales-Núñez, J. J., Machado-Sulbarán, A. C., Díaz-Pérez, S. A., Torres-Hernández, P. C., Balcázar-Félix, P., Gutiérrez-Brito, J. A., Lomelí-Nieto, J. A., & Muñoz-Valle, J. F. (2021). Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2, Anti-Ad5 Antibodies, and Reactogenicity in Response to Ad5-nCoV (CanSino Biologics) Vaccine in Individuals with and without Prior SARS-CoV-2. *Vaccines*, 9(9), 1047. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091047>
- Jaimes, J. A., André, N. M., Chappie, J. S., Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2020). Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *Journal of Molecular Biology*, 432(10), 3309–3325.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009>
- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283–292.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
- Kumada, Y., Kuroki, D., Yasui, H., Ohse, T., & Kishimoto, M. (2010). Characterization of polystyrene-binding peptides (PS-tags) for site-specific immobilization of proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6), 583–587.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.005>

- Kumada, Y., Tokunaga, Y., Imanaka, H., Imamura, K., Sakiyama, T., Katoh, S., & Nakanishi, K. (2006). Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins. *Biotechnology Progress*, 22(2), 401–405. <https://doi.org/10.1021/bp050331l>
- Kustin, T., Harel, N., Finkel, U., Perchik, S., Harari, S., Tahor, M., Caspi, I., Levy, R., Leshchinsky, M., Ken Dror, S., Bergerzon, G., Gadban, H., Gadban, F., Eliassian, E., Shimron, O., Saleh, L., Ben-Zvi, H., Keren Taraday, E., Amichay, D., ... Stern, A. (2021). Evidence for increased breakthrough rates of SARS-CoV-2 variants of concern in BNT162b2-mRNA-vaccinated individuals. *Nature Medicine*, 27(8), 1379–1384. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01413-7>
- Kyriakidis, N. C., López-Cortés, A., González, E. V., Grimaldos, A. B., & Prado, E. O. (2021). SARS-CoV-2 vaccines strategies: A comprehensive review of phase 3 candidates. *Npj Vaccines*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In R. Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 51–59). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

- Masre, S. F., Jufri, N. F., Ibrahim, F. W., & Abdul Raub, S. H. (2021). Classical and alternative receptors for SARS-CoV-2 therapeutic strategy. *Reviews in Medical Virology*, 31(5), 1–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2207>
- Observatorio Social del Ecuador. (2021). *Vacunas | coronavirus Ecuador*. Covid19 Ecuador. <https://www.covid19ecuador.org/vacunas>
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., Lamers, M. M., Sikkema, R. S., de Bruin, E., Chandler, F. D., Yazdanpanah, Y., Le Hingrat, Q., Descamps, D., Houhou-Fidouh, N., Reusken, C. B. E. M., Bosch, B.-J., Drosten, C., Koopmans, M. P. G., & Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerging Infectious Diseases*, 26(7), 1478–1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
- Peng, B.-Z., Bock, L. V., Belardinelli, R., Peske, F., Grubmüller, H., & Rodnina, M. V. (2019). Active role of elongation factor G in maintaining the mRNA reading frame during translation. *Science Advances*, 5(12), eaax8030. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8030>
- Pillay, T. S. (2020). Gene of the month: The 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *Journal of Clinical Pathology*, 73(7), 366–369. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206658>
- R&D Systems. (n.d.). *ELISA Development Guide*. <https://resources.rndsystems.com/images/site/edbapril025670.pdf>
- Ritchie, H., Mathieu, E., Rodés-Guirao, L., Appel, C., Giattino, C., Ortiz-Ospina, E., Hasell, J., Macdonald, B., Beltekian, D., & Roser, M. (2021). Coronavirus

Pandemic (COVID-19). *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>

Roy, V., Fischinger, S., Atyeo, C., Slein, M., Loos, C., Balazs, A., Luedemann, C., Astudillo, M. G., Yang, D., Wesemann, D. R., Charles, R., Lafrate, A. J., Feldman, J., Hauser, B., Caradonna, T., Miller, T. E., Murali, M. R., Baden, L., Nilles, E., ... Alter, G. (2020). SARS-CoV-2-specific ELISA development. *Journal of Immunological Methods*, 484–485, 112832.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112832>

Sternberg, A., & Naujokat, C. (2020). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sciences*, 257, 118056.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118056>

Tanriover, M. D., Doğanay, H. L., Akova, M., Güner, H. R., Azap, A., Akhan, S., Köse, Ş., Erdinç, F. Ş., Akalın, E. H., Tabak, Ö. F., Pullukçu, H., Batum, Ö., Şimşek Yavuz, S., Turhan, Ö., Yıldırım, M. T., Köksal, İ., Taşova, Y., Korten, V., Yılmaz, G., ... Aksu, K. (2021). Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): Interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet*, 398(10296), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01429-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01429-X)

Thermo Fisher Scientific. (2010). *ELISA technical guide and protocols*.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>

Voysey, M., Costa Clemens, S. A., Madhi, S. A., Weckx, L. Y., Folegatti, P. M., Aley, P. K., Angus, B., Baillie, V. L., Barnabas, S. L., Borat, Q. E., Bibi, S., Briner, C., Cicconi, P., Clutterbuck, E. A., Collins, A. M., Cutland, C. L., Darton, T. C.,

- Dheda, K., Dold, C., ... Zuidewind, P. (2021). Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: A pooled analysis of four randomised trials. *The Lancet*, 397(10277), 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00432-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00432-3)
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- WHO. (2021). *Ecuador: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*. <https://covid19.who.int>
- Wood, D. W. (2014). New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Current Opinion in Structural Biology*, 26, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.04.006>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N. Y.)*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science (New York, N. Y.)*, 367(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., ... Zhang, Z. (2020). *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel*

coronavirus disease 2019 (p. 2020.03.02.20030189).

<https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>