



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

VALIDACIÓN DEL UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD EMPLEANDO COMO REFERENCIA EL ESTÁNDAR INTERNACIONAL DE LA OMS

Ariel Palenzuela Díaz¹
Darlen Ortega León²
Irinia Valdivia Álvarez³
Aurora Delahanty Fernández⁴

¹ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, ariel.palenzuela@cie.cu

² Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, darlen.ortega@cie.cu

³ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, irinia.valdivia@cie.cu

⁴ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, aurora.delahanty@cie.cu

Resumen: Introducción: Las vacunas contra la Covid-19 inducen una respuesta de anticuerpos contra el dominio de unión al receptor (RBD), por lo que los ensayos a emplear en la evaluación de la inmunogenicidad han de ser capaces de cuantificar la respuesta de anticuerpos IgG dirigida contra esta proteína. El objetivo de este estudio fue referenciar el ensayo desarrollado contra el estándar internacional de la OMS. Métodos: Para el desarrollo del ensayo se empleó una proteína RBD dimérica, muestras procedentes de individuos vacunados con Abdala y Soberana caracterizadas por el ensayo Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S, y el Working Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, NIBSC 21/234. Resultados: La cuantificación del estándar interno del ensayo arrojó una concentración de 1470 BAU/mL, y se elaboró una curva de calibración con un comportamiento lineal en el intervalo de 3,9 a 245 BAU/mL. Se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson de 0,966 y 0,963 para los dos estudios realizados al comparar el ensayo desarrollado y el de referencia, lo que indica una correlación positiva muy alta entre ambas pruebas. El análisis estadístico (t-Student) demostró que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración reportados por ambos ensayos para $p < 0,05$, por lo que las muestras evaluadas, como parte de los ensayos clínicos, pueden referenciarse, en términos de concentración de anticuerpos, contra el estándar internacional de la OMS. Conclusiones: El UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD presenta excelentes parámetros de funcionamiento, lo que ha permitido su empleo en la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas y candidatos vacunales desarrollados en Cuba.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, UMELISA, Vacunas.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una infección respiratoria causada por el nuevo virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2; previamente conocido como 2019-nCov) (1). Los signos comunes de la infección incluyen síntomas respiratorios, fiebre, tos seca, mialgia y dificultad para respirar. En los casos graves la infección puede causar neumonía, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), shock séptico, acidosis metabólica difícil de corregir y disfunción de la coagulación (2, 3).

Los coronavirus son virus envueltos con un genoma de ARN de sentido positivo y con una nucleocápside de simetría helicoidal. Están compuestos por varias proteínas, entre ellas se encuentran: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (4). La proteína S se encuentra en la superficie viral y es la que media la unión a las células hospederas a través del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La proteína N es una de las principales proteínas estructurales del virus y participa en la transcripción y replicación del ARN viral. Se reporta que tanto la proteína S como la N son altamente inmunogénicas y pueden ser antígenos potenciales para el diagnóstico serológico de la COVID-19 (5,6).

Varios centros de investigación y compañías farmacéuticas han desarrollado vacunas que en su mayoría inducen una respuesta de anticuerpos contra la proteína S, y como parte de los ensayos clínicos para su aprobación por las autoridades regulatorias correspondientes, se incluye la evaluación de la inmunogenicidad, y dentro de ella el título de anticuerpos. De esta forma la cuantificación de los niveles de anticuerpos es vital en el establecimiento de la eficacia de la vacuna, no solo para la prevención de la infección, sino también de la aparición de las formas severas de la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el documento: WHO Points to consider for manufacturers of COVID19 vaccines (24 de septiembre de 2020) plantea: "...deberán aportarse pruebas de la pertinencia y la normalización de los ensayos de inmunogenicidad. Los resultados de los ensayos deben ser reportados en unidades internacionales siempre que sea posible...". En enero de 2021 la OMS desarrolló el 1er estándar internacional para ensayos de anticuerpos al SARS-CoV-2, que sirve de base para la calibración de los ensayos cuantitativos de anticuerpos.

OBJETIVO

Evaluar las características funcionales del ensayo UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD, empleando una curva de calibración preparada a partir de un suero de alto título referenciado contra un estándar internacional de la OMS.

II. MÉTODO

Ensayo: El UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD es un ensayo cuantitativo que utiliza como fase sólida placas de ultramicroELISA revestidas con el fragmento RBD de la proteína S del virus. Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y si contienen anticuerpos específicos éstos se fijan a dicha proteína. La realización de un lavado posterior elimina los componentes de la muestra no fijados. Se añade entonces un anticuerpo monoclonal anti IgG humana unido a biotina, el que se unirá a los anticuerpos fijados en el paso

anterior. Un nuevo lavado elimina los anticuerpos biotinilados que no reaccionaron. Se añade entonces el conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina, que se unirá a las moléculas de biotina. Un nuevo lavado elimina el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá cuantificar los niveles de anticuerpos IgG a la proteína S de SARS-CoV-2 en las muestras.

Ensayo de Referencia: Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S, Roche Diagnostics, ensayo cuantitativo, tipo sándwich de doble antígeno y basado en el principio de electroquimioluminiscencia, que detecta anticuerpos totales de alta afinidad dirigidos contra la proteína S del SARS-CoV-2.

Working Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, NIBSC code: 21/234. Calibrado frente al Estándar Internacional NIBSC código 20/136 en un estudio colaborativo internacional con ensayos para la determinación de diferentes tipos de anticuerpos. Producto de dicho estudio se le asignó una concentración para IgG anti RBD de 817 BAU/mL (IC 95% 663-1008 BAU/mL) (Binding Antibody Unit o Unidades de Unión a Anticuerpos).

Paneles de muestras empleados:

Panel 1: Conformado por 149 muestras cuantificadas por el ensayo de referencia empleado y procedentes de individuos vacunados incluidos en los estudios clínicos Soberana 02 y Soberana Pediatría.

Panel 2: Conformado por 126 muestras de suero cuantificadas por el ensayo de referencia empleado y procedentes de individuos incluidos en el ensayo clínico fase 1 de la vacuna Abdala, divididas en 43 muestras tomadas previo a la vacunación y 83 de individuos con esquema completo.

Panel 3: Conformado por 205 muestras de individuos no vacunados en los que se descartó una infección previa a SARS-CoV-2 con el empleo del UMELISA ANTI SARS-CoV-2.

Panel 4: Conformado por 24 muestras de suero positivas a diferentes agentes virales infecciosos (con genomas ARN o ADN) que pueden co-infectar junto al SARS CoV-2 o que poseen cuadros clínicos similares, que fueron empleadas para la evaluación de la Especificidad analítica (Reactividad cruzada), desglosadas de la siguiente forma: Citomegalovirus (CMV) n=5, Virus de Epstein Barr (EBV) n=3, Virus de la hepatitis A y E (VHA/VHE) n=2, Virus de la hepatitis B (VHB) n=4, Virus de la hepatitis C (VHC) n=4, Sarampión n=3 e Infección Respiratoria Aguda (IRA) n=3.

Parámetros de validación:

Curva de calibración: Partiendo de la media geométrica de concentración establecida para el Working Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, NIBSC code: 21/234(817 BAU/mL) se obtuvo una curva de calibración en el ensayo desarrollado, cuantificándose el suero de alto título en dicha curva. Una vez asignada la concentración a dicho suero de alto título se procedió a preparar muestras de diferentes concentraciones diluyéndolas en Solución reguladora Tris-BSA 8%. Cada una de estas concentraciones fueron evaluadas en el ensayo con el objetivo de determinar el rango lineal de la curva de calibración.

Especificidad analítica: Se estudiaron las sustancias o componentes que producen interferencias u otras que tienen reactividad cruzada con el analito en cuestión que pueden alterar el resultado de la prueba. Para calcular este parámetro se emplearon las muestras del panel 4.

Especificidad clínica: Para calcular este parámetro se emplearon las muestras del panel 3.

Para el cálculo **de la Especificidad analítica y clínica** se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Especificidad (\%)} = \left[\frac{\text{Total de verdaderos negativos}}{\text{Total de verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \right] \times 100$$

Sensibilidad clínica: Para calcular este parámetro se emplearon las muestras de los paneles 1 y 2. Se expresó como el porcentaje de positividad en muestras donde el analito a determinar estuvo presente, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \left[\frac{\text{Total de verdaderos positivos}}{\text{Total de verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \right] \times 100$$

Límite de detección y cuantificación: El límite de detección y cuantificación del ensayo se determinó de acuerdo a lo descrito en la literatura internacional (7). Para calcular ambos parámetros se evaluó 80 veces el calibrador A (0 U/mL) del ensayo en una misma corrida y se calculó la media y la (DE), empleándose las siguientes fórmulas:

$$\text{Límite de detección} = \text{Media} + 3 \text{ DE}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \text{Media} + 10 \text{ DE}$$

Determinación de los niveles de IgG contra la proteína RBD de SARS-CoV-2 en muestras de individuos vacunados: se evaluaron las muestras del panel 1. Con los resultados obtenidos se realizó un procesamiento estadístico empleando t de Student para determinar si había diferencias significativas entre los valores de concentración de anticuerpos obtenidos por ambos ensayos, y además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, prueba que mide la relación estadística entre 2 variables continuas.

Rango de medición: Para calcular el rango de medición del ensayo, dentro del intervalo analítico de la curva (rango de trabajo), se evaluaron diez muestras con diferentes concentraciones de IgG. De cada concentración se evaluaron dos réplicas en el ensayo **UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD** y la media de los valores de fluorescencia obtenidos, fueron interpolados en un gráfico XY, utilizando el método de interpolación lineal punto a punto con el empleo del programa Strips Reader Software (SRS), versión 9.1 (CIE, Cuba) utilizado en la tecnología SUMA (9) y el de la recta de mejor ajuste.

III. RESULTADOS

La figura 1 nos muestra el comportamiento de la curva de calibración del ensayo. El rango útil de la curva se encuentra en un intervalo aproximado de concentración de IgG de 0 a 245 BAU/mL.

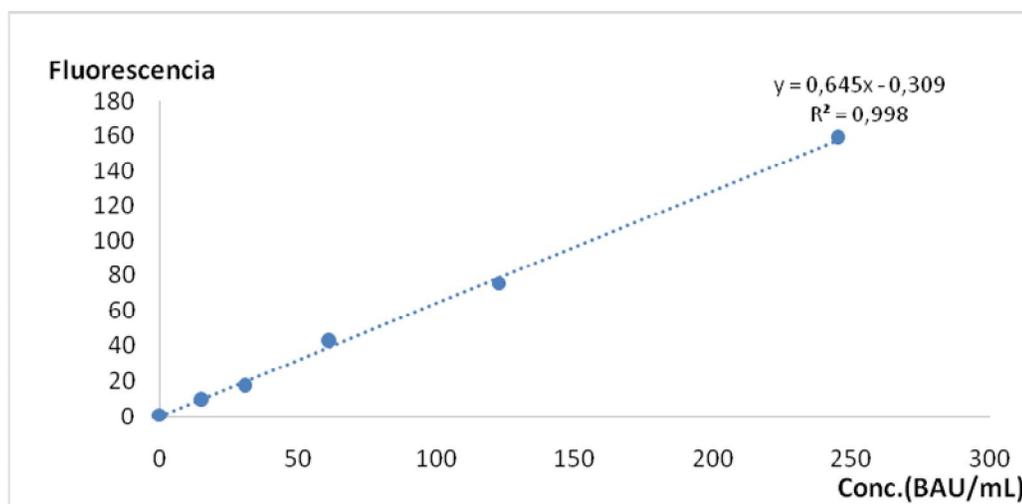


Figura 1. Curva de calibración del UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD.

La especificidad clínica del ensayo al evaluar las muestras del panel 3 fue de 99,51 %, ya que una de las muestras resultó positiva, la evaluación de estas muestras permitió determinar el valor de corte del ensayo, fijado en 25 BAU/mL, valor calculado por la media de la población de dichas muestras negativas más 3 desviaciones estándar. La especificidad analítica obtenido fue del 100 %. Todas las muestras de los paneles 2 y 3 correspondientes a individuos vacunados resultaron positivas, tanto por el ensayo en evaluación como por el de referencia, para un 100 % de sensibilidad. El límite de detección, fue de 2,1 BAU/mL, mientras que el límite de cuantificación, fue de 3,9 BAU/mL.

En la figura 2 se muestran los resultados del estudio de correlación realizado al evaluar las muestras procedentes de individuos incluidos en los ensayos clínicos Soberana 02 y Soberana Pediatría, por los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD y Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S. La figura 3 por su parte, muestra similar análisis pero llevado a cabo con las muestras procedentes de individuos vacunados con Abdala.

Como se observa en ambos gráficos las mayores diferencias se observan en muestras con concentraciones por encima de las 4000 U/mL o BAU/mL, resultado lógico, si tenemos en cuenta que son personas con altos títulos de anticuerpos y las diferencias entre ambos ensayos, el de Roche detecta anticuerpos totales mientras que el UMELISA detecta solo anticuerpos tipo IgG. Al calcular el coeficiente de correlación de Pearson se obtuvieron valores de 0,966 y 0,963 respectivamente, lo que indica una correlación positiva muy alta entre los valores de concentración obtenidos por ambos ensayos.

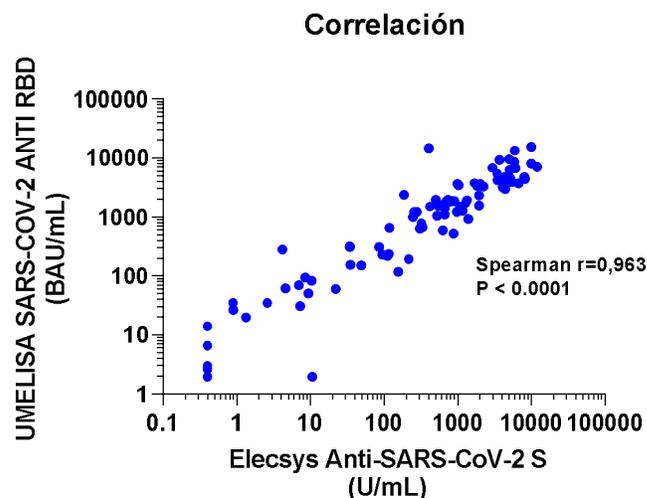
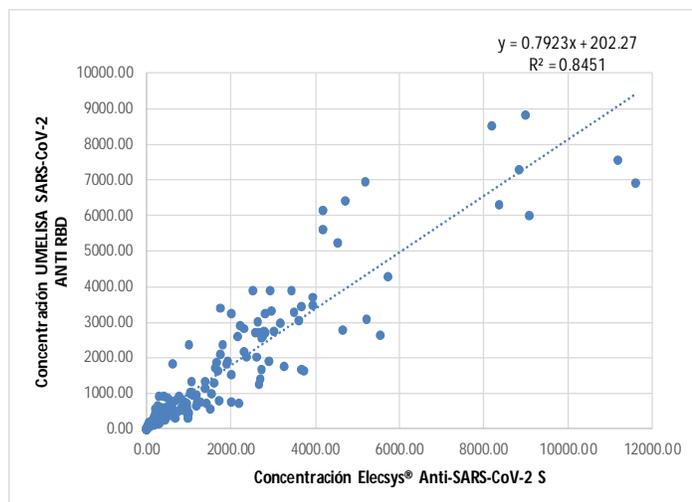


Figura 2. Análisis de correlación de los títulos de anticuerpos obtenidos por los ensayos UMELEISA SARS-CoV-2 ANTI RBD y Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S

Figura 3. Análisis de correlación de los títulos de anticuerpos obtenidos por los ensayos UMELEISA SARS-CoV-2 ANTI RBD y Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S

El análisis estadístico (t-Student) demostró que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración reportados por ambos ensayos para $p < 0,05$.

Actualmente existe consenso en definir como límite inferior del rango de medición el valor de concentración del límite de detección o de cuantificación. El límite superior se establece de acuerdo a distintos factores o criterios como los mencionados en el acápite 8 de materiales y métodos.

Para el caso de los anticuerpos IgG a SARS-CoV-2 existen estándares internacionales aprobados o en desarrollo, pero todos son preparados a partir de muestras de pacientes recuperados, con una respuesta natural a la infección y por consiguiente con anticuerpos dirigidos a todas las proteínas inmunogénicas del virus, por lo que los valores de concentración de IgG asignados a dichos estándares no se corresponden con los que se obtienen en ensayos desarrollados para estudiar la respuesta inmunológica a antígenos vacunales, que emplean únicamente una proteína del virus.

Para el análisis de los resultados obtenidos producto de la cuantificación de las 10 muestras por ambos métodos (regresión lineal y método de ajuste punto a punto de la curva de calibración), que se muestran en la tabla 2, se realizó un análisis de regresión lineal para las muestras que están en un rango entre 24,25-193,32 BAU/mL. La ecuación obtenida se ajusta a un modelo lineal ($y = 0,9911x + 0,0885$) con un nivel de significación del 99 % ($p < 0,01$) y coeficiente de correlación (R) y determinación (R^2) de 0,9995 y 0,9992 respectivamente.

Tabla 1. Comparación de los valores de IgG obtenidos por el ajuste lineal y la interpolación lineal punto a punto.

Muestra	IgG (BAU/mL) (Modelo lineal)	IgG (BAU/mL) (Punto a punto)	Diferencia Absoluta
1	25,38	24,25	-1,12
2	57,43	57,65	0,22
3	63,15	60,71	-2,44
4	79,33	80,82	1,49
5	119,38	118,74	-0,64
6	120,42	121,99	1,57
7	152,40	149,48	-2,92
8	157,80	155,50	-2,30
9	173,50	171,17	-2,33
10	194,20	193,32	-0,87

Teniendo en cuenta que el rango de medición puede definirse como el rango de valores del analito donde se cumplen los criterios de aceptabilidad del método y donde los errores debidos a la no linealidad (imprecisión u otras fuentes) se encuentran dentro de límites definidos (en el caso de las técnicas UMELISA los criterios de aceptación están en un rango de $\pm 20\%$), proponemos utilizar como límite inferior del rango de medición el valor de 3,9 BAU/mL que se corresponde con el límite de cuantificación del ensayo. Se estableció como límite superior de concentración 245 BAU/mL, tomando en consideración que la curva muestra un comportamiento lineal en todo este rango de concentración (3,9 a 245 BAU/mL) y el resultado obtenido en este estudio, donde se evaluaron muestras que se encuentran en todo este rango de cuantificación, con resultados satisfactorios.

IV. CONCLUSIONES

El ensayo desarrollado resulta útil para la cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG anti RBD ya que presenta adecuados niveles de precisión y exactitud, límite de detección y cuantificación, así como de sensibilidad, especificidad clínica y analítica. Se obtuvo además una correlación positiva muy alta entre el **UMELISA SARS-CoV-2 ANTI RBD** y el ensayo Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S y la curva muestra un comportamiento lineal con un rango de medición de 3,9 a 245 BAU/mL.

REFERENCIAS

- 1- Enfermedad por coronavirus, COVID-19. Actualización; 26 de marzo 2020 (versión 2)
- 2- El Taller de Comunicación y CíaS.Coop. P., ed. (marzo de 2020). «Recomendaciones básicas de la OMS para protegerse frente al coronavirus».

3- Chen N-S, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020. published online Jan 29. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).

4- Velavan, Thirumalaisamy P.; Meyer, Christian G. (12 de febrero de 2020). «The COVID-19 epidemic». *Tropical Medicine & International Health* (en inglés) 25 (3): 278-280. ISSN 1365-3156. PMID 32052514. doi:10.1111/tmi.13383.

5- Anderson, Roy M.; Heesterbeek, Hans; Klinkenberg, Don; Hollingsworth, T. Déirdre (marzo de 2020). «How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic?». *TheLancet* (en inglés) 395 (10228): 931-934. PMID 32164834. doi:10.1016/S0140-6736(20)30567-5. Consultado el 4 de abril de 2020.

6- Europa Press, ed. (26 de marzo de 2020). «La transmisión del Covid-19 se produce 1 o 2 días antes del inicio de síntomas y podría seguir en verano». www.infosalus.com. Archivado desde el original el 27 de marzo de 2020. Consultado el 1 de abril de 2020.

7- Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci*2011;2:21-5.

8- Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.EPo6-A. Clinical Laboratory Standards Institute. Vol.23 N°16.Wayne, Pennsylvania, USA. April 2003.

9- Carlos N, Robaina R, Rego A, Fernández JL. Sistema informático SRS para el procesamiento de datos en la tecnología SUMA. *Revista Investigación Operacional*. 2014; 35 (3): 263-272.