



Cuba Salud

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

Validación de un ensayo basado en la tecnología SUMA para la detección de la proteína N del SARS-CoV-2.

Irinia Valdivia Alvarez¹
Aurora Delahanty Fernández²
Ariel Palenzuela Díaz³
Darien Ortega León⁴

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

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

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

4 Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, darien.ortega@cie.cu

Resumen:

Introducción: Aunque el diagnóstico virológico de SARS-CoV-2 se ha realizado fundamentalmente mediante RT-PCR, considerada estándar de oro, las pruebas que detectan antígeno han ido ganando terreno ya que son menos trabajosas y costosas, ofrecen los resultados en un tiempo relativamente menor y su resultado positivo indica infección por SARS-CoV-2. Este trabajo se propuso validar un ensayo, basado en la tecnología SUMA, para el diagnóstico de COVID-19 mediante la detección de la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2.

Método: Se validó el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, ensayo inmunoenzimático tipo sándwich de doble anticuerpo para la detección de la proteína N viral en muestras de exudado nasofaríngeo, para ello se evaluó la sensibilidad, especificidad y el grado de concordancia de sus resultados frente a la RT-PCR (prueba de referencia), empleando 866 muestras de exudado nasofaríngeo con resultado de RT-PCR (137 positivas y 729 negativas).

Resultados: El ensayo mostró una sensibilidad de 81,8%, incrementada a 86,3% en muestras con mayor carga viral, la especificidad fue 97%, el VPP y el VPN de 83,6 % y 96,6%, respectivamente y la concordancia (κ) entre sus resultados y los de la RT-PCR fue “buena”. La exactitud diagnóstica fue de 94,6%. Un estudio realizado en 18 laboratorios SUMA cubanos arrojó 84,1% de concordancia entre sus resultados y la RT-PCR.

Conclusiones: Los resultados alcanzados por el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno durante su validación demuestran la utilidad de esta prueba para el diagnóstico de COVID-19 y el seguimiento de casos positivos.

Palabras claves: SARS-CoV-2, COVID-19, Proteína N, UMELISA, Tecnología SUMA

I. INTRODUCCIÓN

A finales de 2019 se informó el brote de un nuevo coronavirus en Wuhan, China, llamado virus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) (1, 2) que causa una infección respiratoria llamada enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (3). La rápida diseminación de esta enfermedad en varios continentes provocó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declarara como pandemia el 11 de marzo de 2020 (4). 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 (5, 6).

SARS-CoV-2 es un virus envuelto con un genoma de ARN de sentido positivo y con una nucleocápside de simetría helicoidal. Su genoma codifica para al menos 16 proteínas no estructurales y 4 proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (7, 8). 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) (9). Las proteínas M y E son necesarias para el ensamblaje viral (10, 11) y la proteína N es una de las principales proteínas estructurales del virus y participa en la transcripción y replicación del ARN viral (12). Se reporta que, en muchos coronavirus, incluyendo el SARS-CoV-2, la proteína N tiene una alta actividad inmunogénica, así como la S (13, 14) y es la más abundante del SARS-CoV-2 ya que cada virión transporta alrededor de 1 240 copias, en comparación con las aproximadamente 30 copias de la proteína S, lo cual potencia su valor para el diagnóstico (15, 16).

Hasta la fecha, el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 se basa fundamentalmente en la prueba molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), que continúa siendo el “estándar de oro” del diagnóstico por sus altos niveles de sensibilidad y especificidad. Las pruebas que detectan antígeno son menos trabajosas, ofrecen los resultados en un tiempo relativamente más corto y tienen menor costo, a pesar de ser menos sensibles que la RT-PCR. No obstante, han mostrado suficiente sensibilidad para detectar casos con alta carga viral, que probablemente constituyen la mayor fuente de transmisión de COVID-19. Por otra parte, con la intensificación de la pandemia, la demanda de diagnóstico de los laboratorios de PCR se ha incrementado ostensiblemente por el alto volumen de muestras a procesar, lo que ha extendido el tiempo de entrega de los resultados, con las consecuencias epidemiológicas que esto conlleva. Es por ello que las pruebas de antígeno pueden servir de complemento para el diagnóstico, siempre y cuando estén adecuadamente validadas y sean empleadas teniendo en cuenta las circunstancias epidemiológicas y/o clínicas de la muestra a evaluar (17). Algunos países usan estas pruebas como parte de su estrategia en el enfrentamiento a la COVID-19 para la detección temprana de casos, el oportuno rastreo de sus contactos; así como la implementación de los protocolos de aislamiento y cuarentena (18).

La infectividad del SARS-CoV-2 por lo general se asocia con altos niveles de carga viral, por tanto, varios estudios aseveran que la sensibilidad de las pruebas de antígeno es mayor en este tipo de muestras, que en RT-PCR presentan valores de Ct (ciclo de amplificación) ≤ 30 según algunos autores o ≤ 33 , en opinión de otros (18, 19, 20). Por el contrario, se ha reportado que los falsos negativos de estas pruebas corresponden a individuos con baja carga viral y por consiguiente baja infectividad (17).

Se reporta que las pruebas de antígeno son más útiles durante la aparición de los síntomas en personas sintomáticas y en la fase inicial de la infección, en el caso de las asintomáticas (21). Estas pruebas pueden también formar parte del programa de exámenes periódicos para la identificación, el aislamiento y por tanto, el descarte de individuos con infección activa (22, 23).

La OMS recomienda el uso de pruebas de antígeno que posean como parámetros de funcionamiento una sensibilidad $\geq 80\%$ y una especificidad $\geq 97\%$ (17). No obstante, la prueba de RT-PCR continúa siendo la referencia para el diagnóstico, por lo que se recomienda su uso para la confirmación de todos los casos que resulten positivos en las pruebas de antígeno; así como de aquellos que aun teniendo un resultado de antígeno negativo, su situación epidemiológica o clínica apunte a una posible infección con SARS-CoV-2.

OBJETIVO

Evaluar las características funcionales del ensayo **UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno**, para la detección de antígenos correspondientes a la proteína de la nucleocápside viral (N) en muestras de exudado nasofaríngeo procedentes de individuos con sospecha de COVID-19.

II. MÉTODO

Ensayo: El **UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno** es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo sándwich de doble anticuerpo, que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina. Este ensayo utiliza como fase sólida placas de ultramicroELISA revestidas con anticuerpos específicos a la proteína (N) del SARS-CoV-2.

Las muestras de exudado nasofaríngeo deben ser colectadas en medios de transporte viral universales, que no contengan sustancias inactivantes. Las mismas requieren de un paso de preparación en el cual la proteína N es extraída, en caso de encontrarse presente. Posteriormente, se incuban en los pocillos de las tiras y los anticuerpos en su superficie capturan los antígenos correspondientes a la proteína N. A continuación, previo lavado que elimina los componentes de la muestra no fijados, se añaden anticuerpos biotinilados específicos a la proteína N, que se unirán al complejo anticuerpo-antígeno formado sobre la fase sólida. Un nuevo lavado eliminará los anticuerpos biotinilados que no reaccionaron y quedaron en exceso. Seguidamente se añade el conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina, que se unirá a las moléculas de biotina y luego de otro paso de incubación y lavado, se adiciona el sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de antígenos de SARS-CoV-2 en la muestra.

Para esta validación se emplearon como resultados de referencia los obtenidos por RT-PCR.

Paneles de muestras:

Panel 1: 866 muestras de exudado nasofaríngeo con resultado de RT-PCR: 636 (73,4 %) tomadas en medio de transporte viral BTV, BIOGEN, Cuba y 230 (26,6 %) tomadas en medio de transporte viral CITOSWAB, China.

De ellas:

-729 muestras negativas al SARS-CoV-2 según resultado de RT-PCR.

-137 muestras positivas al SARS-CoV-2 según resultado de RT-PCR. De ellas, 134 muestras con valor de $Ct \leq 33$ y 3 con $Ct \geq 33$.

Todas las muestras del Panel 1 fueron evaluadas dentro de las 48 horas posteriores a su colecta.

Panel 2: 901 muestras de exudado nasofaríngeo con resultado de RT-PCR, que fueron evaluadas en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno después de 48 horas de haber sido colectadas.

Parámetros de validación:

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

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

Especificidad clínica: Para calcular este parámetro se emplearon las muestras del panel 1. Se expresó como el porcentaje de negatividad en muestras donde el analito a determinar estuvo ausente, se empleó la siguiente ecuación:

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

Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de estar infectado o enfermo que tiene un individuo, cuando el resultado del ensayo ha sido positivo o reactivo. Es la proporción de individuos con resultados positivos o reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. $(VPP (\%) = [\text{Total de verdaderos positivos} / (\text{Total de verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos})] \times 100)$

Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de no estar infectado o enfermo que tiene un individuo, cuando el resultado del ensayo ha sido negativo o no reactivo. Es la proporción de individuos con resultados negativos o no reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. $(VPN (\%) = [\text{Total de verdaderos negativos} / (\text{Total de verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos})] \times 100)$

Concordancia: Se empleó como método de referencia la RT-PCR, se calculó por medio del Índice Kappa (κ), que es una prueba basada en la comparación de los índices de concordancia esperados (pe) respecto a los índices de concordancia observados (po).

La concordancia fue también determinada por medio de la Exactitud diagnóstica = $[(\text{verdaderos positivos} + \text{verdaderos negativos} / \text{total (positivos} + \text{negativos)})] \times 100$, como método para determinar la utilidad clínica del diagnosticador.

Adicionalmente, 105 muestras PCR positivas del panel 1 se evaluaron simultáneamente en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno y la prueba rápida SARS CoV-2 Rapid Antigen Test, de SD BIOSENSOR, Korea del Sur, distribuida por Roche Diagnostics GmbH.

III. RESULTADOS

Para la evaluación de la sensibilidad clínica se emplearon las muestras del Panel 1 clasificadas como positivas al SARS-CoV-2 según resultado de RT-PCR. De 137 muestras PCR positivas, 112 fueron también positivas en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, resultando 25 muestras falsas negativas, para una sensibilidad de 81,8 %, lo cual cumple con la recomendación de la OMS, publicada en el Technical Report of European Center for Disease Prevention and Control, de noviembre de 2020, acerca del uso de pruebas de antígeno que posean como parámetro de funcionamiento una sensibilidad ≥ 80 % y una especificidad ≥ 97 %.

En nuestro estudio, la sensibilidad de la prueba se incrementó de 81,8 a 83,6 % para muestras con valores de $Ct \leq 33$ y a 86,3 % para muestras con valores de $Ct \leq 30$.

Atendiendo a que se reporta que las pruebas de antígeno son más útiles durante la aparición de los síntomas en personas sintomáticas y en la fase inicial de la infección, en el caso de las asintomáticas (19), se evaluó el comportamiento de la sensibilidad del UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno en estos grupos (Figura 1). El análisis se llevó a cabo en 106 de las 137 muestras PCR positivas del Panel 1, ya que para 31 muestras no se obtuvo el dato de sintomático/asintomático. Nuestros resultados coincidieron con lo reportado internacionalmente: 7 de 10 muestras asintomáticas fueron positivas en el ensayo, para un 70 % de sensibilidad en este grupo, en tanto de 96 individuos evaluados que presentaban síntomas, 80 resultaron positivos en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, para una sensibilidad de 83,3 % en personas con sintomatología de COVID-19.

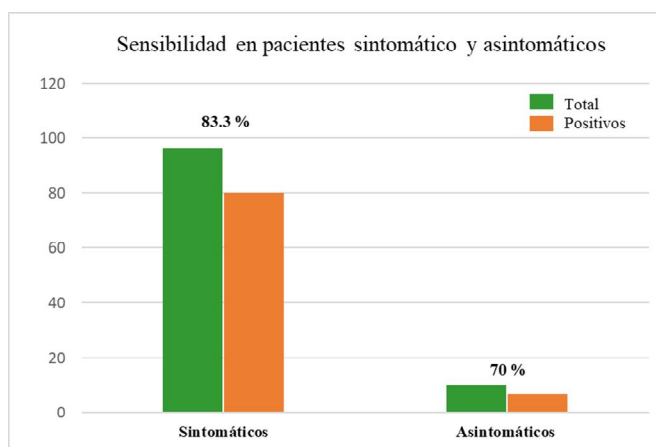


Figura 1. Sensibilidad del UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Para evaluar el efecto del tiempo de colecta de la muestra en los resultados de la prueba, se evaluaron las muestras del Panel 2 (Tabla 1). De 774 muestras de este panel clasificadas como negativas por RT-PCR, 712 tuvieron igual comportamiento en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, resultando 62 muestras falsas positivas, para una especificidad de 92,0 %. La sensibilidad, sin embargo, se comportó de

manera similar (81,9 %), ya que de 127 muestras PCR positivas, 104 fueron detectadas en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, resultando 23 muestras falsas negativas. Estos resultados indican que existe afectación de la especificidad de la prueba, que decrece de 97 a 92 %, cuando las muestras son evaluadas a más de 48 horas de haber sido colectadas, en este caso el tiempo de evaluación se extendió desde más de 48 horas hasta poco más de 72 horas de haber sido tomadas las muestras.

Tabla 1. Efecto del tiempo de colecta de la muestra en los resultados de la prueba

<i>Tiempo de colecta</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>
Hasta 48 horas	81,8 %	97,0 %
Más de 48 horas	81,9 %	92,0 %

Para comparar los resultados del UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno con los de la prueba rápida de antígeno SARS CoV-2 Rapid Antigen Test, de SD BIOSENSOR, se evaluaron en ambas pruebas 105 muestras PCR positivas, correspondientes al Panel 1. El UMELISA detectó 90 de las 105 muestras, para una sensibilidad de 85,7 %, en tanto la prueba rápida alcanzó una sensibilidad de 80,9 % ya que detectó 85 muestras de las 105. Este resultado demuestra que el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno puede ser empleado para labores de pesquiasaje, contribuyendo a sustituir importaciones en el diagnóstico de COVID-19 en el país.

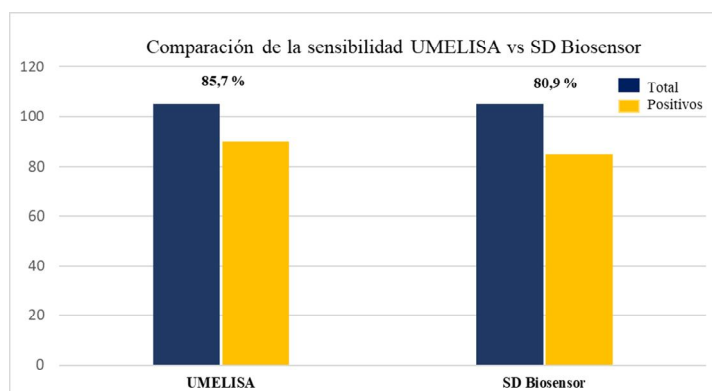


Figura 2. Comparación de la sensibilidad del UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno contra la prueba rápida SD Biosensor.

La evaluación de la especificidad clínica se realizó utilizando las muestras negativas al SARS-CoV-2 según resultado de RT-PCR correspondientes al Panel 1. De 729 muestras clasificadas como negativas por RT-PCR, 707 tuvieron igual comportamiento en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno, resultando 22 muestras falsas positivas, para una especificidad de 97,0 %.

Los VPP y VPN alcanzados fueron 83,6 % y 96,6 %, respectivamente e indican que el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno arrojó un diagnóstico correcto en más del 80 % de los individuos infectados con SARS-CoV-2 y en más del 95 % de los individuos sanos evaluados.

La concordancia en términos de Exactitud diagnóstica fue 94,6 %, lo que significa que en el UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno el 94,6 % de las muestras evaluadas fueron correctamente diagnosticadas. Asimismo, la concordancia de los resultados entre este ensayo y la prueba RT-PCR, empleada como referencia, fue buena, con un Índice Kappa (κ) de 0,79 (IC 95 % 0,74 - 0,85).

IV. CONCLUSIONES

El UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno mostró un adecuado desempeño de sus características funcionales, con niveles de sensibilidad y especificidad que se ajustan a las recomendaciones de la OMS. La sensibilidad de la prueba se incrementó de 81,8 a 86,3 % en muestras con alta carga viral ($Ct \leq 30$). La concordancia entre sus resultados y la RT-PCR fue buena, con un Índice Kappa (κ) de 0,79 y una Exactitud diagnóstica que demuestra que el 94,6 % de las muestras evaluadas en este ensayo fueron correctamente diagnosticadas.

Los resultados alcanzados por el ensayo durante su validación demuestran la utilidad de esta prueba para el diagnóstico de COVID-19 y el seguimiento de casos positivos.

REFERENCIAS

- 1.- WANG C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020, 395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
2. Zhu N, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020, 382:727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- 3.- WANG, Chen, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, 2020, vol. 395, no 10223, p. 470-473.
- 4.- WHO. 2020. Coronavirus disease 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- 5.- HUANG Chaolin, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020, vol. 395, no 10223, p. 497-506.
- 6.- 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).
- 7.- Lu R, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395:565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- 8.- Sotomayor F, et al. General aspects about the structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Artículo de Revisión. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2020; 39(3):e867.
- 9.- LI Fang, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*, 2005, vol. 309, no 5742, p. 1864-1868.
- 10.- Neuman BW, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* 174:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>.
- 11.- Nieto-Torres JL, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog* 10:e1004077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>.
- 12.- Chang CK, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci* 13:59 –72. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9035-9>.
- 13.- Che XY, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol* 42:2629 - 2635. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004>.

- 14.- Chen S, et al. Double-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:549 –553. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1378-7>. 2005.
- 15.- Ke Z, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*. Aug 17 2020.
- 16.- Bezstarosti K, et al. Targeted Proteomics for the detections of SARS-CoV-2 proteins. *BioRxiv*. 2020.04.23.057810; <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.057810>.
- 17.- Technical Report of European Center for Disease Prevention and Control. Nov 19 2020.
- 18.- World Health Organization (WHO). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Geneva: WHO; 2020 [updated 11 September 2020; cited 8 November 2020]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.
- 19.- US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim Guidance for Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. Atlanta: CDC; 2020 [updated 4 September 2020; cited 9 November 2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
- 20.- Van Walle I, Leitmeyer K, Broberg EK. Meta-analysis of the clinical performance of commercial SARS-CoV-2 nucleic acid, antigen and antibody tests up to 22 August 2020. *medRxiv*. 2020.09.16.20195917.
- 21.- World Health Organization (WHO). Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim guidance. 11 September 2020. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>. Accessed 25 September 2020.
- 22.- Larremore DB, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 surveillance. *medRxiv* 2020.06.22.20136309.
- 23.- Mina MJ, et al. Rethinking COVID-19 Test Sensitivity. A Strategy for Containment. *N Engl J Med*. Mar 19 2020; 382(12):1177-1179.