

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Desarrollo de un ELISA basado en la proteína de nucleocápside
recombinante para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2**

Evelyn María Rodríguez Araba

Universidad Nacional, Heredia, 14 de junio de 2023

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional
en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para
optar al grado *Magister Scientae*

Miembros del Tribunal Examinador

M.Sc. Randall Gutiérrez Vargas /Dra. Damaris Castro García /Dr. Jorge Herrera Murillo/ Dr. José Vega Baudrit /Dr. Greivin Rodríguez Calderón/ Dra. Rocío Castillo Cedeño

Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Sandra Estrada König
Coordinador del posgrado o su representante

PhD. Gaby Dolz Wiedner
Tutor de tesis

PhD. Frank Solano Campos
Miembro del Comité Asesor

PhD. Javier Alvarado Mesén
Miembro del Comité Asesor

Evelyn María Rodríguez Araba
Sustentante

Resumen general

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es la causa de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), una enfermedad altamente contagiosa que afecta principalmente al sistema respiratorio y se divide en categorías, según la gravedad, a saber, en asintomático, leve, moderado y grave.

El primer objetivo del presente estudio fue producir la proteína de la nucleocápside (proteína N) recombinante de SARS-CoV-2 para ser utilizada en un inmunoensayo (ELISA) para evaluar la respuesta de anticuerpos de tipo IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en tres grupos de pacientes con diferentes días de evolución de la enfermedad (Grupo 1: <15 días, grupo 2: 16-25 días y grupo 3: >25 días). La secuencia de codificación de esta proteína se optimizó para la expresión en *E. coli* y se subclonó en el plásmido pET24a(+), lo que dio como resultado una proteína etiquetada con 6xHis de 46 kDa. La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados y se evaluó en inmunoblot y ELISA. Un total de 200 sueros prepandémicos y 204 sueros de pacientes con SARS-CoV-2 (confirmados por técnica molecular), se utilizaron para establecer el punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ensayo. Las sensibilidades de los ELISA para detectar los niveles séricos de anticuerpos de las clases IgG (H+L), IgM, IgA y la subclase IgG1 contra la proteína N fueron 81,4%, 83,3%, 81,9% y 84,8%, y las especificidades 90,1%, 77,6%, 88,1% y 85,6%, respectivamente. Se determinó mayor sensibilidad de los inmunoensayos en el Grupo 1, excepto para IgM. Se determinó un aumento significativo de la media de las unidades ELISA (UE) para IgG (H+L), IgA e IgG1 en el Grupo 1, mientras que para el IgM se determinó un aumento de estos valores en el Grupo 2. Anticuerpos de tipo IgG4 se detectaron solamente en 12/204 muestras. No se logró estandarizar los ELISA para IgG2 e IgG3.

El segundo objetivo del trabajo fue investigar títulos de anticuerpos de las clases IgG (H+L), IgA e IgM y subclases IgG1 e IgG4 dirigidos contra la proteína N de SARS-CoV-2 en pacientes según la gravedad de la enfermedad, sexo y edad. Se analizaron 204 sueros de pacientes con COVID19, 92 hombres y 112 mujeres,

los cuales se agruparon en tres grupos etarios: 18-35 años (n = 69), 36-60 años (n = 70), >61 años (n = 65), y en cuatro grupos de pacientes: pacientes con enfermedad grave (n = 57), pacientes con enfermedad moderada (n = 49) y pacientes con enfermedad leve (n = 50), además, un grupo de pacientes que resultaron positivos durante el periodo de dominancia de la variante ómicron (n = 48) y que se encontraban hospitalizados con enfermedad grave. Los anticuerpos IgG (H+L) e IgA mostraron las medias de UE más altos. Los pacientes graves mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos ($p < 0.05$) en comparación a los pacientes moderados, leves y pacientes positivos durante el periodo de dominancia de la variante ómicron. No se determinó correlación entre el sexo y los niveles de anticuerpos. En cuanto a las edades solamente se determinó diferencia significativa ($p < 0,05$) para el anticuerpo IgM. Se pudo demostrar una correlación moderada para IgM e IgG(H+L) ($r = 0,6672$, $p < 0,0001$), IgM e IgA ($r = 0,5487$, $p < 0,0001$), e IgG(H+L) e IgA ($r = 0,6620$, $p < 0,0001$) en los pacientes graves. Se logró demostrar que niveles séricos de anticuerpos contra la proteína N se correlacionan significativamente con la gravedad de la infección por COVID-19 y que en la enfermedad grave los altos títulos de diversos anticuerpos están correlacionados. Los inmunoensayos desarrollados en el presente estudio son adecuados para la detección de anticuerpos contra la proteína N del SARS-CoV-2 y podrían usarse para monitorear la respuesta inmune y determinar las infecciones naturales.

Palabras clave:

COVID-19, ELISA, proteína nucleocápside, IgG(H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG4 sensibilidad, especificidad

Agradecimientos

Al DAAD por la beca recibida para esta maestría, su apoyo durante la estancia y sobre todo la oportunidad de crecimiento profesional que me brindaron.

A mi tutora la Dra. Gaby Dolz quiero agradecer por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia. Gracias por su guía y todos sus consejos y la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

A mi lector Dr. Frank Solano por recibirme en su laboratorio y brindarme todo el apoyo, asesoramiento y sobre todo paciencia para la realización de este trabajo.

A mi lector Dr. Javier Alvarado por brindarme su asesoría, conocimientos y abrirme las puertas de su laboratorio durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Marvin Durán por todo el apoyo y conocimientos transmitidos y sobre todo por la escogencia de las muestras para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Juan José Romero por sus acertados consejos y asesoría en la implementación de la técnica inmunoenzimática.

A mis compañeros, Brayan Montoya, Elisa Alcántara y Sonia Flores los cuales se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos. Gracias por el tiempo que pasamos juntos, los trabajos que hicimos juntos y las historias que vivimos.

Dedicatoria

A Dios por darme la oportunidad de estar con vida, por darme salud y la sabiduría para realizar todo lo que me propongo, en especial este trabajo.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo y paciencia durante mi estancia en el extranjero.

ÍNDICE

Resumen general	III
Agradecimientos	V
Dedicatoria.....	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
Introducción General	XI
Referencias Bibliográficas	XXII
ARTÍCULO 1	1
Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Materiales y métodos	5
2.1. Diseño del estudio	5
2.2. Consideraciones bioéticas.....	5
2.3. Sueros humanos	5
2.4. Obtención de la proteína N recombinante de SARS-CoV-2.....	6
2.4.1. Expresión de la proteína N en <i>E. coli</i>	6
2.4.2. Extracción y purificación de la proteína N.....	7
2.4.3. Análisis cualitativo y cuantitativo del antígeno recombinante purificado.....	7
2.4.4. Inmunoblot con anticuerpo anti-His.....	8
2.4.5. Inmunoblot con sueros SARS-CoV-2 positivos y negativos.....	9
2.5. Implementación de la técnica serológica.....	9
2.6. Análisis estadístico	10
3. Resultados	11
4. Discusión.....	24
5. Conclusiones	29
6. Recomendaciones	29
7. Referencias bibliográficas	29
ARTÍCULO 2	34

Resumen	34
Abstract.....	35
1. Introducción	36
2. Materiales y métodos	38
2.1. Diseño de estudio	38
2.2. Consideraciones bioéticas.....	38
2.3. Tipo, tamaño y caracterización de la muestra.....	38
2.4. Técnica inmunoenzimática (ELISA).....	39
2.5. Análisis Estadístico	39
3. Resultados	40
4. Discusión.....	47
5. Conclusiones	50
6. Recomendaciones	50
7. Bibliografía.....	50
Discusión general	55
Conclusiones generales	61
Recomendaciones generales.....	62
Anexos	63

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO 1

Figura 1. Análisis de la eficiencia de purificación de la proteína N recombinante mediante SDS-PAGE.....	11
Figura 2. Análisis de Western Blot para confirmar la identidad de la proteína N.....	13
Figura 3. Inmunoblot de la proteína recombinante N con sueros controles positivos y negativos.....	13
Figura 4. Resultados de la implementación del inmunoensayo utilizando dos agentes bloqueadores y dos tampones de adsorción de antígeno.....	15
Figura 5. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones de suero.....	16
Figura 6. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones de los conjugados.....	17
Figura 7. Resultados de la dilución del suero y titulación del conjugado para Ig4.....	18
Figura 8. Distribución de los valores de UE obtenidos con los 200 sueros prepandémicos negativos.....	19
Figura 9. Curva de ROC, mostrando el rendimiento diagnóstico de los ELISA.....	20
Figura 10. Valores de UE de los 200 sueros prepandémicos (negativos) y de los 204 sueros SARS-CoV-2 PCR positivos con diferentes días de evolución de la enfermedad.....	23
Figura 11. Tendencia dinámica de la tasa positiva en sueros de pacientes con diferentes días de evolución de la enfermedad.....	24

ARTÍCULO 2

Figura 1. Títulos de anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 contra la proteína N de SARS-CoV-2.....	41
Figura 2. Correlación entre anticuerpos contra proteínas N en sueros con enfermedad grave.....	42

Figura 3 Correlación entre anticuerpos contra proteínas N de pacientes con enfermedad leve	43
Figura 4. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 en pacientes masculinos y femeninas.	44
Figura 5. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 en tres diferentes grupos etarios sin tomar en cuenta la gravedad de la enfermedad.....	45
Figura 6. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 en tres diferentes grupos etarios con enfermedad grave.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

ARTICULO 1

Cuadro 1. Concentración de proteína en las eluciones obtenidas a partir de 200 ml de cultivo inicial.....	12
Cuadro 2. Comparación de los puntos de corte establecidos por la curva ROC comparados con la desviación estándar, valores de sensibilidad y especificidad y razón de verosimilitud.....	21
Cuadro 3: Sensibilidad y especificidad de los diferentes inmunoensayos con respecto a los días de evolución de la enfermedad y razón de verosimilitud.....	22

ARTICULO 2

Cuadro 1: Mediana de los títulos de anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 (medido en unidades ELISA) de los diferentes grupos de pacientes	40
--	----

Introducción General

Historia, etiología y epidemiología

Los coronavirus (CoV) son virus que infectan tanto a humanos como a animales y causan una variedad de enfermedades, entre las que destacan enfermedades respiratorias y entéricas (Ou et al., 2020). Los Coronaviridae se subdividen en cuatro géneros, los *Alfa*, *Beta*, *Gamma* y *Deltacoronavirus* (Fehr & Perlman, 2015), de estos los que infectan a humanos pertenecen a los *Alfa* y *Betacoronavirus* (Junejo et al., 2020). Se han identificado CoV también en otros hospedadores mamíferos, incluidos perros y gatos (Zheng, 2020).

Todos los CoV que infectan a los seres humanos pueden causar infección de leve a grave y utilizar hospedadores intermediarios. A principios de 2019, solo se conocían seis CoV que podían infectar a los seres humanos y causar enfermedades respiratorias: HCoV-229E y NL63 (*Alfacoronavirus*), y HCoV-OC43, HCoV- HKU, SARS-CoV y MERS-CoV (*Betacoronavirus*). En diciembre 2019, se encontró un nuevo coronavirus zoonótico, llamado SARS-CoV-2, en pacientes con neumonía grave en Wuhan, China. Análisis genéticos sobre el SARS-CoV-2 encontraron una similitud genética del 50% con el MERS-CoV y del 80% con el SARS-CoV (Junejo et al., 2020). El brote actual de infecciones con SARS-CoV-2 se denomina Enfermedad de Coronavirus 2019 (COVID-19) por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS declaró oficialmente al COVID-19 una pandemia el 11 de marzo de 2020 (Park, 2020). Costa Rica ha reportado 1,229,587 casos acumulados a mayo de 2023 (Pan American Health Organization [OPS], s.d.).

Etiología

El SARS-CoV-2 pertenece al orden Nidovirales, familia Coronaviridae y género *Betacoronavirus* (Romano et al., 2020). Los viriones son envueltos y esféricos, con un diámetro de aproximadamente 125 nm, tienen nucleocápsides helicoidales simétricas (Fehr & Perlman, 2015), y presentan un genoma de ARN monocatenario lineal de aproximadamente 30 kb (Cosar et al., 2022). El genoma de los coronavirus contiene cuatro proteínas estructurales y dieciséis proteínas no estructurales (nsp1–16) (Wang et al., 2020), estas últimas son necesarias para la

replicación y el ensamblaje del virus (Thakur et al., 2022). Las proteínas estructurales son las proteínas espícula o spike (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N). La función principal de la proteína N es proteger el genoma viral, esta proteína junto con la proteína M de la envoltura viral participan en la condensación y empaquetamiento del genoma en la partícula viral para evadir la respuesta inmune del hospedador (Romano et al., 2020). La proteína N está compuesta por 419 residuos de aminoácidos y está altamente conservada en el género CoV, siendo una de las proteínas estructurales más abundantes en las células infectadas (Bai et al., 2021). Se estima que se incorporan 1000 copias de la proteína N en cada virión en comparación con solo 100 copias de la proteína S (Wu et al., 2021). Por otra parte, los CoV usan su glicoproteína S para unirse al receptor en la célula del hospedador y la misma también sirve para mediar la fusión de la membrana y la entrada del virus. Cada monómero de la proteína S trimérica contiene dos subunidades, S1 y S2, la proteína S1 sirve para unirse al receptor de la célula huésped, que es la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), y la S2 para fusionar la envoltura del virus con la membrana celular del huésped (Ou et al., 2020).

La subunidad S1 consta de un dominio N-terminal (NTD) y un dominio de unión al receptor (RBD). El RBD reconoce específicamente al receptor ACE2 y es uno de los objetivos principales para los compuestos antivirales y los anticuerpos (Wang et al., 2020). Desde el inicio de la pandemia se han producido miles de mutaciones en el SARS-CoV-2, las mismas ocurren espontáneamente. Las mutaciones más importantes se encuentran en el gen que codifica para la proteína S, la cual está implicada en la entrada del virus a las células. Actualmente se han establecido alrededor de 4.000 mutaciones en el gen de la proteína S, la mayoría polimorfismos de un solo nucleótido (Cosar et al., 2022). Por otra parte, el gen de la proteína N está altamente conservado entre los CoV y es más estable con tasas de mutación más bajas que la proteína S. Algunas mutaciones pueden aumentar la transmisión y la virulencia del virus, por lo que las variantes se clasifican por la OMS como variantes de preocupación (VOC), variantes de interés (VOI) o variantes bajo seguimiento (VUM) (Thakur et al., 2022).

La variante ómicron surgió en noviembre de 2021 y está clasificada como VOC (CDC, s.f.), esta variante posee más de 30 mutaciones en la proteína S. La proteína S de ómicron no puede utilizar de forma eficaz la proteasa celular TMPRSS2, que promueve la entrada celular a través de la fusión de la membrana plasmática, por lo que esta variante depende en gran medida de la entrada a la célula a través de la vía endocítica, con una consecuente patogenicidad reducida (Meng et al., 2022).

Transmisión

El SARS-CoV-2 se propaga principalmente a través de aerosoles, dentro de un rango de 1,8 metros. Una transmisión del virus ruta fecal-oral también parece ser posible (Park, 2020), así mismo se ha encontrado en la orina de pacientes infectados (Wang et al., 2020). El riesgo de transmisión vertical es bastante bajo y se presenta más que todo en el tercer trimestre de embarazo (Kotlyar et al., 2021). En superficies plásticas y de acero inoxidable se pudo demostrar la presencia del virus hasta por 2-3 días, en cartón hasta por un día y en cobre hasta por cuatro horas. En todos los casos se determinó la presencia de ARN, pero no se estableció la viabilidad del virus (Cascella et al., 2020). La transmisión del SARS-CoV-2 se da sobre todo durante el periodo de incubación (CDC, 2020). Se ha demostrado que la carga viral es más alta en el día 0 del inicio de los síntomas (Slifka & Gao, 2020) y algunos análisis sugieren que la diseminación viral puede comenzar de 5 a 6 días antes de la aparición de síntomas (periodo presintomático) (He et al., 2020).

Los animales domésticos como patos, gallinas y los cerdos no son susceptibles a la infección. Por otra parte, se ha descubierto que algunos animales como el tigre, el perro y el gato, se infectan con el virus a través del contacto cercano con personas infectadas (Wang et al., 2020), así mismo se ha demostrado experimentalmente la transmisión de gato a gato (Hosie et al., 2021). El primer caso documentado de infección por SARS-CoV-2 en animales fue un perro de 17 años en Hong Kong y fue el primer caso de transmisión de persona a animal. Estudios mostraron que las secuencias genéticas del SARS-CoV-2 detectadas en dos perros eran las mismas que en los casos humanos correspondientes, lo que sugiere la

transmisión de persona a animal. Sin embargo, se desconoce aún si los perros infectados pueden transmitir el virus a las personas (Sit et al., 2020).

Signos clínicos

Los síntomas de COVID-19 varían mucho durante el curso de la enfermedad, sin embargo, la mayoría de las personas experimentarán los siguientes signos: fiebre o escalofríos, tos, falta de aire o dificultad para respirar, fatiga, dolores musculares o corporales, dolor de cabeza, pérdida del gusto (ageusia) u olfato (anosmia), dolor de garganta, congestión o secreción nasal, náuseas o vómitos y diarrea (CDC, 2020). El COVID-19 se divide en categorías según la gravedad: asintomático, leve, moderado, grave y crítico. Los asintomáticos son aquellos individuos que dan positivo por una prueba de amplificación de ácido nucleico mediante la técnica retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) o una prueba de antígeno y que no presentan síntomas. Los enfermos leves presentan síntomas como fiebre, tos y dolor de garganta, pero no presentan dificultad para respirar. Los enfermos moderados muestran síntomas de enfermedad de las vías respiratorias inferiores con una saturación de oxígeno (SpO_2) ≥ 94 %. Los enfermos graves son individuos que tienen $SpO_2 < 94$ %, aumento de la frecuencia respiratoria e infiltración pulmonar. Y por último los enfermos críticos presentan insuficiencia respiratoria, shock séptico y disfunción multiorgánica (National Institutes of Health [NIH]). Sin embargo, la mayoría de los pacientes solo presentan síntomas leves y se recuperan sin problemas (Wang et al., 2020).

En los animales, específicamente los gatos la infección puede estar asociada con síntomas respiratorios e intestinales (Hosie et al., 2021). Por otra parte la nueva variante británica B.1.1.7 infecta a perros y gatos con manifestaciones clínicas poco frecuentes, incluida una cardiopatía grave con deterioro del estado de salud general de los animales sin síntomas respiratorios (Ferasin et al., 2021). El tiempo de incubación del virus es de 3 a 7 días, con una media de 5,2 días, aunque también se han reportado periodos de incubación de hasta 24 días en casos raros (Zheng, 2020).

Patogénesis

El virus ingresa a los pulmones a través del tracto respiratorio superior e infecta las células del epitelio alveolar tipo 2 (AT2). La proteína S del SARS-CoV-2 se une a los receptores ACE2 en las células AT2, estos receptores también se encuentran en el epitelio tubular del riñón, corazón, enterocitos, páncreas y células endoteliales (Vallamkondu et al., 2020), posibilitando al virus infectar células en múltiples órganos después de la viremia, también después de la deglución del virus o por transporte axonal (Trypsteen et al., 2020), ocasionando una enfermedad multisistémica (Cevik et al., 2020).

La presencia del virus en órganos no es directamente proporcional a la presencia de los receptores ACE2. Así, por ejemplo, en los pulmones encontramos una carga viral alta y muy poca cantidad de receptores, por otra parte, en el colon encontramos también una carga viral alta, pero, menor cantidad de receptores ACE2 en comparación al intestino delgado. Algunas comorbilidades que están asociadas con enfermedad grave se caracterizan por altos niveles de receptores ACE2, como por ejemplo en pacientes con insuficiencia cardíaca, diabetes, tabaquismo e hipertensión. Por otra parte, los niveles elevados de ACE2 soluble en plasma en niños parecen ayudar a neutralizar el virus. Faltan estudios para esclarecer si la gravedad de la enfermedad es consecuencia directa de la expresión de este receptor (Trypsteen et al., 2020).

Una vez dentro de la célula, el virus libera su ARN de sentido positivo, el cual es utilizado para producir sus proteínas mediante el ribosoma de la célula huésped. La primera proteína que traduce es una ARN polimerasa dependiente de ARN para duplicar su ARN (Vallamkondu et al., 2020). El virus estimula a los macrófagos, los cuales detectan células infectadas a través de receptores endosomales tipo Toll (Lamers & Haagmans, 2022). Los macrófagos a su vez activados liberan mediadores inflamatorios como citocinas (IL-1, IL-6 y TNF α) y quimiocinas (CXCL10 y CCL2) en el torrente sanguíneo (Vallamkondu et al., 2020). Se ha demostrado que el principal factor inmunológico relacionado con la inflamación y el daño pulmonar en esta infección es la activación de los macrófagos y su migración a los pulmones (Devarasetti et al., 2021). En las últimas etapas de la enfermedad, todos estos pasos pueden causar dificultad para respirar, hipoxemia y tos. Las IL-1, IL-6 y TNF-

α liberadas a la circulación sanguínea, activan la liberación de prostaglandina 2 y ocasionan un aumento de la temperatura corporal. Debido al estado hipóxico, los nervios simpáticos pueden inducir taquicardia. Todas estas reacciones inflamatorias anormales pueden provocar un shock séptico y una falla orgánica múltiple (Vallamkondu et al., 2020).

Diagnóstico

Las pruebas disponibles actualmente se dividen en tres grupos importantes. El primero abarca los ensayos moleculares en donde se identifica el ARN de SARS-CoV-2 en muestras de pacientes, el segundo las pruebas rápidas de antígeno y el tercero los ensayos serológicos, los cuales detectan los anticuerpos del virus en los pacientes. Los ensayos moleculares incluyen la retrotranscripción acoplada a una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), la secuenciación de próxima generación (NGS), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) y desbloqueo de reportero enzimático específico de alta sensibilidad (SHERLOCK) (Hassanein et al., 2022).

El RT-qPCR es el estándar de oro para detectar el antígeno de SARS-CoV-2. Este se basa en la amplificación de los genes RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN), ORF1a/b, E, N y S según las directrices de la OMS. Estos genes se pueden utilizar en diferentes combinaciones, por ejemplo, una prueba que amplifique los genes E y RdRp. Esta prueba posee un buen rendimiento, alta sensibilidad y especificidad (Caruana et al., 2020). En esta prueba la OMS recomienda la amplificación de dos de los genes para evitar reacciones cruzadas con otro coronavirus y falsos negativos (Hassanein et al., 2022). Dentro de sus desventajas están los resultados falsos negativos debido a muestras tomadas después del día 8 de inicio de síntomas donde ha pasado el límite de detección del RT-qPCR, la sensibilidad puede depender también del tipo de muestra (Caruana et al., 2020), además esta prueba no establece si el virus presente en el paciente es viable (Savvides & Siegel, 2020).

EL RT-LAMP tiene la ventaja de una buena sensibilidad y especificidad, utiliza los genes ORF1ab, S y N, se utilizan reactivos de bajo costo y pueden

amplificar secuencias sin el paso de extracción de ARN, además de su rapidez (menos de una hora). En cuanto a las desventajas están que utiliza de cuatro a seis iniciadores (primers). Los ensayos de NGS permitieron identificar a inicios de la pandemia este nuevo coronavirus, sin embargo, los altos costos de los reactivos y equipos hacen limitado su uso como técnica diagnóstica de rutina (Hassanein et al., 2022). Se ha desarrollado un ensayo basado en CRISPR/Cas12 para detectar SARS-CoV-2 en muestras clínicas y se llamó SARS-CoV-2 DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter. También se reporta otro ensayo isotérmico basado en CRISPR/Cas13 (CRISPR-COVID), este se comparó con RT-qPCR y NGS dando una sensibilidad y especificidad del 100 % en comparación con los ensayos de referencia y en un menor tiempo (40 minutos) (Hou et al., 2020).

Otro enfoque alternativo es el basado en una combinación de amplificación isotérmica y detección mediada por CRISPR, como la técnica SHERLOCK. El SHERLOCK Testing in One Pot (STOPCovid) se ha desarrollado para detectar SARS-CoV-2 en los puntos de atención, ya que se obtienen resultados en una hora y la sensibilidad es comparable con el ensayo de RT-qPCR (Joung et al., 2020). Sin embargo, los oligonucleótidos necesarios no están disponibles comercialmente, además que la amplificación se realiza en varios pasos (Hassanein et al., 2022).

Las pruebas rápidas de antígeno se basan en la inmunocromatografía de flujo lateral, utilizando generalmente la proteína N y la proteína S. En cuanto a las desventajas la literatura señala que muestras con valores de umbral de ciclos (Ct) muy bajos (Ct 13) no son detectadas por estas pruebas de antígeno. Las ventajas de este tipo de prueba son la rentabilidad, no se requieren equipos especializados, además de que son pruebas rápidas ya que los resultados se pueden determinar visualmente en 30 minutos (Kivrane et al., 2022). Estas pruebas son ideales en programas de detección a gran escala y se desaconseja su uso para diagnóstico de personas enfermas. Utiliza principalmente muestras de hisopos nasales u orofaríngeos. Normalmente se requiere una prueba RT-qPCR para confirmar los resultados de esta prueba (Kahn et al., 2021).

Por otra parte, los ensayos de detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 se utilizan para detectar infecciones por COVID-19 midiendo la respuesta inmune del

huésped. El uso de estos ensayos tiene varias aplicaciones importantes como establecer prevalencias e incidencias en comunidades, también pueden ayudar a determinar la cantidad de anticuerpos presentes en el plasma convaleciente para utilizarlo en el tratamiento de personas hospitalizadas (Mathuria *et al.*, 2020), además pueden aportar información sobre poblaciones protegidas con la vacuna (Alharbi *et al.*, 2020). Todos los ensayos serológicos utilizan antígenos recombinantes, ya sea la proteína S, el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S, o la proteína N (Padoan *et al.*, 2020). Tanto la proteína S como la N son antígenos potenciales para el diagnóstico serológico de COVID-19 (Liu *et al.*, 2020). Dentro de los ensayos serológicos se pueden mencionar el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), casetes de flujo lateral o plataformas de quimioluminiscencia (Hassanein *et al.*, 2022).

Los ensayos que utilizan la proteína N como antígeno ayudan a diferenciar a los individuos infectados de los vacunados, ya que solo los infectados naturalmente producirán anticuerpos contra esta proteína. Es una proteína altamente inmunogénica y se expresa en grandes cantidades durante el proceso de infección (Liu *et al.*, 2020). Los ensayos que utilizan la proteína S como antígenos ayudan a establecer si los individuos tienen inmunidad protectora ya que los anticuerpos dirigidos contra esta proteína van a impedir una infección viral. Sin embargo, no es posible diferenciar entre individuos infectados y vacunados (Caruana *et al.*, 2020). Estudios han demostrado que los ensayos con anticuerpos contra la proteína N del SARS-CoV-2 son más sensibles que los que detectan anticuerpos contra la proteína S para detectar una infección temprana ya que se producen primero (Burbelo *et al.*, 2020). Así mismo se ha visto que los anticuerpos específicos de N son los que dominan en la respuesta de anticuerpos, con respuestas de células T de memoria específicas vistas hasta 17 años después de la infección con SARS-CoV (Wu *et al.*, 2021).

Los ensayos serológicos se consideran muy sensibles y confiables, además permiten cuantificar anticuerpos (Alharbi *et al.*, 2020), son fáciles y rápidos de realizar (dos horas), económicos y permiten analizar gran cantidad de muestras en muy poco tiempo (Xiao *et al.*, 2020). Una ventaja adicional de estas pruebas es que

se pueden determinar las clases de inmunoglobulinas presente en los sueros. En cuanto a las desventajas estas pruebas, no permiten detectar casos activos de SARS-CoV-2 (Mathuria et al., 2020). También presentan sensibilidad limitada en la etapa temprana de la infección debido a la escasez de anticuerpos (Xiao et al., 2020). Es de suma importancia contar con pruebas serológicas a gran escala en todos los países para obtener información epidemiológica relevante relacionada con los niveles y duración de anticuerpos postexposición, monitoreo de la inmunidad vacunal para determinar seroprevalencias e incidencias y finalmente calcular la proporción de infecciones asintomáticas en la población.

La dinámica de los anticuerpos es similar a otras infecciones, una muestra IgM positiva indica una infección reciente, ya que esta comienza a producirse alrededor del día 5 (Hassanein et al., 2022). Normalmente, los anticuerpos IgM suelen manifestarse aproximadamente de 1 a 2 semanas después de que una persona se infecte con el virus SARS-CoV-2. Por otro lado, los anticuerpos IgG tienden a aparecer más tarde que los IgM, por lo general, alrededor de la segunda o tercera semana después de la infección inicial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos tiempos pueden variar entre distintos individuos (Alharbi et al., 2020). En los pacientes con COVID-19 la respuesta IgG (H+L) inicia generalmente a partir del día 7 en adelante con un punto máximo alrededor del día 25. Sin embargo, algunos reportes mostraron seroconversión más temprana para IgG (H+L) contra la proteína N en algunos pacientes. Los casos graves presentaron una respuesta IgG contra la proteína N más alta que los casos leves (S. Liu & Lu, 2020). Además, se demostró que los casos graves inducen respuestas de anticuerpos tanto para la proteína N y S antes que los casos leves, lo que ha llevado a especular que los altos niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en casos graves podrían impulsar respuestas tempranas de anticuerpos causadas por la activación de células B durante la infección aguda (Yongchen et al., 2020).

Algunos inmunoensayos para SARS-CoV-2 que detectan anticuerpos tipo IgA muestran una mayor sensibilidad que inmunoensayos que detectan anticuerpos tipo IgG (H+L), Sin embargo, estos últimos suelen detectarse durante más tiempo, muestran mayor especificidad y son adecuados para realizar estudios de vigilancia

serológica (Beavis et al., 2020). Hay pocos reportes sobre los anticuerpos de las subclases de IgG (H+L) dirigidos contra SARS-CoV-2, sin embargo, algunos estudios como el de Patil y colaboradores (2021) han reportado al anticuerpo IgG1 como la subclase de IgG (H+L) predominante (detectado en 94/135 muestras, 70%), sugerente de una respuesta de linfocitos colaboradores (Th1) (inmunidad celular o retardada). Por otro lado, el anticuerpo IgG4, es el resultado de la respuesta de linfocitos colaboradores (Th2) (inmunidad humoral), se detectó en menor proporción en (4/135 muestras). Hubo una alta inducción de IgG1 en pacientes graves, así como también de IgA e IgG (H+L) sobre todo en las semanas dos y tres (Patil et al., 2021). Resultados similares fueron encontrados en otros estudios donde vieron que los anticuerpos IgG (H+L), IgG1 e IgG3 estaban significativamente elevados en pacientes con enfermedad grave en comparación con los pacientes moderados o leves, además, se detectaron pocos anticuerpos IgG4 reactivos con la proteína N (Benabdessalem et al., s/f). Esta evidencia sugiere que las subclases de IgG podrían utilizarse como un marcador de agravamiento de la enfermedad (Moura et al., 2021).

Tratamiento

El tratamiento es sintomático y la oxigenoterapia representa el primer paso para abordar la insuficiencia respiratoria (Wang et al., 2020). Recientemente se aprobó el molnupiravir por la Agencia Reguladora de Medicamentos de Reino Unido como el primer medicamento oral para tratar la COVID-19. Este medicamento actúa a nivel de la replicación del ARN viral provocando la acumulación de mutaciones deletéreas en el ARN viral nascente (Abdelnabi et al., 2021). REGN-COV2 es un nuevo cóctel de anticuerpos monoclonales (Mab) que se unen al RBD para evitar la entrada del virus en las células, indicando que podría ser efectivo en la disminución de la carga viral (Hassanein et al., 2022).

Los corticosteroides han mostrado algunos beneficios como la disminución de la inflamación pulmonar, disminución de la tormenta de citocinas, disminución de la mortalidad y la enfermedad grave en algunos pacientes, lo que ayuda a reducir la incidencia de una lesión pulmonar aguda. Sin embargo, el tratamiento con corticosteroides se asocia con un retraso en la eliminación del virus y una tasa

elevada de infección secundaria, por lo que se deben seguir algunas pautas para su administración. (Hassanein et al., 2022).

La terapia con plasma convaleciente (CP) se ha utilizado para tratar el COVID-19. Hasta la fecha se han aislado MAbs en pacientes infectados con SARS-CoV-2 en el período de recuperación, estos se unen al RBD de la proteína del SARS-CoV-2 de forma potente (Wang et al., 2020). Estudios han demostrado que la IgG (H+L) transferida a través del CP puede neutralizar citocinas como IL-1 β y TNF α , y regular positivamente los receptores FC γ RIIB, lo que demuestra que el CP puede inhibir la cascada inflamatoria, inhibir a los linfocitos y limitar el daño a los tejidos que se produce por una inflamación excesiva (Devarasetti et al., 2021). Se ha visto una disminución significativa de mortalidad luego de la terapia de CP comparado con personas que no recibieron terapia. Todos los síntomas en los pacientes estudiados, especialmente la fiebre, tos, dificultad para respirar y dolor torácico, desaparecieron o mejoraron uno a tres días post aplicación del CP y los exámenes de imagen mostraron absorción de las lesiones pulmonares en 7 días. Hay dos factores claves asociados a una terapia CP exitosa, el primero es el título de anticuerpos neutralizantes que debe de ser mayor a 1:80 (Duan et al., 2020) y segundo, el CP se debe administrar hasta los 14 días de inicio de síntomas (Cheng et al., 2005).

Prevención

La OMS y otras organizaciones han emitido una serie de lineamientos para el control y la prevención del SARS-CoV-2, estos son principalmente: lavado de manos, distanciamiento social y el uso de mascarillas (OMS, 2020). El programa de vacunación comenzó en diciembre 2020 y actualmente la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha autorizado solo tres vacunas para uso de emergencia para prevenir COVID-19, están son: Comirnaty (Pfizer-BioNTech), Spikevax (Moderna), ad26.cov2.s (Janssen) (Administración de Alimentos y Medicamentos [FDA], s.d.). Sin embargo, la OMS ha incluido otras vacunas en su lista de uso de emergencia, como: Vaxzevria (AztraZeneca), Covilo (Sinopharm), Covaxin (Bharat Biotech), Coronavac (Sinovac), Nuvaxovid (Novavax) y la Covovax (Serum Institute of India). Todas estas han sido desarrolladas

utilizando diferentes técnicas como: vacunas de virus inactivados, vacunas de vectores virales y vacunas basadas en proteínas (WHO, s.d.).

Referencias Bibliográficas

- Abdelnabi, R., Foo, C. S., De Jonghe, S., Maes, P., Weynand, B., & Neyts, J. (2021). Molnupiravir Inhibits Replication of the Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern in a Hamster Infection Model. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(5), 749–753. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIAB361>
- Administración de Alimentos y Medicamentos (s.d.) COVID-19 Vaccines. Retrieved May 3, 2022, from <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-vaccines#authorized-vaccines>
- Alharbi, S. A., Almutairi, A. Z., Jan, A. A., & Alkhalify, A. M. (2020). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) IgM/IgA and IgG Antibodies Among Healthcare Workers. *Cureus*, 12(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.10285>
- Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., & Li, J. (2021). The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/V13061115>
- Benabdessalem, C., Marzouki, S., Hamouda, W. Ben, Trabelsi, K., Boumaiza, M., Hamouda, S. Ben, Ouni, R., Bchiri, S., Chaaban, A., Gdoura, M., Gorgi, Y., Sfar, I., Yalaoui, S., Khelil, J. Ben, Hamzaoui, A., Abdallah, M., Cherif, Y., Petres, S., Ka, C., ... Ahmed, M. Ben. (n.d.). *COVID-19 in Tunisia (North Africa): IgG and IgG subclass antibody responses to SARS-CoV-2 according to disease severity*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.01.22271696>
- Caruana, G., Croxatto, A., Coste, A. T., Opota, O., Lamoth, F., Jatou, K., & Greub, G. (2020). Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 26, Issue 9, pp. 1178–1182). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.019>

- Casella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S., Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). StatPearls: Treasure Island (FL)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020) Interim Clinical Guidance for Management of Patients with Confirmed Coronavirus Disease (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 371, m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
- Chakraborty, S., Gonzalez, J., Edwards, K., Mallajosyula, V., Buzzanco, A. S., Sherwood, R., Buffone, C., Kathale, N., Providenza, S., Xie, M. M., Andrews, J. R., Blish, C. A., Singh, U., Dugan, H., Wilson, P. C., Pham, T. D., Boyd, S. D., Nadeau, K. C., Pinsky, B. A., ... Wang, T. T. (2020). Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nature Immunology* 2020 22:1, 22(1), 67–73. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00828-7>
- Cosar, B., Karagulleoglu, Z. Y., Unal, S., Ince, A. T., Uncuoglu, D. B., Tuncer, G., Kilinc, B. R., Ozkan, Y. E., Ozkoc, H. C., Demir, I. N., Eker, A., Karagoz, F., Simsek, S. Y., Yasar, B., Pala, M., Demir, A., Atak, I. N., Mendi, A. H., Bengi, V. U., ... Demir-Dora, D. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 63, 10. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2021.06.001>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1–23. https://doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Ferasin, L., Fritz, M., Ferasin, H., Becquart, P., Legros, V., & Leroy, E. M. (2021). Myocarditis in naturally infected pets with the British variant of COVID-19. *BioRxiv*, 2021.03.18.435945. <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.435945>
- Hassanein, S. S., Sharaby, M. R., Tawfik, N. M., Rashed, S. A., Adel, M., Fayez, A., Mansour, H., & Amer, H. M. (2022). Latest Insights on the Diagnostic

- Approaches and Treatment Strategies of COVID-19. *Intervirology*, 1–14. <https://doi.org/10.1159/000522336>
- He, X., Lau, E. H. Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., ... Leung, G. M. (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*, 26(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Hosie, M. J., Epifano, I., Herder, V., Orton, R. J., Stevenson, A., Johnson, N., MacDonald, E., Dunbar, D., McDonald, M., Howie, F., Tennant, B., Herrity, D., Da Silva Filipe, A., Streicker, D. G., Willett, B. J., Murcia, P. R., Jarrett, R. F., Robertson, D. L., & Weir, W. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *The Veterinary Record*, 188(8), no. <https://doi.org/10.1002/VETR.247>
- Hou, T., Zeng, W., Yang, M., Chen, W., Ren, L., Ai, J., Wu, J., Liao, Y., Gou, X., Li, Y., Wang, X., Su, H., Gu, B., Wang, J., & Xu, T. (2020). Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *PLoS Pathogens*, 16(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008705>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. [https://doi:10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi:10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
- Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Segel, M., Bruneau, R., Huang, M. W., Kim, N.-G., Yu, X., Li, J., Walker, B. D., Greninger, A. L., Jerome, K. R., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2020). Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *MedRxiv*, 10. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>
- Junejo, Y., Ozaslan, M., Safdar, M., Khailany, R. A., Rehman, S. U., Yousaf, W., & Khan, M. A. (2020). Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. *Gene Reports*, 20, 100752. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752>
- Kahn, M., Schuierer, L., Bartenschlager, C., Zellmer, S., Frey, R., Freitag, M., Dhillon, C., Heier, M., Ebigbo, A., Denzel, C., Temizel, S., Messmann, H.,

- Wehler, M., Hoffmann, R., Kling, E., & Römmele, C. (2021). Performance of antigen testing for diagnosis of COVID-19: a direct comparison of a lateral flow device to nucleic acid amplification based tests. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-021-06524-7>
- Kivrane, A., Igunnova, V., Liepina, E. E., Skrastina, D., Leoncijs, A., Rudevica, Z., Kistkins, S., Reinis, A., Zilde, A., Kazaks, A., & Ranka, R. (2022). Development of rapid antigen test prototype for detection of SARS-CoV-2 in saliva samples. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 127, 8207. <https://doi.org/10.48101/UJMS.V127.8207>
- Kotlyar, A. M., Grechukhina, O., Chen, A., Popkhadze, S., Grimshaw, A., Tal, O., Taylor, H. S., & Tal, R. (2021). Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 224(1), 35-53.e3. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2020.07.049>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (n.d.). *SARS-CoV-2 pathogenesis*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., Wang, Q., Tan, L., Wu, W., Tang, S., Xiong, Z., & Zheng, S. (2020). Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6). <https://doi.org/10.1128/JCM.00461-20>
- Mathuria, J. P., Yadav, R., & Rajkumar. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>
- Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I. A. T. M., Goonawardane, N., Saito, A., Kimura, I., Yamasoba, D., Gerber, P. P., Fatihi, S., Rathore, S., Zepeda, S. K., Papa, G., Kemp, S. A., Ikeda, T., Toyoda, M., Tan, T. S., Kuramochi, J., Mitsunaga, S., Ueno, T., ... Gupta, R. K. (2022). Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature* 2022 603:7902 (7902), 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>

- Moura, A. D., da Costa, H. H. M., Correa, V. A., Ana, A. K., Lindoso, J. A. L., De Gaspari, E., Hong, M. A., Cunha-Junior, J. P., & Prudencio, C. R. (2021). Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95045-z>
- National Institutes of Health (n.d.). Clinical Spectrum | COVID-19 Treatment Guidelines. (n.d.). Retrieved May 2, 2022, from <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., ... Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi:10.1038/s41467-020-15562-9>
- Padoan, A., Bonfante, F., Sciacovelli, L., Cosma, C., Basso, D., & Plebani, M. (2020). Evaluation of an ELISA for SARS-CoV-2 antibody testing: Clinical performances and correlation with plaque reduction neutralization titer. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Vol. 1 (Issue ahead-of-print)*. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1096>
- Pan American Health Organization. (n.d.). PAHO Weekly COVID-19 Epidemiological - 26 April 2022 Update. Retrieved April 27, 2022, from <https://www.paho.org/en/documents/paho-weekly-covid-19-epidemiological-update-26-april-2022>
- Park S. E. (2020). Epidemiology, Virology, and Clinical Features of Severe Acute Respiratory Syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr*. 63(4):119-124. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>
- Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, 9(5), 1267. <https://doi:10.3390/cells9051267>
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., Yu, V. Y. T., Sims, L. D., Tsang, D. N. C., Chu, D. K. W., Perera, R. A. P. M.,

- Poon, L. L. M., & Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776–778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>
- Slifka, M. K., & Gao, L. (2020). Is presymptomatic spread a major contributor to COVID-19 transmission? In *Nature Medicine* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1531–1533). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1046-6>
- Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., Phalke, S., & Velu, G. S. K. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.815389/FULL>
- Trypsteen, W., Van Cleemput, J., van Snippenberg, W., Gerlo, S., & Vandekerckhove, L. (2020). On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLoS Pathogens*, 16(10), e1009037. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009037>
- Vallamkondu, J., John, A., Wani, W. Y., Ramadevi, S. P., Jella, K. K., Reddy, P. H., & Kandimalla, R. (2020). SARS-CoV-2 pathophysiology and assessment of coronaviruses in CNS diseases with a focus on therapeutic targets. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 10, p. 165889). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165889>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10, p. 724). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. (n.d.). Retrieved May 2, 2022, from <https://covid19.who.int/>
- Wu, C., Qavi, A. J., Hachim, A., Kavian, N., Cole, A. R., Moyle, A. B., Wagner, N. D., Sweeney-Gibbons, J., Rohrs, H. W., Gross, M. L., Peiris, J. S. M., Basler, C. F., Farnsworth, C. W., Valkenburg, S. A., Amarasinghe, G. K., & Leung, D. W. (2021). Characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein reveals multiple functional consequences of the C-terminal domain. *IScience*, 24(6), 102681. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102681>

- Xiao, S., Wu, Y., & Liu, H. (2020). Evolving status of the 2019 novel coronavirus Infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring [Commentary/Review]. *Journal of Medical Virology*. <https://doi:10.1002/jmv.25702>
- Zheng J. (2020). SARS-CoV-2: An Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int J Biol Sci.*; 16(10): 1678–1685. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45053>

ARTÍCULO 1

Desarrollo de un inmunoensayo para el diagnóstico de anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2 en humanos

Resumen

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es la causa de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), una enfermedad altamente contagiosa que afecta principalmente al sistema respiratorio. El objetivo del presente estudio fue producir la proteína de la nucleocápside (proteína N) recombinante de SARS-CoV-2 para ser utilizada en un inmunoensayo (ELISA) para evaluar los niveles séricos de anticuerpos de tipo IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra la proteína N en tres grupos de pacientes con diferentes días de evolución de la enfermedad (Grupo 1: ≤ 15 días, grupo 2: 16-25 días y grupo 3: > 25 días). La secuencia de codificación de esta proteína se optimizó para la expresión en *E. coli* y se subclonó en el plásmido pET24a(+), lo que dio como resultado una proteína etiquetada con 6xHis de 46 kDa. La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados y se evaluó en inmunoblot y ELISA. Un total de 200 sueros pre pandémicos y 204 sueros de pacientes con SARS-CoV-2 (confirmados por técnica molecular), se utilizaron para establecer el punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ensayo. Las sensibilidades de los ELISA IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 fueron 81,4%, 83,3%, 81,9% y 84,8%, mientras que las especificidades fueron 90,1%, 77,6%, 88,1% y 85,6%, respectivamente. La razón de verosimilitud de la prueba positiva fue de 8,2, 3,7, 6,8, 5,8, para IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 respectivamente. Se determinó mayor sensibilidad de los inmunoensayos en el grupo 1, excepto para IgM. Se determinó un aumento significativo de la mediana de las unidades ELISA (UE) para los ELISA IgG (H+L), IgA e IgG1 en el grupo 1, mientras que para IgM se determinó un aumento de estos valores en el grupo 2. Anticuerpos de tipo IgG4 se detectó solamente en 12/204 muestras. No se logró estandarizar los ELISA para IgG2 e IgG3. Los inmunoensayos desarrollados en el presente estudio son adecuados para la detección de anticuerpos contra la proteína N del SARS-CoV-2

y podrían usarse para monitorear la respuesta inmune, determinar la infecciones naturales e infecciones asintomáticas.

Palabras clave: Proteína de nucleocápside, ELISA, anticuerpos, IgG(H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 sensibilidad, especificidad, SARS-CoV-2

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the cause of coronavirus disease 2019 (COVID-19), a highly contagious disease that primarily affects the respiratory system. The objective of the present study was to produce the recombinant nucleocapsid protein (N protein) of SARS-CoV-2 to be used in an immunoassay (ELISA) to evaluate the serum levels of IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies against N protein in three groups of patients with different days of disease evolution (Group 1: ≤ 15 days, Group 2: 16-25 days and group 3: > 25 days). The coding sequence of this protein was optimized for expression in *E. coli* and was subcloned into the pET24a(+) plasmid, resulting in a 46 kDa 6xHis-tagged protein. Purification of the recombinant protein was performed by immobilized metal affinity chromatography and evaluated in immunoblot and ELISA. A total of 200 pre-pandemic sera and 204 sera from SARS-CoV-2 patients (confirmed by molecular techniques), were used to establish the cut-off, sensitivity, and specificity of the assays. The sensitivities of the ELISA for IgG (H+L), IgM, IgA and IgG1 were 81,4%, 83,3%, 81,9% and 84,8%, and the specificities were 90,1%, 77,6%, 88,1% and 85,6%, respectively. The likelihood ratio of the positive test was 8.2, 3.7, 6.8, 5.8, for IgG (H+L), IgM, IgA and IgG1 respectively. Higher sensitivities of the standardized immunoassays were determined in group 1, except for IgM. A significant increase in the mean of the ELISA units (EU) was determined for IgG (H+L, IgA, and IgG1 in Group 1, while for IgM an increase in these values was determined in Group 1. IgG4 type antibodies were detected only in 12/204 samples. ELISA for IgG2 and IgG3 could not be standardized. The immunoassays developed in the present study are suitable for the detection of antibodies against the N protein of SARS-CoV-2 and could be used to monitor the immune response and determine natural and asymptomatic infections.

Keywords: Nucleocapsid protein, ELISA, antibodies, IgG(H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sensitivity, specificity, SARS-CoV-2.

1. Introducción

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es el causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (Cascella et al., 2022). En diciembre del 2019 se registró el primer caso de esta enfermedad altamente contagiosa en Wuhan provincia de Hubei en China, de lo que se originó una pandemia sin precedentes declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020 (Thakur et al., 2022).

El COVID-19 afecta el sistema respiratorio, específicamente el parénquima pulmonar y la transmisión ocurre por gotitas expulsadas por la persona infectada cuando ésta tose o estornuda en la fase presintomática o sintomática. Otras posibles vías de transmisión incluyen la ruta fecal-oral y la vertical de madre a hijo, aunque la tasa de infección se considera muy baja. Las presentaciones clínicas de la enfermedad pueden variar desde infecciones asintomáticas hasta afectación de varios órganos y la muerte. En muchos casos ocurren manifestaciones extrapulmonares, esto debido a la presencia de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en múltiples órganos. Dicha enzima es el receptor utilizado por el virus para entrar a las células (Mehta et al., 2021).

Las pruebas que detectan la presencia de ácidos nucleicos del virus son las indicadas para el diagnóstico de infecciones agudas de SARS-CoV-2, mientras que las pruebas serológicas miden la respuesta inmune de las personas al agente ya sea de forma cualitativa o cuantitativa (Amanat et al., 2020). EL SARS-CoV-2 posee cuatro proteínas estructurales que se denominan espiga o spike (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N). La función principal de la proteína N de la nucleocápside es proteger el genoma viral (Romano et al., 2020), así mismo participa en la transcripción y traducción del ARN, así como en el ensamblaje del virus. La proteína N tiene 422 aminoácidos y, según análisis bioinformáticos, se divide en tres dominios: dos dominios estructurales independientes, el N-terminal y el C-terminal, que están separados por la región central desordenada (Ranjbar et

al., 2022). La proteína N contiene epítomos bastante eficientes para activar las células B y T del sistema inmunitario, por lo cual es adecuada para el reconocimiento inmunológico en el serodiagnóstico (Chura-Chambi et al., 2022), así como también para la detección temprana de COVID-19 debido a su alta inmunogenicidad (Ranjbar et al., 2022).

Se han desarrollado muchos ensayos comerciales basados en la proteína N y proteína S del virus (Ranjbar et al., 2022). Las técnicas que detectan anticuerpos contra la proteína N del SARS-CoV-2 parecen ser más sensibles para detectar una infección temprana que los ensayos que detectan anticuerpos contra la proteína S, ya que los anticuerpos contra N se producen primero (Burbelo et al., 2020). Seis meses después de la infección los anticuerpos IgG (H+L) anti-N disminuyen, pero se ha visto que el suero mantiene su eficacia antiviral. Así mismo los niveles de IgG anti-N se correlacionan con la capacidad neutralizante de los pacientes. Por lo tanto, las pruebas de IgG (H+L) anti-N pueden estimar la capacidad protectora de los anticuerpos. La dinámica de la aparición de anticuerpos es similar a otras infecciones y ocurre de la siguiente manera: la IgM generalmente aparece entre los días 8 y 12 después de la infección y decrece en la semana 12, mientras que los niveles de IgG (H+L) comienzan a aumentar alrededor del día 14 y permanecen durante más tiempo. IgA tiene un efecto protector sobre las superficies mucosas, incluida la cavidad orofaríngea, que es el sitio de entrada del virus, por lo que la producción efectiva de IgA puede ser un factor clave para una respuesta efectiva y preventiva contra SARS-CoV-2 (Szymczak et al., 2021). Por otra parte, la IgG4 se ha estudiado muy poco, los pocos estudios señalan que está asociada a un peor pronóstico de la enfermedad debido a que los pacientes con respuestas inmunitarias IgG4 prominentes parecen ser más permisivos a la infección por SARS-CoV-2, así como a otras patologías de tipo oportunistas, en las que se ha observado un predominio de IgG4 (Della-Torre et al., 2021). En COVID -19 como en otras infecciones virales las subclases IgG1 e IgG3 son las predominantes según la literatura y es proporcional a la actividad antiviral (Benabdessalem et al., 2022), mientras la IgG2 e IgG4 poco se encuentran en pacientes con COVID-19. La IgG2

es el principal anticuerpo producido en infecciones bacterianas, mientras que IgG1 e IgG3 normalmente son producidos en infecciones virales (Luo et al., 2021a).

Un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) que utilizó como antígeno recombinante la proteína N mostró una sensibilidad del 80,4% para la detección de anticuerpos IgM e IgG (H+L), además reportaron un aumento de las tasas positivas conforme aumentaban los días de inicio de síntomas (d.i.s.). Solamente la sensibilidad de IgM disminuyó después de 35 d.i.s. (Liu et al., 2020). Otros estudios han reportado una sensibilidad del ensayo ELISA con la proteína N recombinante de 91,0% y 92,5% y una especificidad de 98,2% y 97,3 %, para IgG (H+L) e IgM respectivamente (Ranjbar et al., 2022).

El presente estudio tuvo como objetivo producir un antígeno recombinante de la proteína N de SARS-CoV-2 y estandarizar técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar anticuerpos tipos IgM, IgG (H+L), IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en sueros humanos.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio experimental para estandarizar una prueba diagnóstica serológica para la detección de anticuerpos de diferentes clases y subclases contra la proteína N de SARS-CoV-2 en pacientes humanos.

2.2. Consideraciones bioéticas

Esta investigación se realizó con aval del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social, mediante el protocolo HSJD-15-2021. La investigación se condujo respetando lo contenido en la declaración de Helsinki y el informe Belmont, así como con estricto apego a la ley 9234 de la República de Costa Rica.

2.3. Sueros humanos

Para establecer la sensibilidad y especificidad de los diferentes inmunoensayos (IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) se utilizaron un grupo compuesto de tres sueros SARS-CoV-2 PCR positivos y un grupo compuesto de tres sueros negativos prepandémicos, 200 sueros humanos prepandémicos y

204 sueros humanos SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos. Todos los sueros provenían de las serotecas institucionales resguardadas en el Hospital San Juan de Dios de la Caja Costarricense del Seguro Social. Las muestras fueron debidamente codificadas y anonimizadas para resguardar el derecho a la confidencialidad y privacidad de los participantes.

2.4. Obtención de la proteína N recombinante de SARS-CoV-2

2.4.1. Expresión de la proteína N en *E. coli*

La secuencia del gen que codifica para la proteína N del SARS-CoV-2 se obtuvo del genoma completo del SARS-CoV-2 aislamiento Wuhan-Hu-1 disponible en la base de datos NCBI (NC 045512.2). Esta proteína contiene 419 residuos de aminoácidos y un peso de 46,6 kDa. La expresión de la proteína recombinante de SARS-CoV-2 se realizó en células de *E. coli* BL21 Star (DE3), siguiendo la metodología descrita por Alvarado-Mesén et al., (2019). La secuencia codificante para esta proteína se optimizó para su expresión en *E. coli* y fue subclonada en el vector de expresión pET24a(+) utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI (GenScript Inc.), permitiendo la expresión de una proteína N etiquetada en su extremo C-terminal con 6 histidinas (6xHis) y con un total de 427 aminoácidos (**Anexo 1**).

El plásmido de expresión pET24a(+)-SARS-CoV-2-N-Cterminal-His fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 Star (DE3). El tratamiento con cloruro de calcio y cloruro de magnesio de las células bacterianas produjo células competentes que adquirieron el ADN después de un choque térmico por 45 segundos a 42 °C, siguiendo protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). Las células transformadas se seleccionaron en medio de cultivo LB (Bertani, 1951) suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y las colonias resistentes se utilizaron para iniciar cultivos líquidos. La inducción de la expresión de la proteína se realizó con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración 1 mM, una vez alcanzada la densidad óptica de 0,5 en 200 ml de cultivo. Luego se incubó por 3 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm, según el protocolo del fabricante pET System Manual (Novagen, 2005).

2.4.2. Extracción y purificación de la proteína N

La extracción de la proteína recombinante se realizó con el detergente B-PER Complete utilizando 5 ml/g de biomasa fresca (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific), suplementado con un inhibidor de proteasas y fosfatasa libres de EDTA (Halt Protease and phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) utilizando 10 µl del inhibidor por cada ml de B-PER Complete. Las proteínas acumuladas en cuerpos de inclusión se solubilizaron utilizando varios tampones que contenían urea como desnaturalizante. Se utilizó 1ml del tampón 1 (urea 2 M, tris base 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM y Triton X-100 1%), seguido de una agitación, hasta deshacer el botón (pellet), y una centrifugación a 16,000 g por 20 minutos a 10°C. Se colectó y guardó el sobrenadante para análisis en SDS-PAGE. Se realizó el mismo paso anterior utilizando el tampón 2 (urea 2 M, tris base 100 mM) y guardando el sobrenadante de la misma manera que arriba. Para el tampón 3 (urea 8 M y tris base 100 mM) se realizó una incubación de 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Seguido se realizó una centrifugación a 16,000 g por 20 minutos y se guardó el sobrenadante con las proteínas solubilizadas para su evaluación en SDS-PAGE y también para la purificación.

La proteína recombinante marcada con etiqueta de poli-histidina fue purificada mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) utilizando el ensayo HisPUR Ni-NTA Purification (Thermo Scientific) y siguiendo las especificaciones del fabricante con el fin de alcanzar una pureza superior al 80%. La remoción de urea 8 M y del imidazol 250 mM se hizo mediante diálisis con una membrana de celulosa de un corte de peso molecular (MWCO) de 14,000 (Sigma Aldrich) y empleando para esto el tampón Tris-HCl (10 mM) con EDTA (1 mM) a pH 8. Se tomaron las primeras seis eluciones y se diluyeron 1:2 en tampón de elución para realizar la diálisis. La eliminación de la urea y el imidazol se hizo debido a que los mismos pueden interferir el proceso de interacción antígeno-anticuerpo (Bata et al., 1964).

2.4.3. Análisis cualitativo y cuantitativo del antígeno recombinante purificado

El análisis cualitativo de las eluciones de la proteína N purificada con la columna Ni-NTA se realizó mediante SDS-PAGE, con la finalidad de determinar la

homogeneidad de las fracciones eluidas de la columna. La SDS-PAGE se realizó utilizando el agente reductor ditioneitol (DDT) a una concentración final de 0.1 M, y el tampón de carga Laemmli concentración final 1X (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 85 °C durante 2 minutos, y posteriormente se realizó la electroforesis en minigeles tris-glicina 4-20 % a 225V por 40 minutos, según el protocolo del fabricante (Novex WedgeWell Tris-glycine Gels, Thermo Scientific). Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained (10-250 kDa) (Thermo Scientific). Las bandas proteicas se visualizaron mediante tinción con el reactivo Imperial Protein Stain (Thermo Scientific), basado en coomassie R-250.

Además, se realizó un análisis cuantitativo de las proteínas purificadas utilizando el Qubit Protein Assay Kit en el fluorómetro Qubit™ 4 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones de fabricante. Las eluciones fueron cuantificadas antes y después del proceso de diálisis.

2.4.4. Inmunoblot con anticuerpo anti-His

Se realizó el SDS-PAGE descrito arriba (2.4.3), y posteriormente el gel se lavó con agua destilada y se incubó por 10 minutos en etanol 20 % con el fin de mejorar la eficiencia de la electro-transferencia. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (iBlot 2 Transfer Stacks, Thermo Scientific) mediante una electrotransferencia en seco utilizando el equipo iBlot 2 (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante, con una duración de 6 minutos a 23V (1.4 A) para proteínas de peso molecular de 46 kDa.

La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (I-Block 0,4%, PBS 1X, Tween-20 0,05%) 3 veces por 20 minutos cada vez, en agitación en dos dimensiones. Después, se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti-His 6x-His Epitope Tag Antibody (4E3D10H2/E3) (Thermo Scientific # MA1-135) a una concentración final de 100 ng/ml diluido en solución de bloqueo (1:10,000) por 16 horas en agitación. Seguido se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante 3 lavados de 20 minutos con solución de bloqueo y se incubó por 3 horas, en agitación, con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado a fosfatasa alcalina (Fc Cross Adsorbed Secondary Antibody, AP conjugate, Thermo Scientific # 31327) a una concentración final de 0,12 µg/ml diluido (1:5000) en

solución de bloqueo. Después, se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con solución de lavado (solución salina tamponada con Tris (TBS) 1X y Tween-20 0,05%). Seguidamente se agregaron 5 ml del sustrato cromogénico BCIP/NBT (Novex, Invitrogen) durante 5 minutos aproximadamente. La inmunoreactividad, se observó mediante la aparición de una banda de 46 kDa, y la reacción se detuvo con agua destilada.

2.4.5. Inmunoblot con sueros SARS-CoV-2 positivos y negativos

Para la evaluación de la proteína N con sueros humanos se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección anterior (2.4.4) con las siguientes modificaciones. Las membranas de PVDF se tiñeron de forma reversible con Ponceau S (Sigma) y se destiñeron con agua destilada con la finalidad de evaluar la eficiencia de la electrotransferencia y se bloquearon con solución de bloqueo (I-Block 0,4%, PBS 1X, Tween-20 0,05%) durante una hora. Seguido las membranas se cortaron en tiras de aproximadamente 5 mm de ancho y se incubaron toda la noche con sueros controles positivos y negativos (diluidos 1:50 en solución de bloqueo PBS pH 7,4 + Tween-20 0,05% y leche descremada 0,4 %). Luego de la incubación con los sueros se procedió a lavar tres veces con solución de bloqueo y se incubó con el conjugado (cabra anti-humano IgG (H+L) conjugado a peroxidasa (POD)) (Sigma Aldrich, # A8667-2ML), a concentración final de 2 ng/ml (1:10000) en solución de bloqueo, y como sustrato se utilizó 3,3' diaminobencidina (DAB) (Sigma Aldrich). Al final del ensayo se realizaron tres lavados con agua destilada y se secaron las tiras. Los sueros que mostraron bandas de aproximadamente 46 kDa se consideraron positivos.

2.5. Implementación de la técnica serológica

Para la implementación del inmunoensayo se utilizaron microplacas de polivinilo no flexibles de alta fijación (Corning 2592), las cuales se sensibilizaron con la proteína N recombinante a diferentes concentraciones (desde 1 µg hasta 0,03 µg por pocillo) y con dos tampones de adsorción (solución de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 y PBS pH 7,4), y se incubaron por 16 horas a 4 °C. Después de la adsorción del antígeno se descartó el excedente y se bloqueó con dos agentes bloqueadores (caseína 10 % y leche descremada 10 %) durante tres horas a 37 °C.

Posteriormente se lavó la placa tres veces con PBS-Tween-20 0,05 % para eliminar la solución de bloqueo. Seguidamente se incubó durante una hora a 37 °C con el grupo compuesto de sueros positivos y el grupo compuesto de sueros negativos (sección 2.3), se probaron diferentes concentraciones de los sueros (1:50, 1:100, 1:200, 1:400), los cuales se diluyeron en solución de incubación (PBS-Tween-20 0,05 % y leche descremada 0,4 %). Luego de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween-20 (0,05 %).

Se utilizaron los conjugados anti-IgG (H+L) HRP (policlonal, producido en cabra, Sigma Aldrich, #A8667), anti-IgM-HRP (policlonal, producido en cabra, Invitrogen, #SA5-10293), anti-IgA-HRP (policlonal, producido en cabra, Invitrogen, #A18781), anti-IgG1-HRP (monoclonal, Invitrogen, #A10648) y anti-IgG4-HRP (monoclonal, Invitrogen, #A10654), anti-IgG2-HRP (monoclonal, Invitrogen, #05-0520) y anti-IgG3-HRP (monoclonal, Invitrogen, #05-3620). Estos conjugados se utilizaron en diferentes concentraciones (1:500 hasta 1:160,000) diluidos en solución de incubación, y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 y se reveló con el cromógeno 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma Aldrich), preparado en 10 ml de Tris 0.01 M pH 7,2 y 200 µl de H₂O₂ al 3% por aproximadamente diez minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ (2 M).

La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm en un lector de placas (Multiskan Ex, Thermo Scientific). Una vez obtenida la densidad óptica, el resultado se expresó como el promedio de la absorbancia de los sueros duplicados por 1000, lo que se denominó unidades ELISA (UE). Se estableció el cociente P/N dividiendo UE del suero control positivo (P) entre UE del suero control negativo (N).

2.6. Análisis estadístico

Los puntos de corte para los diferentes inmunoensayos (ver 2.5) se determinaron de las siguientes dos maneras: a) mediante el análisis de la curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) con su respectiva área bajo la curva (AUC, *area under curve*), y b) mediante la suma de la media de los 200 sueros negativos y 3, 2.58 o 2 desviaciones estándares. Además, se estableció los puntos de corte para cada ELISA analizando los sueros en tres diferentes grupos: ≤15 días,

16-25 días y >25 días de evolución de la enfermedad y se calculó la razón de verosimilitud de una prueba (RVP) positiva y negativa. Se utilizó la prueba de Shapiro- Wilk para evaluar si los datos seguían una distribución normal y pruebas no paramétricas como U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre las medianas de los valores de UE entre los positivos y los controles negativos. Así como también se compararon las tasas positivas para medir la frecuencia de casos positivos a medida que aumentaban los días de evolución (≤ 15 días, 16-25 días y >25 días). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa libre EpiTools (Ausvet) y el programa GraphPad Prism versión 9.4.0.

3. Resultados

El rendimiento de la producción de la proteína N fue de 11.8 mg/200 ml de cultivo inicial y luego de la remoción de las sales por diálisis se obtuvo un volumen de 24 ml con una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ de proteína purificada. No se observó la presencia de una gran concentración de proteína N en la fracción soluble (S) (Figura 1), ya que la mayor parte de la proteína diana estaba en cuerpos de inclusión (C.I.), Sin embargo, en el lavado del pellet (L) sí se observó pérdida de gran cantidad de proteína recombinante (Figura 1). En este lavado se utilizó urea 2 M, así mismo se observó una leve pérdida de proteína en el lavado con la columna de purificación His (LH), más no en el filtrado de la columna HisPur (F). Los C.I. se solubilizaron utilizando urea 8 M.

En las eluciones (E1-E-5) se encontró la proteína N indicando una purificación eficiente (Figura 1).

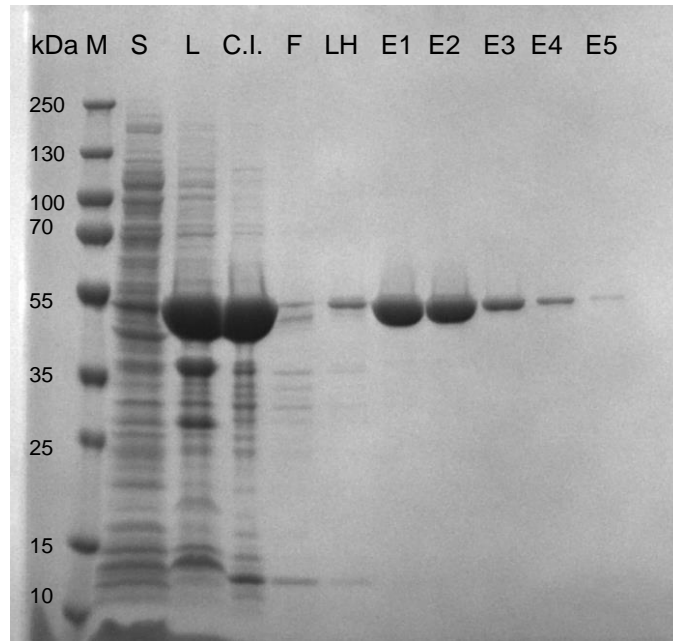


Figura 1. Análisis de la eficiencia de la purificación de la proteína N recombinante de SARS-CoV-2 mediante SDS-PAGE. M: Marcador de peso molecular; S: Fracción soluble del sobrenadante obtenida de la lisis con el B-PER Complete; L: lavado después del B-PER complete; C.I.: Cuerpos de inclusión; F: filtrado post- incubación de la columna de purificación HisPur con la proteína, LH: proteínas presentes en el lavado de la columna HisPur; E1-E5: proteína presente en las eluciones 1-5.

De la purificación de proteínas solubilizadas con la columna HisPur se obtuvieron siete fracciones de 2 ml cada una, a partir de 200 ml de cultivo. Las concentraciones de la proteína antes de la diálisis se muestran en el Cuadro 1. Después de la diálisis las fracciones se unieron y se volvió a cuantificar quedando una sola fracción con una concentración de 400 µg/ml.

Cuadro 1. Concentración de proteína en las eluciones obtenidas a partir de 200 ml de cultivo inicial.

Eluciones de la proteína N	Concentración (µg/ml)
E1	1343
E2	1400

E3	1100
E4	708
E5	676
E6	500
E7	183

El Western Blot mostró reacción con el anticuerpo anti-His, lo que identificó la presencia de la proteína N marcada con la etiqueta de poli-histidina. Se observó una banda de aproximadamente 46 kDa (Figura 2).

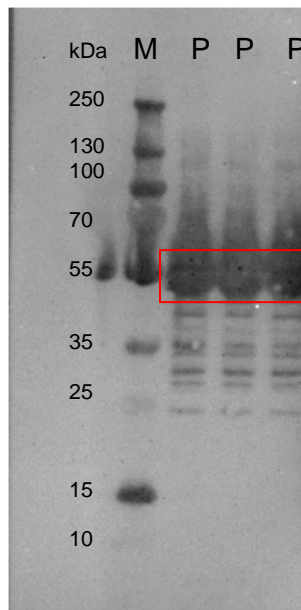


Figura 2. Análisis de Western Blot para confirmar la identidad de la proteína N. El rectángulo rojo identifica la señal de una proteína con un peso de 46kDa. M: marcador de peso molecular; P: proteína N (por triplicado).

En el inmunoblot los sueros controles SARS-CoV-2 positivos reaccionaron con una banda de 46 kDa, mientras que los sueros controles negativos no reaccionaron con la proteína (Figura 3).

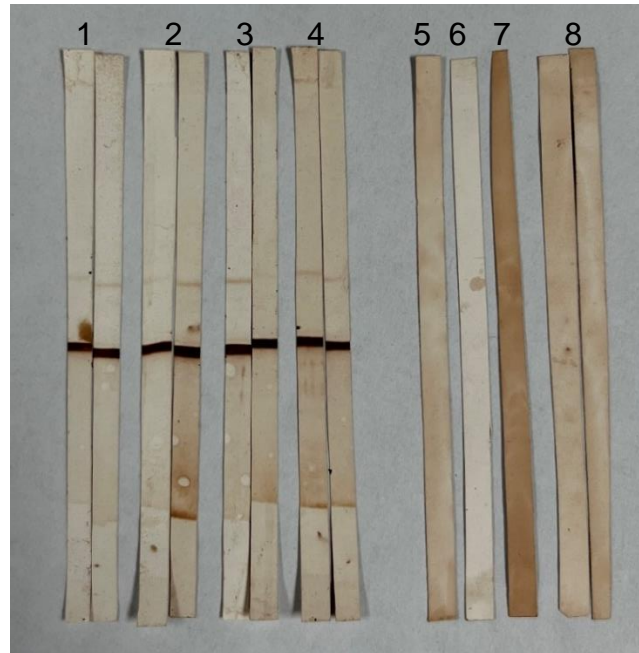


Figura 3. Inmunoblot de la proteína recombinante N con sueros controles positivos y negativos. 1-3: Sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos (por duplicado), 4: muestra compuesta de tres sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos. 5-7 sueros negativos (prepandémicos), 8: muestra compuesta de tres sueros negativos (prepandémicos, por duplicado).

El análisis de las diferentes concentraciones de la proteína N en dos tampones de adsorción (PBS y carbonato-bicarbonato), y dos soluciones bloqueadoras (leche descremada y caseína hidrolizada) se muestra en las Figuras 4A y 4B respectivamente. Las concentraciones de 1 μg hasta 0,12 μg de antígeno por pocillo mostraron en su mayoría las mayores diferencias P/N. La concentración de proteína que presentó mayor diferencia P/N fue 1 μg de antígeno por pocillo (Figura 4).

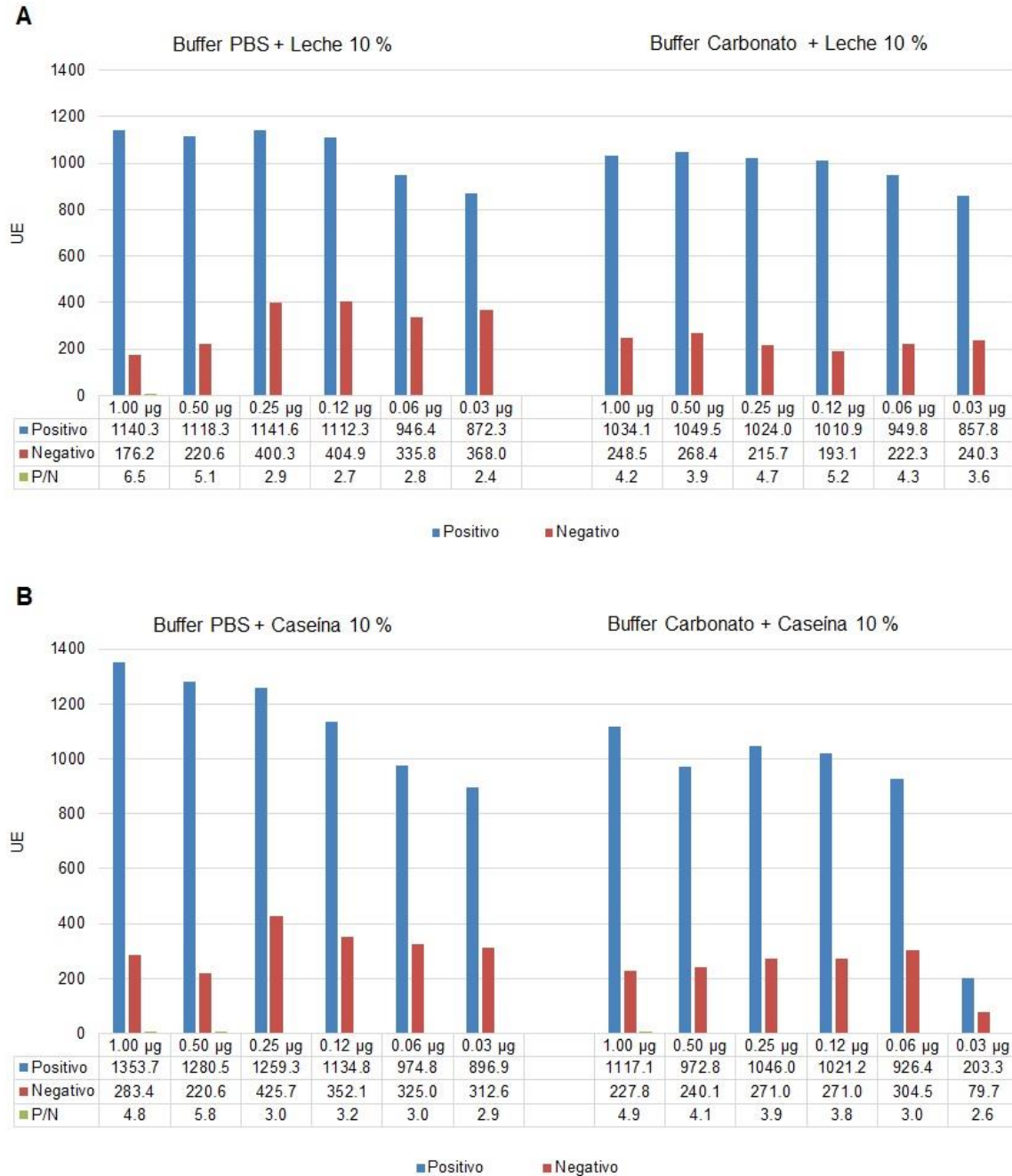


Figura 4. Resultados de la implementación del inmunoensayo utilizando dos agentes bloqueadores (leche y caseína), dos tampones de adsorción de antígeno (PBS y carbonato-bicarbonato) y diferentes diluciones de la proteína N (1 µg a 0.03 µg); suero 1:400 y conjugado anti-IgG (H+L) 1:40,000. UE: Unidades de ELISA. **A.** Adsorción con PBS y carbonato, bloqueo con leche descremada al 10%, **B.** adsorción con PBS y carbonato, bloqueo con caseína hidrolizada al 10%.

La dilución óptima del suero se determinó en 1:400 para los ELISA con los conjugados anti-IgG(H+L), anti-IgM, anti-IgA y anti-IgG1, mostrando la mejor diferencia entre sueros positivos y negativos (Figura 5). La dilución óptima de los diferentes conjugados fue: 1:40,000 para anti-IgG (H+L); 1:30,000 anti-IgM, 1:2,000 para anti-IgA y 1:500 para anti-IgG1, ya que presentaron mayor diferencia P/N y los valores negativos más bajos (Figura 6). En la Figura 7 se muestra la titulación de los sueros y del conjugado para el ELISA IgG4. La dilución óptima del suero fue 1:400 y del conjugado anti-IgG4 1:400. No se pudo determinar diferencias P/N significativas con los conjugados anti-IgG2 y anti-IgG3.

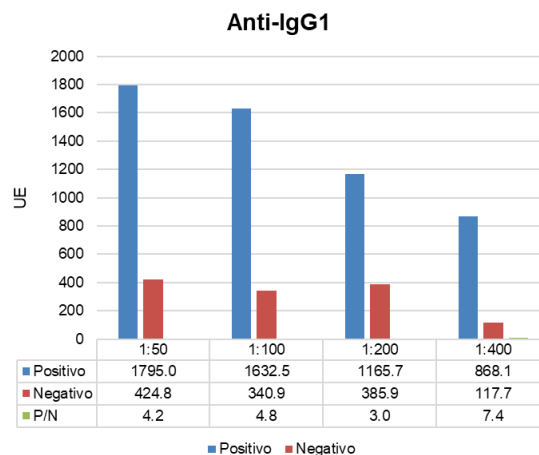
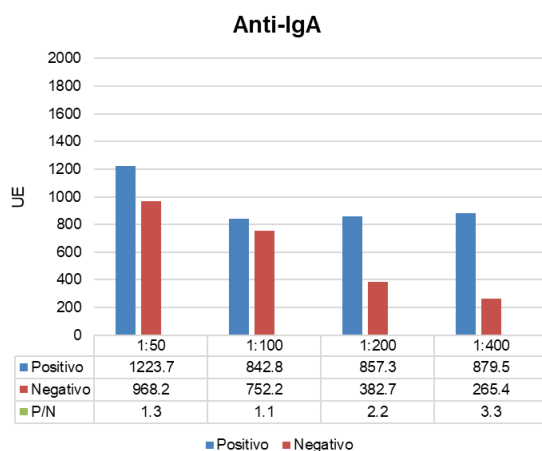
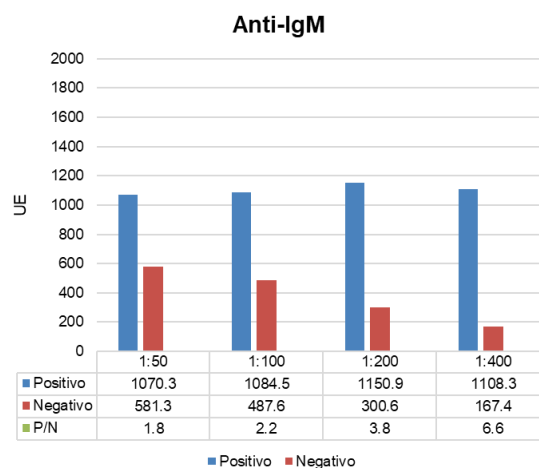
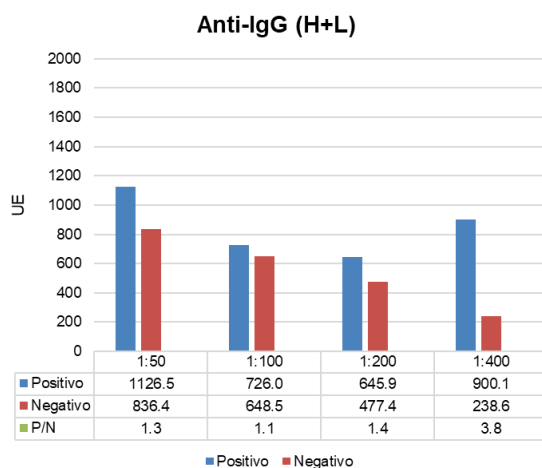


Figura 5. Resultados de las diferentes diluciones de sueros en una concentración de 1µg por pocillo del antígeno proteína N de SARS-CoV-2; bloqueo con leche descremada al 10% en PBS por conjugado. UE: Unidades de ELISA.

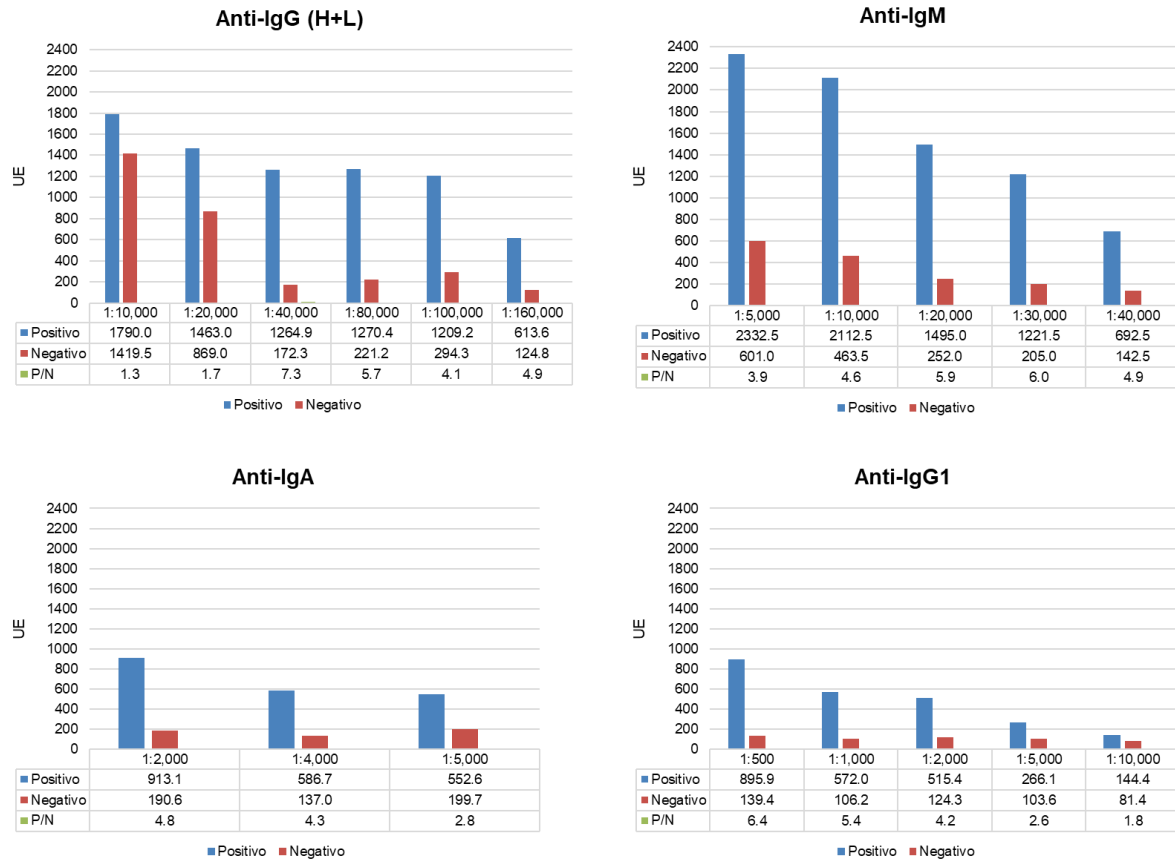


Figura 6. Resultados de la titulación de los conjugados; con 1µg de proteína N de SARS-CoV-2 por pocillo y bloqueo con leche descremada al 10% en PBS; dilución de los sueros 1:400. UE: Unidades de ELISA.

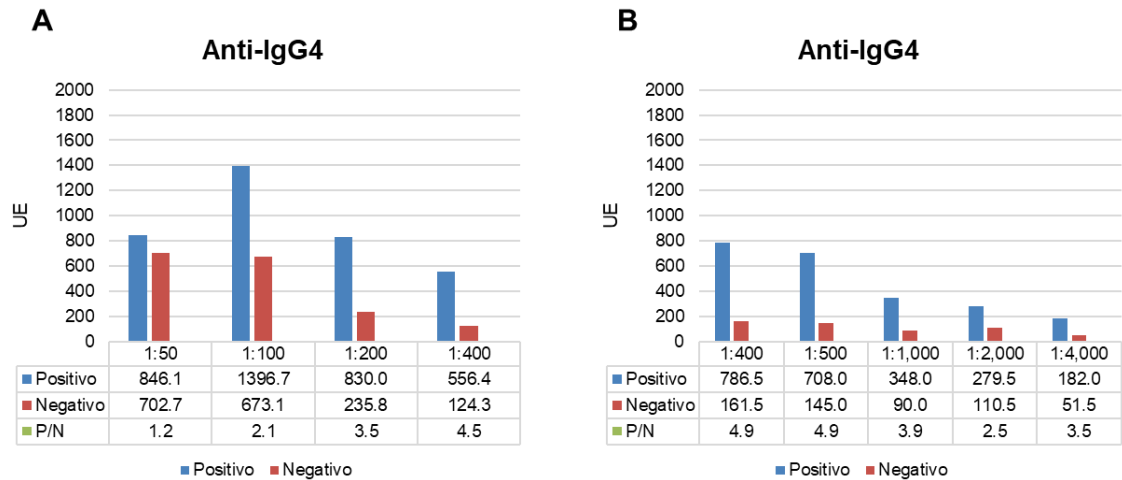


Figura 7. A. Resultados de las diferentes diluciones de sueros en una concentración de $1\mu\text{g}$ por pocillo del antígeno proteína N de SARS-CoV-2; bloqueo con leche descremada al 10% en PBS y conjugado anti-IgG4. **B.** Resultados de la titulación del conjugado IgG4 con $1\mu\text{g}$ de proteína N de SARS-CoV-2 por pocillo y bloqueo con leche descremada al 10 % en PBS; dilución de los sueros 1:400. UE: Unidades de ELISA.

El valor p de la prueba Shapiro-Wilk resultó ser $<0,0001$ para todos los anticuerpos, dado que este valor es menor que 0.05, podemos decir que los datos de la muestra no provienen de una población con distribución normal. Por otra parte, la distribución de los valores UE obtenidos en los análisis de los 200 sueros negativos preandémicos y los 204 sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos en los ELISA con los diferentes conjugados se muestran en la figura 8, donde los sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos mostraron UE significativamente mayores que los sueros controles preandémicos ($p < 0,0001$).

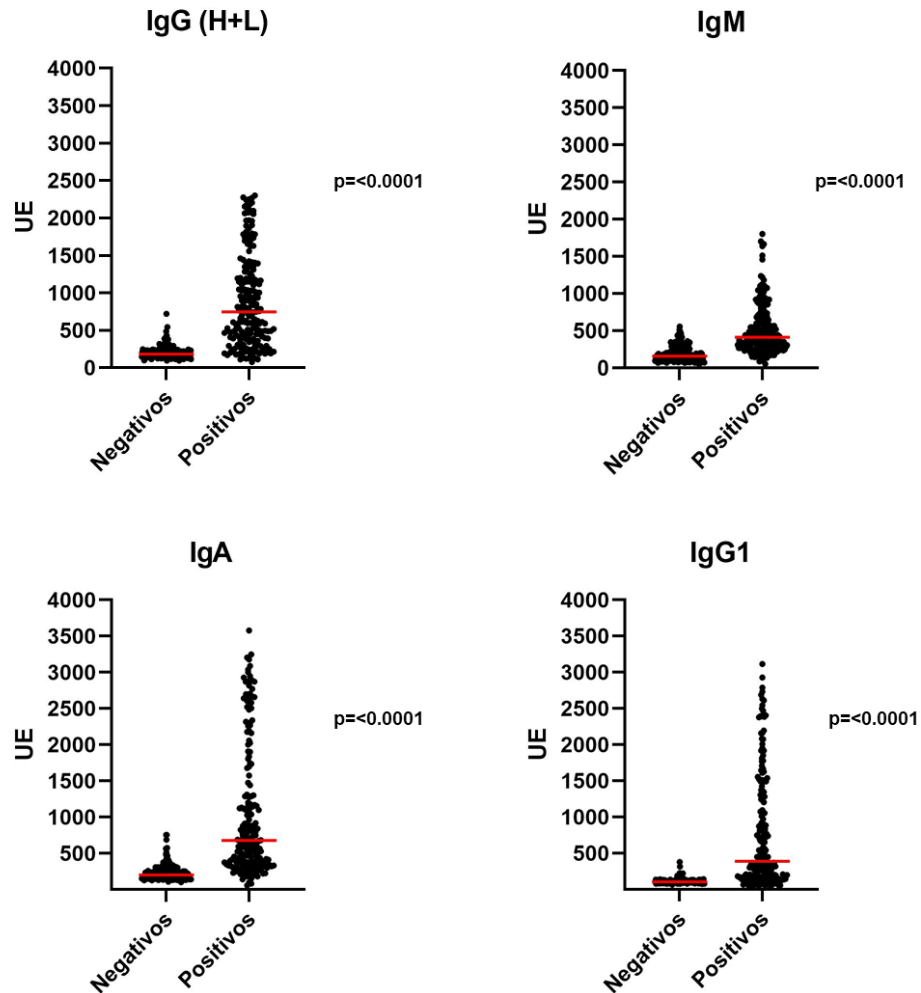


Figura 8. Distribución de los valores UE obtenidos en los análisis de los 200 sueros prepandémicos (negativos) y los 204 sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos en los diferentes inmunoensayos. Las barras rojas indican las medianas, valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. UE: Unidades de ELISA. Se indica el valor de significancia (p), valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

En la Figura 9 se muestra el análisis de las curvas ROC. El rendimiento general de los diferentes inmunoensayos fue alto, con AUC de 0,91, 0,88, 0,91 y 0,88, con un valor significativo ($p < 0.0001$) para la detección de anticuerpos tipo IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 contra la proteína N de SARS-CoV-2, respectivamente.

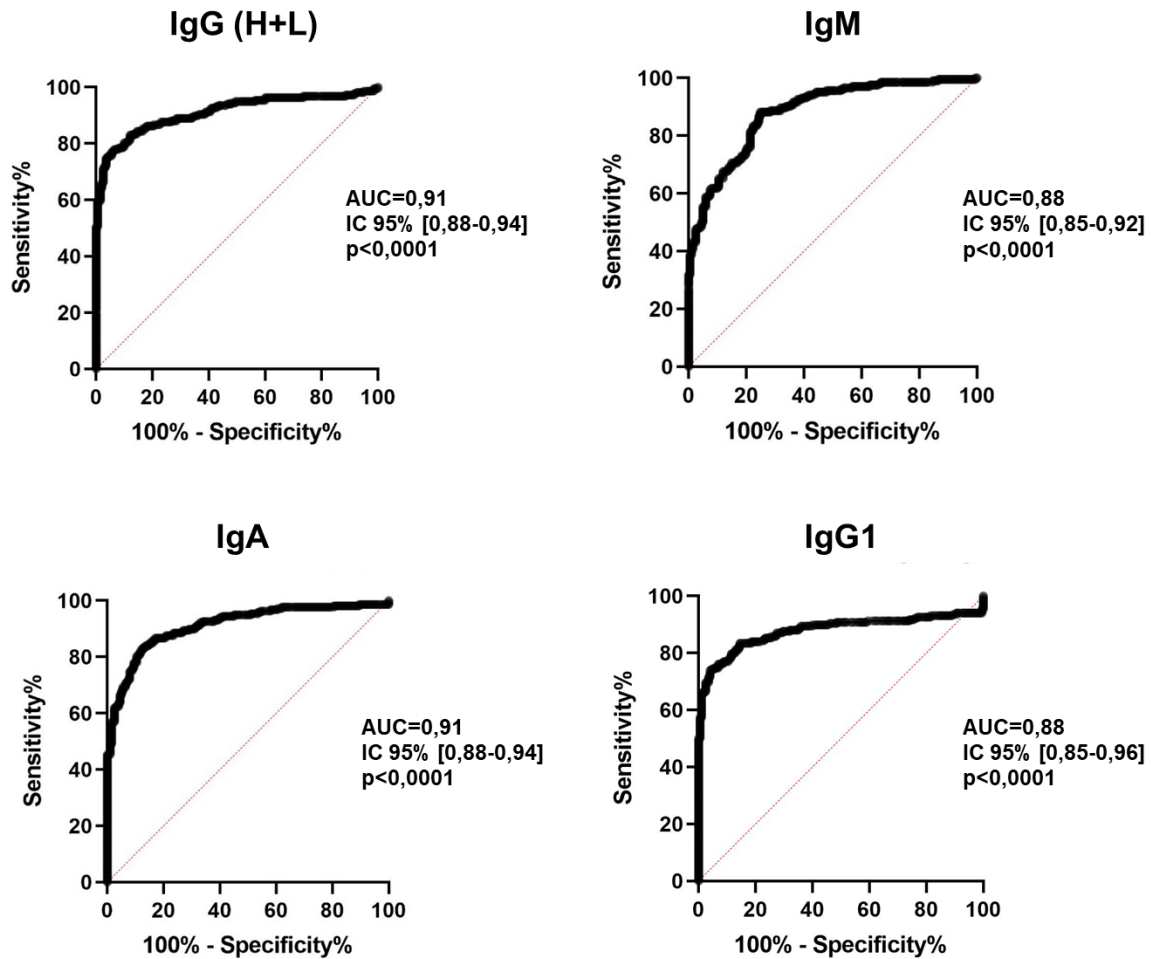


Figura 9. Curvas de ROC, mostrando el rendimiento diagnóstico de los diferentes inmunoensayos. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

En el Cuadro 2 se presentan en forma comparativa los diferentes puntos de corte calculados mediante las curvas ROC y mediante desviaciones estándar, también se muestran las sensibilidades y especificidades de los inmunoensayos estandarizados. El valor de la razón de verosimilitud de la prueba positiva (RVP+) para IgG (H+L) nos muestra que la probabilidad de tener COVID-19 si se obtiene un resultado positivo es ocho mayores que la probabilidad de tenerla si se obtiene un resultado negativo. Para IgM es 3,7 veces más probable, para IgA 6,8 veces y para IgG1 5,8 veces.

El punto de corte calculado a través del análisis de la curva ROC mostró la mayor sensibilidad y especificidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de los puntos de corte en unidades ELISA (UE) establecidos por la curva ROC y mediante desviaciones estándar y valores de sensibilidad (%), especificidad (%) y la razón de verosimilitud de la prueba positiva para cada inmunoensayo estandarizado.

ELISA	\bar{X} UE Negativos	RVP+	Punto de corte ROC general	Punto de corte $\bar{X}+3s$	Punto de corte $\bar{X}+2,58s$	Punto de corte $\bar{X}+2s$
Anti-IgG (H+L)	205,3	8,2	302,4 Se 81,4 Sp 90,1	464,2 Se 69,6 Sp 97,5	427,9 Se 72,6 Sp 97,0	377,9 Se 77,5 Sp 95,0
Anti-IgM	187,9	3,7	243,9 Se 83,3 Sp 77,6	494,90 Se 40,5 Sp 99,0	451,9 Se 44,1 Sp 97,5	392,60 Se 53,0 Sp 95,0
Anti-IgA	231,2	6,8	324,3 Se 81,9 Sp 88,1	540,9 Se 58,0 Sp 97,5	497,1 Se 62,3 Sp 96,0	437,10 Se 66,2 Sp 96,5
Anti-IgG1	112,3	5,8	136,3 Se 84,8 Sp 85,6	212,5 Se 67,2 Sp 97,0	198,5 Se 70,0 Sp 96,5	179,1 Se 73,5 Sp 96,0

\bar{X} : Media

s: Desviación estándar

Se: Sensibilidad

Sp: Especificidad

RVP +: Razón de verosimilitud positiva

El análisis de los sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos por grupos de días de evolución determinó mayor sensibilidad de los inmunoensayos estandarizados, en el grupo de <15 días con respecto a los grupos de 16-25 y de >25 días de evolución de la enfermedad excepto para IgM (Cuadro 3). Así mismo se vio un aumento significativo de la mediana de los valores UE para IgG (H+L), IgA e IgG1 para el grupo SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos con menos de 15 días de evolución de la enfermedad, mientras que para IgM se determinó un aumento de los valores UE en el grupo SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos entre 16-25 días de evolución de la enfermedad (Figura 10). En la figura 11 se muestra la tendencia dinámica de la tasa positiva, utilizando la curva ROC como punto de corte. Anticuerpos de tipo IgG4 se detectaron solamente en 12/204 muestras.

Cuadro 3: Sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de los diferentes inmunoensayos con respecto a los días de evolución de la enfermedad (Grupo 1: <15 días, Grupo 2: 16-25 días y Grupo 3: >25 días), calculado con la curva ROC y la razón de verosimilitud de la prueba positiva y negativa para cada inmunoensayo estandarizado.

Grupo	N	RVP + y -	IgG (H+L)	RVP + y -	IgM	RVP + y -	IgA	RVP + y -	IgG1
1	35	+	Se 85,7	+	Se 80,0	+	Se 88,6	+	Se 91,4
		-	Sp 95,0	-	Sp 78,0	-	Sp 89,5	-	Sp 94,5
		0,2		0,3		0,1		0,1	
2	59	+	Se 80,4	+	Se 98,3	+	Se 84,8	+	Se 83,1
		-	Sp 77,1	-	Sp 75,0	-	Sp 84,0	-	Sp 85,5
		0,3		0,0		0,2		0,2	
3	110	+	Se 84,6	+	Se 90,0	+	Se 83,6	+	Se 83,6
		-	Sp 90,1	-	Sp 75,0	-	Sp 86,5	-	Sp 85,5
		0,2		0,1		0,2		0,2	

Los valores de sensibilidad y especificidad están dados en porcentajes (%)
RVP: razón de verosimilitud

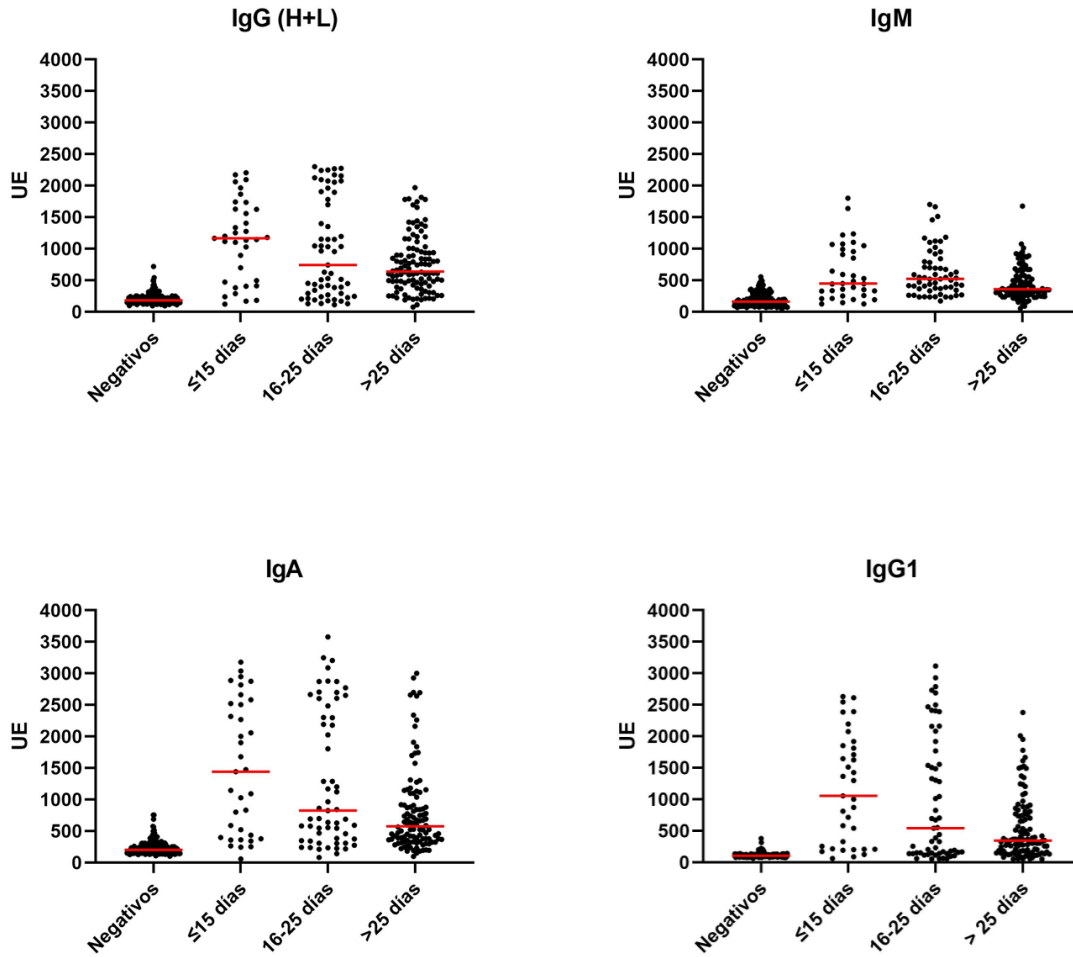


Figura 10. Valores de UE de los 200 sueros prepandémicos (negativos) y de los 204 sueros SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos clasificados en tres grupos según los días de evolución de la enfermedad (<15 días, 15-25 días y >25 días). Las barras rojas indican las medianas. UE: Unidades de ELISA.

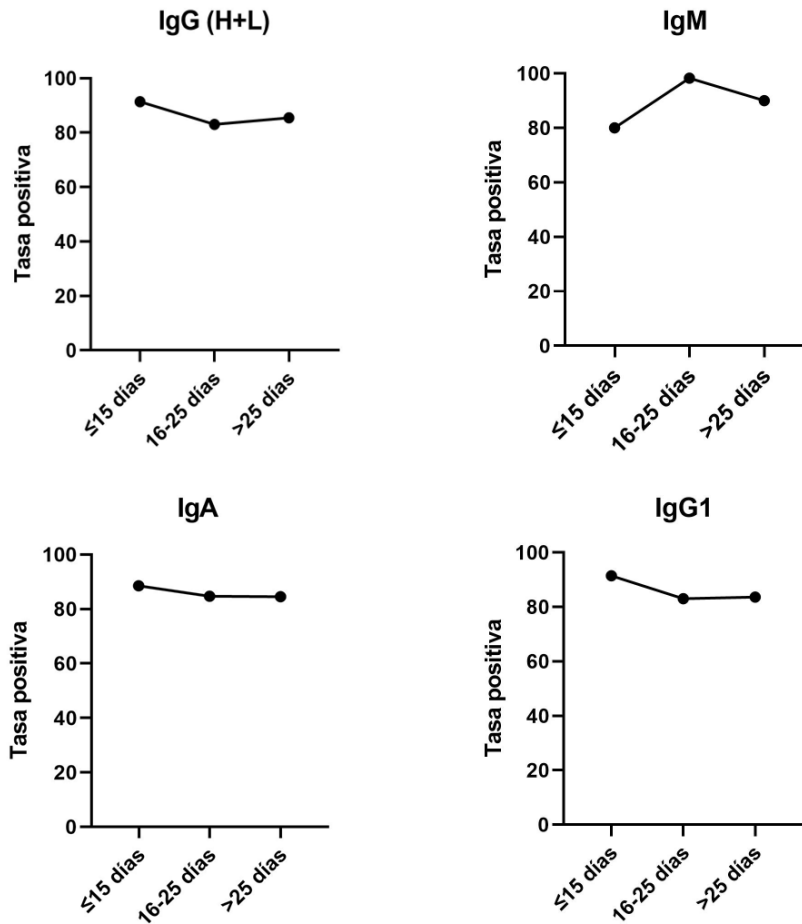


Figura 11. Tendencia dinámica de la tasa positiva en sueros de pacientes con diferentes días de evolución de la enfermedad. ≤ 15 días (n = 35), 16-25 días (n = 59) y >25 días (n = 110).

4. Discusión

El utilizar la tecnología de producción de proteínas recombinantes mediante bacterias como la *E.coli*, BL 21 Star (DE3), resulta un sistema bastante eficiente y tiene la ventaja de que se cuenta con un sinnúmero de protocolos (Rossano & Ceccarelli, 2014). La proteína N purificada se obtuvo a partir de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), sin embargo, se pudo observar que esta proteína forma cuerpos de inclusión no clásicos, pudiéndose extraer en los lavados en condiciones poco desnaturizantes. Los cuerpos de inclusión no clásicos han sido reportados también por Jevševar et al. (2005) y plantean una ventaja respecto a los cuerpos

de inclusión clásicos, en cuanto a que se pueden obviar pasos como la desnaturalización y renaturalización de la proteína, además de que se reportan mayores rendimientos de proteína funcional con la formación de estos cuerpos de inclusión no clásicos. Para evitar la agregación de la proteína, se redujo la concentración de ésta antes de dializarla utilizando una dilución 1:2. Algunos autores como Chura-Chambi et al. (2022) y Das & Suresh (2006) recomiendan diluir la proteína aún más, por debajo de 100 µg/ml para evitar la agregación y tener una proteína funcional.

El rendimiento de la proteína producida en el presente estudio fue similar a lo reportado por otros investigadores como Li et al. (2021) (50 mg/L), donde utilizaron condiciones desnaturalizantes con urea (8 M), aunque produjeron su proteína con el plásmido PET28a y utilizaron una resina catiónica débil para la purificación, reportando una mejor afinidad de unión a la proteína N en comparación a la resina Ni-NTA. Entre las principales diferencias de este plásmido están en que el plásmido pET 28a posee un gen de resistencia a la kanamicina, mientras que el plásmido pET 24a cuenta con un gen que confiere resistencia a la ampicilina. En el caso del pET 24a, posee un sistema de fusión de polihistidina C-terminal, mientras que el plásmido pET 28a ofrece un sistema de fusión de etiqueta His N-terminal junto con un sitio de escisión de trombina, lo cual permite la eliminación opcional de la etiqueta luego de la purificación. Además, es importante mencionar que se ha documentado aumentos del doble del rendimiento con el plásmido pET28a en comparación con pET24a. En última instancia, la elección del plásmido dependerá de las necesidades y preferencias del investigador (Shilling et al., 2020).

Otros estudios como el de Chura-Chambie et al. (2022) reportaron un rendimiento mayor al de este estudio (370 mg/L de cultivo bacteriano inicial) utilizando condiciones no desnaturalizantes y evitando así el proceso de purificación y diálisis. Con la proteína producida en este estudio es posible analizar aproximadamente 9600 sueros utilizando 1 µg de proteína por pocillo.

En el presente estudio se estandarizaron inmunoensayos para la detección de anticuerpos tipo IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1 e IgG4 contra la proteína N de SARS-CoV-2. Al estandarizar el ELISA se decidió utilizar el PBS ya que mostró mejor

rendimiento para la adsorción de la proteína, aunque se probó también un buffer de carbonatos de pH 9,6. La literatura recomienda que durante la estandarización de un ELISA se prueben tampones con pH entre 7,0 y 10,0, ya que se debe encontrar el pH apropiado para la proteína a adsorber a la placa y este puede variar ampliamente. Otro punto importante es encontrar la concentración correcta del antígeno a adsorber, por lo que se deben probar diferentes concentraciones (desde 0,5 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$) (Jordan, 2009). Otros autores han probado concentraciones de 12 $\mu\text{g/mL}$ (Rokni et al., 2010) y de hasta 40 $\mu\text{g/mL}$ (ProSci Incorporated, s/f), sin embargo, la mayor parte de la literatura informa que 10 $\mu\text{g/ml}$ es una concentración de recubrimiento óptima y es la que se utilizó en este estudio. La concentración que utilizamos en este ensayo fue más alta que la utilizada por Ranjbar et al. (2022), donde utilizaron 100 μl por pocillo a una concentración de proteína N de 5 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, utilizaron una concentración de suero mayor (1:100) y en nuestro caso la que mejor nos resultó fue la dilución del suero de 1:400. No se logró estandarizar los inmunoensayos para la detección de anticuerpos tipo IgG2 e IgG3, debido a algunas limitaciones como la carencia de controles positivos para estas subclases. Por otra parte, en el estudio de Korobova et al., (2022) probaron diluciones del suero más concentradas para IgG2 e IgG3 (1:25), mientras que para IgG1 e IgG4 utilizaron una dilución de 1:100, esto también podría explicar porque no se pudieron estandarizar.

Hasta la fecha, se han propuesto varios criterios, principalmente basados en análisis ROC para seleccionar el punto de corte más adecuado. En algunos casos, la sensibilidad es más importante que la especificidad, sin embargo, el punto requiere un balance entre las dos. Un enfoque razonable es aumentar ambos exponentes, aunque algunos investigadores prefieren un método sobre el otro. (Habibzadeh et al., 2016). En este caso para determinar la exactitud de las pruebas de ELISA, se optó por el análisis de la curva ROC, el cual mostró un AUC muy bueno para los inmunoensayos de IgG (H+L) (91,3), IgA (90,9), IgM (88,3) e IgG1 (88,2), lo que indica que estos son bastante eficientes a la hora de establecer pacientes con y sin anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2. Ensayos con intervalo de AUC entre 0,75 y 0,90 se consideran buenos y entre 0,90 y 0,97 muy

buenos (Cerdeja & Cifuentes, 2012). Así mismo, nuestros resultados muestran que la RVP+ de los ensayos tiene un alto valor diagnóstico, y que la probabilidad de que un paciente con infección por SARS-CoV-2 de positivo en la prueba es muy alta. Por otra parte, la RVP- de nuestro ensayo se compara con un metaanálisis realizado por Xie et al. (2022) donde reportaron RVP- de 0.24 para las pruebas de antígeno para SARS-CoV-2. Según la literatura cuanto mayor sea el valor de RVP + mejor será la capacidad para distinguir individuos con la enfermedad y cuanto menor sea el RVP- más fuerte la relación entre un resultado negativo en la prueba y la ausencia de la enfermedad (Ferreira & Patino, 2018).

El aumento de la sensibilidad de las pruebas con el grupo de SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos con menos de 15 días de evolución de la enfermedad con acuerdo con los encontrados por Nakano et al. (2021), que establecieron un 100% de sensibilidad de su prueba (SARS-CoV-2 IgG (H+L), cuando analizaron muestras de pacientes con 15 días de haber iniciado con los síntomas. Las sensibilidades y especificidades de los inmunoensayos estandarizados para la detección de anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2 son satisfactorias en comparación con reportes previos. Un estudio realizado por Liu et al. (2020) basado en la proteína N recombinante y analizando 214 muestras reportó una sensibilidad de 70,1% y 68,2% para IgG (H+L) e IgM respectivamente, valores debajo de los obtenidos en el presente trabajo (81,3% y 83,3%), además, establecieron tasas positivas para IgG (H+L) e IgM de aproximadamente 30% a 52% en los grupos de 0 a 5 días y de 6 a 10 días de inicio de síntomas, todos valores inferiores a los encontrados en nuestro trabajo (80.0% a 91.3%). En línea con nuestro trabajo Ranjbar et al. (2022) implementaron un ELISA basado en la proteína N y analizando 67 sueros positivos obtuvieron una sensibilidad de 91,0% y 92,5% y una especificidad del 98,2 % y 97,3 % para los inmunoensayos IgG (H+L) e IgM, respectivamente. Además, encontraron un aumento de la sensibilidad del ELISA IgG (H+L) en el grupo de pacientes de 0-7 días desde el inicio de síntomas, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio.

En el estudio de Li et al., (2021) reportaron tasas positivas de 69,0% y 72,4% para su ELISA casero IgM e IgG (H+L) respectivamente, dichos valores están por

debajo de los nuestros. Para IgM encontramos un aumento de la tasa positiva en el grupo de 16-25 días con respecto al grupo de <15 días desde la evolución de la enfermedad Kaduskar et al. (2022a) encontraron que el anticuerpo IgM alcanzó su punto máximo alrededor del día 35 después de inicio de síntomas y disminuyó rápidamente para volver aparecer a los 90 días, esto resalta que el anticuerpo IgM puede ser poco confiable para el diagnóstico de casos activos.

La mayoría de los estudios sobre SARS-CoV-2 reportan datos de acuerdo con los días después de inicio de síntomas, sin embargo, en nuestro trabajo reportamos de acuerdo con los días de evolución de la enfermedad. Al realizar una comparación agrupando los datos de acuerdo con los días de inicio de síntomas y los días de evolución de la enfermedad no se determinó diferencias significativas en las tasas positivas o los valores de sensibilidad y especificidad entre los dos grupos (datos no mostrados).

El anticuerpo IgG1 se encontró en 84,8% de los pacientes e IgG4 se detectó en 12 pacientes solamente, estos resultados concuerdan con los encontrados en otros estudios como los de Benabdessalem et al. (2022) y Luo et al. (2021), en donde observaron que en las respuestas de subtipos de IgG (H+L) dominaban las de tipo IgG1 y rara vez IgG4. En infecciones virales, especialmente en SARS-CoV-2 las principales subclases de IgG (H+L) reportadas son IgG1 e IgG3, los cuales se sabe tienen actividad antiviral (Benabdessalem et al., 2022).

La producción del antígeno recombinante N de SARS-CoV-2 y la estandarización de los ensayos inmunoenzimáticos permitirá obtener información epidemiológica relevante, relacionada con infecciones naturales en la población, medir los niveles y la duración de anticuerpos postexposición, monitorear prevalencias e incidencias, y calcular la proporción de infecciones asintomáticas en la población. Sobre todo, permitiría a países en vías de desarrollo producir sus propios ensayos en forma rápida y de bajo costo, tanto para tiempos de pandemia o para diagnóstico de rutina o de investigación. Una limitación en este estudio fue que las muestras de sueros prepandémicas no fueron analizadas para detectar anticuerpos contra otros coronavirus y así evitar posibles reacciones cruzadas.

5. Conclusiones

- ✓ La proteína N fue expresada y purificada exitosamente.
- ✓ Se logro estandarizar técnicas inmunoenzimáticas sensibles y específicas que detectan anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgA, IgG1 e IgG4 contra la proteína N de SARS-CoV-2.
- ✓ Se determinó mayor sensibilidad de los inmunoensayos estandarizados en el grupo de pacientes ≤ 15 días de evolución de la enfermedad con respecto a los grupos de 16-25 y de >25 días, excepto para el ELISA IgM.
- ✓ Se determinó un aumento significativo de la mediana de los valores UE para los ELISA IgG (H+L), ELISA IgA e ELISA IgG1 para el grupo de menos de ≤ 15 días de evolución de la enfermedad, mientras que para el ELISA IgM se determinó un aumento de los valores UE en el grupo de 16-25.
- ✓ Anticuerpos de tipo IgG4 se detectó solamente en 12/204 muestras.

6. Recomendaciones

- ✓ Implementar métodos de purificación de la proteína N con menor nivel de agente desnaturizante o bajo condiciones no desnaturizantes, con el fin de ahorrar tiempo, evitar pérdidas y a la vez utilizar una alternativa más amigable con el medio ambiente.
- ✓ Producir la proteína S recombinante de SARS-CoV-2 para utilizarla en inmunoensayos para medir la respuesta protectora.
- ✓ Investigar la respuesta inmune humoral a la proteína N de SARS-CoV-2 en una infección natural.

7. Referencias bibliográficas

- Alvarado-Mesén, J., Solano-Campos, F., Canet, L., Pedrera, L., Hervis, Y.P., Soto, C., Borbón, H., Lanio, M.E., Lomonte, B., Valle, A., Álvarez, C. (2019). Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biochimie*; 156: 206-223. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.013>
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczyszak, D., Polanco, J.,

- Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydillo, T., Miorin, L., Fierer, D., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoeber, J., Liu, S. T. H., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20037713>
- Bata, J. E., Gyenes, L., & Sehon, A. H. (1964). THE EFFECT OF UREA ON ANTIBODY-ANTIGEN REACTIONS. *Immunochemistry*, 1(4), 289–293. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(64\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0019-2791(64)90029-1).
- Benabdessalem, C., Marzouki, S., Hamouda, W. Ben, Trabelsi, K., Boumaiza, M., Hamouda, S. Ben, Ouni, R., Bchiri, S., Chaaban, A., Gdoura, M., Gorgi, Y., Sfar, I., Yalaoui, S., Khelil, J. Ben, Hamzaoui, A., Abdallah, M., Cherif, Y., Petres, S., Ka, C., ... Ahmed, M. Ben. (2022). *COVID-19 in Tunisia (North Africa): IgG and IgG subclass antibody responses to SARS-CoV-2 according to disease severity*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.01.22271696>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Burbelo, P. D., Riedo, F. X., Morishima, C., Rawlings, S., Smith, D., Das, S., Strich, J. R., Chertow, D. S., Richard T. Davey, J., & Cohen, J. I. (2020). Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.20.20071423>
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*, 96(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00032-9)
- Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 138–141. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
- Chura-Chambi, R. M., de Brandão Prieto-Da-Silva, A. R., Di Lela, M. M., Oliveira, J. E., Abreu, P. E. A., Meireles, L. R., de Andrade Junior, H. F., & Morganti, L. (2022). High level SARS-CoV-2 nucleocapsid refolding using mild condition for inclusion bodies solubilization: Application of high pressure at pH 9.0. *PLoS ONE*, 17(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0262591>

- Das, D., & Suresh, M. R. (2006). Copious production of SARS-CoV nucleocapsid protein employing codon optimized synthetic gene. *Journal of Virological Methods*, 137(2), 343. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2006.06.029>
- Della-Torre E, Lanzillotta M, Strollo M, Ramirez GA, Dagna L, Tresoldi M; COVID-BioB study group. Serum IgG4 level predicts COVID-19 related mortality. *Eur J Intern Med*. 2021 Nov; 93:107-109. doi: 10.1016/j.ejim.2021.09.012. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34598853; PMCID: PMC8461218
- Ferreira, J. C. & Patino, C. M. (2018). Understanding diagnostic tests. Part 3. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* (1), 4. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562018000000017>.
- Habibzadeh, F., Habibzadeh, P., & Yadollahie, M. (2016). On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. *Biochemia Medica*, 26 (3), 297. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.034>.
- Invitrogen (2016). BL21 Star™(DE3) One Shot® pLysS Chemically Competent Cells, *Invitrogen Corporation*, California, USA.
- Jevševar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., & Menart, V. (2005). Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology Progress*, 21(2), 632–639. <https://doi.org/10.1021/BP0497839>
- Kaduskar, O., Gurav, Y. K., Deshpande, K., Desphande, G. R., Yadav, P., Rakhe, A., Tilekar, B. N., Gomade, P., Salunke, A., Patil, C., Dange, V., Salve, P., Patsute, S., Abraham, P., & Sapkal, G. N. (2022). Understanding the dynamics of IgM & IgG antibodies in COVID-19-positive patients. *The Indian Journal of Medical Research*, 155(5–6), 565. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_675_21
- Li, G., Li, W., Fang, X., Song, X., Teng, S., Ren, Z., Hu, D., Zhou, S., Wu, G., & Li, K. (2021). Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. *Protein Expression and Purification*, 186, 105908. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2021.105908>

- Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., Wang, Q., Tan, L., Wu, W., Tang, S., Xiong, Z., & Zheng, S. (2020). Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6). <https://doi.org/10.1128/JCM.00461-20>
- Luo, H., Jia, T., Chen, J., Zeng, S., Qiu, Z., Wu, S., Li, X., Lei, Y., Wang, X., Wu, W., Zhang, R., Zou, X., Feng, T., Ding, R., Zhang, Y., Chen, Y. Q., Sun, C., Wang, T., Fang, S., & Shu, Y. (2021). The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 12, 460. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632814/BIBTEX>
- Nakano, Y., Kurano, M., Morita, Y., Shimura, T., Yokoyama, R., Qian, C., Xia, F., He, F., Kishi, Y., Okada, J., Yoshikawa, N., Nagura, Y., Okazaki, H., Moriya, K., Seto, Y., Kodama, T., & Yatomi, Y. (2021). Time course of the sensitivity and specificity of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies for symptomatic COVID-19 in Japan. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82428-5>
- Novagen pET System Manual, 11th ed. (2005). *Biosciences*, Darmstadt, Germany. ProSci Incorporated. (n.d.). *ELISA Protocol (Antibody Capture)*. Retrieved December 13, 2022, from <https://www.prosci-inc.com/wp-content/uploads/2021/12/ProSci-ELISA-Protocol.pdf>
- Ranjbar, M., Asadi, M., Nourigorji, M., Sarkari, B., Mostafavi-Pour, Z., Zomorodian, K., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., Maleksabet, A., Moghadami, M., & Savardashtaki, A. (2022). Development of a recombinant nucleocapsid protein-based ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, October 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1002/bab.2308>
- Rokni, M., Aryaeipour, M., Koosha, S., & Rahimi, M. (2010). Evaluation of the Stability of Coated Plates with Antigen at Different Temperatures and Times by ELISA Test to Diagnose Fasciolosis. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(1), 41.

- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>
- Sambrook, J., y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3ra ed. New York, United States of America: Cold Spring Harbor.142-144.
- SIGMA-ALDRICH (2017). Anti-Human IgG (whole molecule)-Peroxidase, Misuri, USA.
- SIGMA-ALDRICH (2017).3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), Misuri, USA.
- Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., Phalke, S., & Velu, G. S. K. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Frontiers in Medicine*, 0, 35. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.815389>
- Thermo Scientific (2016). B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent, Rockford, USA.
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/S42003-020-0939-8>
- Szymczak, A., Jędruchiewicz, N., Torelli, A., Kaczmarzyk-Radka, A., Coluccio, R., Kłak, M., Konieczny, A., Ferenc, S., Witkiewicz, W., Montomoli, E., Miernikiewicz, P., Bąchor, R., & Dąbrowska, K. (2021). Antibodies specific to SARS-CoV-2 proteins N, S and E in COVID-19 patients in the normal population and in historical samples. *Journal of General Virology*, 102, 1692. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001692>
- Thermo Scientific (2016). HisPur™ Ni-NTA Purification Kit, Rockford, USA
- Xie, J. W., He, Y., Zheng, Y. W., Wang, M., Lin, Y., Lin, L. R. (2022). Diagnostic accuracy of rapid antigen test for SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis of 166,943 suspected COVID-19 patients. *Microbiological Research*, 265, 127185. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127185>

ARTÍCULO 2

Títulos de inmunoglobulinas de diferentes clases y subclases contra la proteína N de SARS-CoV-2 en sueros de pacientes según gravedad de la enfermedad, sexo y edad.

Resumen

La enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19) es causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV-2), y se divide en categorías, según la gravedad, a saber, en asintomático, leve, moderado y grave. El objetivo del presente trabajo fue investigar títulos de anticuerpos de las clases IgG (H+L), IgA, IgM y subclases IgG1 e IgG4 dirigidos contra la proteína N de SARS-CoV-2 mediante técnica inmunoenzimática (ELISA) en pacientes agrupados según la gravedad de la enfermedad, sexo y edad. Se analizaron 204 sueros de pacientes con COVID19, 92 hombres y 112 mujeres, los cuales se agruparon en tres grupos etarios: 18-35 años (n = 69), 36-60 años (70), >61 años (n=65), y en cuatro grupos de pacientes: pacientes con enfermedad grave (n = 57), pacientes con enfermedad moderada (n =49), pacientes con enfermedad leve (n=50), y pacientes que resultaron positivos durante el periodo de dominancia de la variante ómicron (n =48) y estaban hospitalizados con enfermedad grave. Los anticuerpos IgG (H+L) e IgA mostraron las medianas de unidades ELISA más altas. Los pacientes graves mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos ($p < 0.05$) en comparación a pacientes con enfermedad moderada, leve y pacientes positivos durante el periodo de dominancia de la variante ómicron. No se estableció correlación entre el sexo y los niveles de anticuerpos. En cuanto a las edades solamente se determinó diferencia significativa ($p < 0,05$) para el anticuerpo IgM. Se pudo demostrar una correlación moderada para IgM e IgG (H+L) ($r = 0,6672$, $p < 0,0001$), IgM e IgA ($r = 0,5487$, $p < 0,0001$), e IgG (H+L) e IgA ($r = 0,6620$, $p < 0,0001$) en los pacientes graves. Se logró demostrar que los niveles séricos de anticuerpos contra la proteína N se correlacionan significativamente con la gravedad

de la infección por COVID-19 y que en la enfermedad grave los altos títulos de diversos anticuerpos están correlacionados.

Palabras Claves: COVID-19, ELISA, proteína nucleocápside

Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), and is divided into categories, based on severity of the disease, namely asymptomatic, mild, moderate, and serious condition. The objective of the present work was to investigate antibody titers of the IgG (H+L), IgA, and IgM classes, as well as IgG1 and IgG4 subclasses directed against the N protein of SARS-CoV-2 in patients grouped according to the severity of the disease, gender, and age. A total of 204 sera from patients with COVID19 were analyzed, 92 men and 112 women, who were grouped into three age groups: 18-35 years (n = 69), 36-60 years (70), > 61 years (n = 65). , and in four groups of patients: patients with severe disease (n = 57), patients with moderate disease (n = 49), patients with mild disease (n = 50), and patients who were positive during the omicron variant dominance period (n = 48) and were hospitalized with severe disease. The IgG (H+L) and IgA antibodies showed the highest mean of ELISA units. Severe patients showed significantly higher ($p < 0.05$) antibody levels compared to moderate, mild and positive patients during the omicron variant dominance period. We found no correlation between sex and antibody levels. Regarding age, a significant difference ($p < 0.05$) was only determined for the IgM antibodies. A moderate correlation could be demonstrated for IgM and IgG (H+L) ($r = 0.6672$, $p < 0,0001$), IgM and IgA ($r = 0.5487$, $p < 0.0001$), and IgG (H+L) and IgA ($r = 0.6620$, $p < 0,0001$) in seriously ill patients. It was possible to demonstrate that serum levels of antibodies against the N protein are significantly correlated with the severity of the COVID-19 infection and that in severe cases the high titers of various antibodies were correlated.

Keywords: COVID-19, ELISA, nucleocapsid protein

1. Introducción

La enfermedad infecciosa por coronavirus 2019 (COVID-19) que surgió en Wuhan, China fue causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV-2), y fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como pandemia el 11 de marzo de 2020. Al 14 de mayo de 2023, se han confirmado más de 766 millones de casos y más de 6,9 millones de muertes en todo el mundo (Who, 2023). La COVID-19 tiene una amplia gama de manifestaciones clínicas, la mayoría de las personas presentan fiebre o escalofríos, tos, dificultad para respirar, fatiga, dolores musculares, dolor de cabeza, pérdida del gusto (ageusia) u olfato (anosmia), dolor de garganta, congestión o secreción nasal, náuseas o vómitos y diarrea (CDC, 2020). La enfermedad de COVID-19 se divide en categorías según la gravedad en: asintomático, leve, moderado y crítico (National Institutes of Health [NIH]). Estudios ha revelado algunos factores de riesgo que determinan la gravedad de la enfermedad, como, por ejemplo: obesidad, enfermedad renal crónica, diabetes, hipertensión y asma, con un aumento considerable en tasas de hospitalización en aquellos pacientes con >3 afecciones o más subyacentes en comparación con los que no las tienen. Así mismo, se observaron tasas más altas de hospitalización en adultos mayores de 65 años o entre 45-64 años en comparación con los de 18-44 años. La tasa de hospitalización fue mayor en hombres en contraste con mujeres y mayor en afrodescendientes en comparación con blancos no hispanos (Ko et al., 2021).

El SARS-CoV-2 posee cuatro proteínas estructurales que incluyen la proteína de la espiga (S), la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína de nucleocápside (N) (Ranjbar et al., 2022). Las dos proteínas más importantes en el diagnóstico de anticuerpos contra SARS-CoV-2 son las proteínas S y N. La proteína S es la que se une al receptor de la célula susceptible y permite la entrada del virus, los anticuerpos contra esta proteína se consideran protectivos; mientras que la proteína N es la proteína más abundante del virus y altamente inmunogénica, es la que envuelve y protege el genoma viral y es bien conservada, por lo que se considera importante en la detección temprana de COVID-19. Se ha demostrado que los anticuerpos contra la proteína N aparecen antes que los

producidos contra el RBD (dominio de unión al receptor) de la proteína S (Benabdessalem et al., 2022). Algunas mutaciones pueden aumentar la transmisión y la virulencia del virus, por lo que las variantes se clasifican por la OMS como variantes de preocupación (VOC), variantes de interés (VOI) o variantes bajo seguimiento (VUM) (Thakur et al., 2022). La variante ómicron surgió en noviembre de 2021 y está clasificada como VOC (CDC, s.f.), esta variante posee más de 30 mutaciones en la proteína S. La proteína S de ómicron no puede utilizar de forma eficaz la proteasa celular TMPRSS2, que promueve la entrada celular a través de la fusión de la membrana plasmática, por lo que esta variante depende en gran medida de la entrada a la célula a través de la vía endocítica, con una consecuente patogenicidad reducida. (Meng et al., 2022).

El diagnóstico de SARS-CoV-2 se realiza mediante pruebas directas como la retrotranscripción asociada a la reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), en la cual se diagnostica la presencia del virus mediante amplificación de segmentos de su genoma, o mediante técnicas indirectas, en las que se diagnostica la presencia de anticuerpos contra las diferentes proteínas del virus (proteínas N y S). Las pruebas serológicas se consideran métodos precisos y eficientes para la detección de patógenos, debido a que los anticuerpos específicos pueden detectarse mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con una capacidad de rendimiento relativamente alta y menos requisitos de muestra comparado con los análisis moleculares (Liu & Lu, 2020).

En estudios que investigaron los títulos de anticuerpos dirigidos contra la proteína N de SARS-CoV-2 mediante técnicas inmunoenzimáticas se establecieron títulos de anticuerpos IgG (H+L), IgG1 e IgG3 significativamente más altos en pacientes con enfermedad grave en comparación con pacientes sin enfermedad grave (Benabdessalem et al., 2022). También se estableció, que la respuesta de anticuerpos contra la proteína N se da antes en pacientes con enfermedad grave que en pacientes con enfermedad leve. Así, en un 81,4% de los pacientes con enfermedad leve se logró la detección de anticuerpos en la tercera semana después de la infección, cuando las muestras de hisopados resultaron negativas en RT-qPCR, mientras que en pacientes graves se detectó la presencia de anticuerpos

antes que los RT-qPCR dieran negativos. Esto ha llevado a hipotetizar que probablemente las altas cargas virales en los pacientes con enfermedad grave inducen la activación de las células B y una respuesta temprana de anticuerpos en infecciones agudas (Yongchen et al., 2020). Algunos estudios asocian además factores como el sexo masculino, la edad avanzada y la hospitalización por COVID-19 con mayores títulos de anticuerpos en las pruebas serológicas (Klein et al., 2020).

El objetivo del presente trabajo fue investigar títulos de anticuerpos de las clases IgG, IgA, IgM y subclases IgG1 e IgG4 dirigidos contra la proteína N de SARS-CoV-2 en sueros de pacientes según grado de enfermedad, sexo y edad.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio experimental, observacional y descriptivo.

2.2. Consideraciones bioéticas

Esta investigación se realizó con el aval del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social, mediante el protocolo HSJD-15-2021. La investigación se condujo respetando lo contenido en la declaración de Helsinki y el informe Belmont, así como con estricto apego a la ley 9234 de la República de Costa Rica. Las muestras fueron debidamente codificadas y anonimizadas para resguardar el derecho a la confidencialidad y privacidad de los participantes.

2.3. Tipo, tamaño y caracterización de la muestra

Se analizaron 204 sueros humanos SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos, resguardados a -80 ° C en la seroteca institucional del Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social. Estos sueros se obtuvieron de 92 hombres y 112 mujeres, con edades entre 18 a 99 años (promedio +- de 47 años), los cuales se agruparon en cuatro grupos de pacientes COVID-19: con enfermedad grave (n = 57), con enfermedad moderada (n = 49) y con enfermedad leve (n = 50), además de un grupo de pacientes hospitalizados con enfermedad grave que resultaron positivos durante el periodo de dominancia de la variante ómicron (n = 48). Los pacientes con enfermedad grave fueron aquellos hospitalizados en la unidad de

cuidados intensivos recibiendo ventilación invasiva o terapia con oxigenación por membrana extracorpórea, mientras que los pacientes moderados fueron aquellos hospitalizados en el salón general sin tratamiento de oxígeno y los pacientes con enfermedad leve fueron aquellos que no necesitaron hospitalización.

2.4. Técnica inmunoenzimática (ELISA)

La técnica inmunoenzimática estandarizada se describió en el capítulo anterior de este trabajo. El primer paso fue adsorber las placas de microtítulo (Corning) con la proteína N recombinante de SARS-CoV-2 diluida en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, a una concentración de 1 µg/100 µl y depositando un volumen de 100 µl en cada pocillo e incubando a 4 °C por 16 horas. Después de la incubación se bloqueó por 3 horas a 37 °C con leche descremada 10%, y se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS, 0,05 % Tween 20). Se añadieron 100 µl de los sueros diluidos 1:400 en solución de incubación (PBS, 0,05 % Tween 20 y 0,4% leche descremada) y se incubaron por 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con solución de lavado y se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en solución de incubación en las siguientes diluciones: Anti-IgG humano 1:40,000 (policlonal, Sigma Aldrich), Anti-IgM humano 1:30000 (policlonal, Invitrogen), Anti-IgA humano 1:2000 (policlonal, Invitrogen), Anti-IgG1 humano 1:500 (monoclonal, Invitrogen) y Anti-IgG4 humano 1:500 (monoclonal, Invitrogen). Los conjugados se incubaron en solución de incubación durante 30 minutos a 37 °C, se lavó nuevamente tres veces con solución de lavado y se añadió 100 µl del sustrato utilizando 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB, Sigma) como cromógeno diluido en H₂O₂ 3%, el cual se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 M. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm y se multiplicó por 1000 para obtener las Unidades ELISA (UE). Sueros con UE mayor o igual a 302,4, 243,9, 324,3, 136,3 y 499,4 se consideraron positivos para IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1 e IgG4, respectivamente.

2.5. Análisis Estadístico

2.5.1. Estadística descriptiva

Los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas no paramétricas como la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre las medianas

de los valores de UE en diferentes grupos (grado de enfermedad y sexo). Así mismo se utilizó la prueba paramétrica de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre las medianas de los valores de UE en los diferentes grupos de edad (18-35 años, 36-60 años, >61 años). Por último, se realizó un análisis de correlación para establecer si los niveles de anticuerpos estaban relacionados entre sí utilizando el programa GraphBad Prism versión 9.4.1 y valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados

Al analizar los títulos de anticuerpos de los diferentes grupos de pacientes (graves, moderados, leves y enfermos durante la dominancia de la variante ómicron), se determinó que el grupo de pacientes graves mostró los títulos más altos (Cuadro 1, Figura 1). Los anticuerpos con mayores títulos fueron IgG (H+L), IgA e IgG1 (Cuadro1).

Anticuerpos contra la IgG4 se detectaron en 12 de las 204 muestras analizadas, sobre todo en pacientes con enfermedad grave ($n = 5$) y enfermos graves en la ola ómicron ($n = 5$) y solamente en un paciente con síntomas leves y uno con signos moderados.

Cuadro 1: Mediana de los títulos de anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 (medido en unidades ELISA) de los diferentes grupos de pacientes (graves, moderados, leves y enfermos durante la dominancia de la variante ómicron).

Medianas de los valores UE				
Grupo pacientes	IgG (H+L)	IgM	IgA	IgG1
Pacientes graves	1654,0	520,2	2298,0	1490,0
Pacientes moderados	740,1	464,1	378,1	349,7
Pacientes leves	611,3	405,8	595,1	377,2
Ómicron	615,6	283,7	744,9	318,8

Se determinó niveles significativamente más altos ($p < 0,05$) de anticuerpos en pacientes con enfermedad grave en comparación con pacientes con enfermedad leve, moderados y enfermos durante dominancia de la variante ómicron (Figura 1) a excepción de IgM. Entre los grupos leves y moderados se determinó diferencias significativas para IgA ($p = 0,0014$), pero no para IgG (H+L), IgM e IgG1. Entre los enfermos leves y moderados se estableció diferencias significativas únicamente para el anticuerpo de tipo IgA ($p = 0,0014$) (Figura 1). En cuanto a los enfermos moderados y enfermos durante la dominancia de la variante ómicron se determinó diferencia significativa para IgM e IgA ($p < 0.0001$) (Figura 1). Por otra parte, cuando se comparó los enfermos leves y enfermos durante la dominancia de la variante ómicron solo se encontró diferencias significativas para IgM (Figura 1).

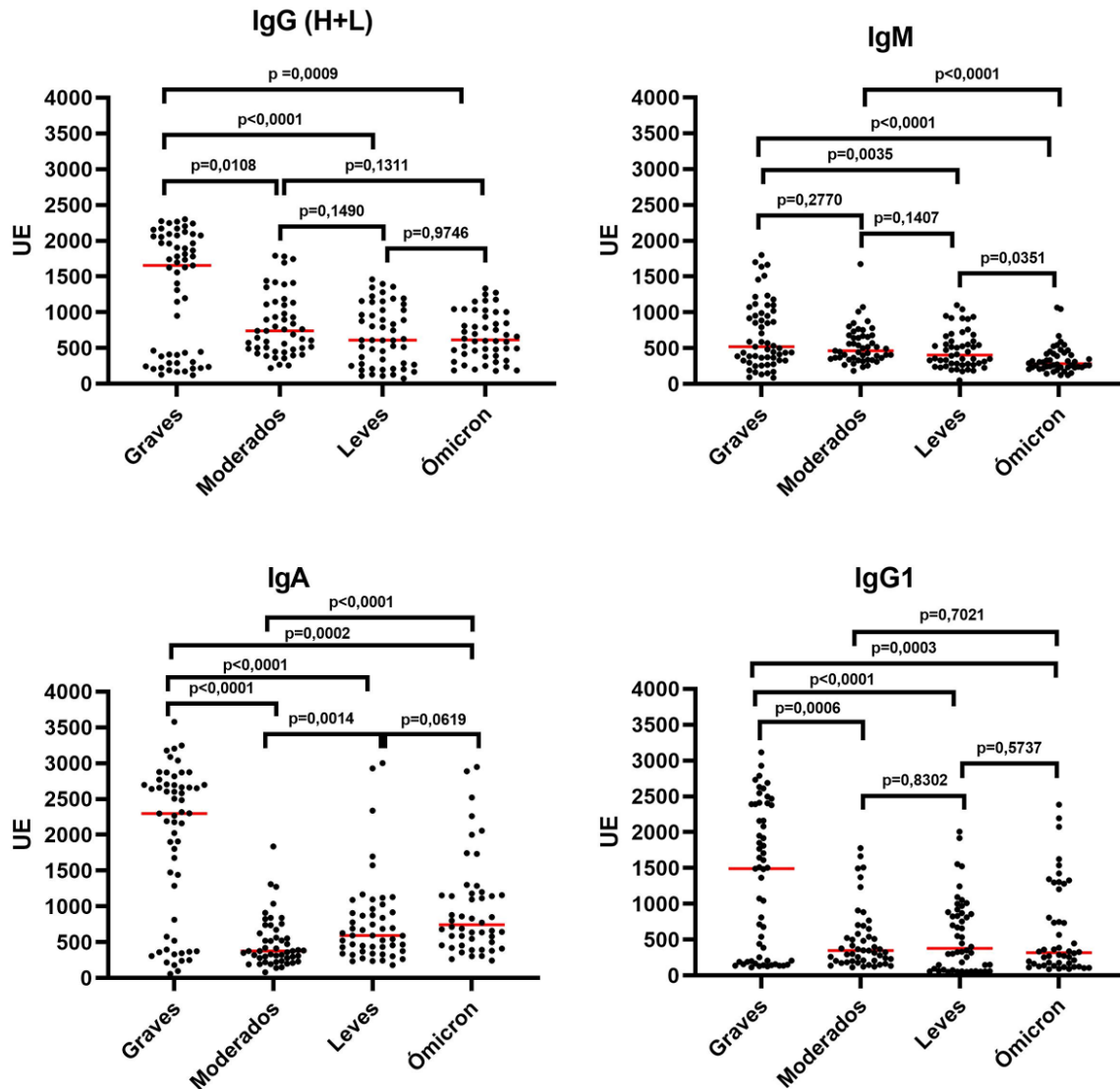


Figura 1. Títulos de anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 (medidos en unidades ELISA, UE) contra la proteína N de SARS-CoV-2 en pacientes con enfermedad grave, moderada, leve y durante la dominancia de la variante ómicron. Las barras rojas indican las medianas, valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

En el grupo de pacientes con enfermedad grave se establecieron correlaciones moderadas para IgM e IgG ($r = 0,6672$, $p < 0,0001$), IgM e IgA ($r = 0,5487$, $p < 0,0001$), e IgG e IgA ($r = 0,6620$, $p < 0,0001$) (Figura 2), mientras que

en el grupo de pacientes con enfermedad leve solamente se estableció una correlación moderada para IgG e IgA ($r = 0,7781$, $p < 0,0001$) (Figura 3).

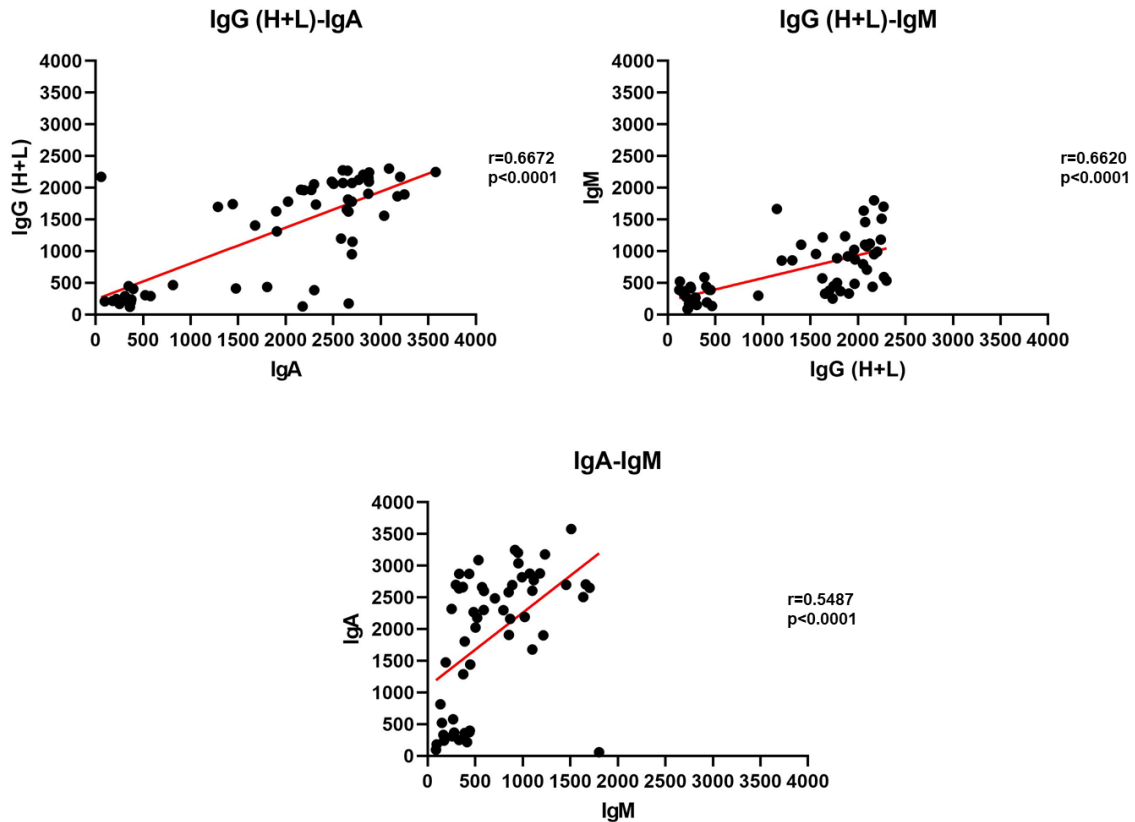


Figura 2. Correlación entre anticuerpos contra proteínas N en sueros de pacientes con enfermedad grave. Se muestra la línea de regresión para pares de valores de UE correspondientes a los anticuerpos. Se indican el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r) y el valor de significancia (p).

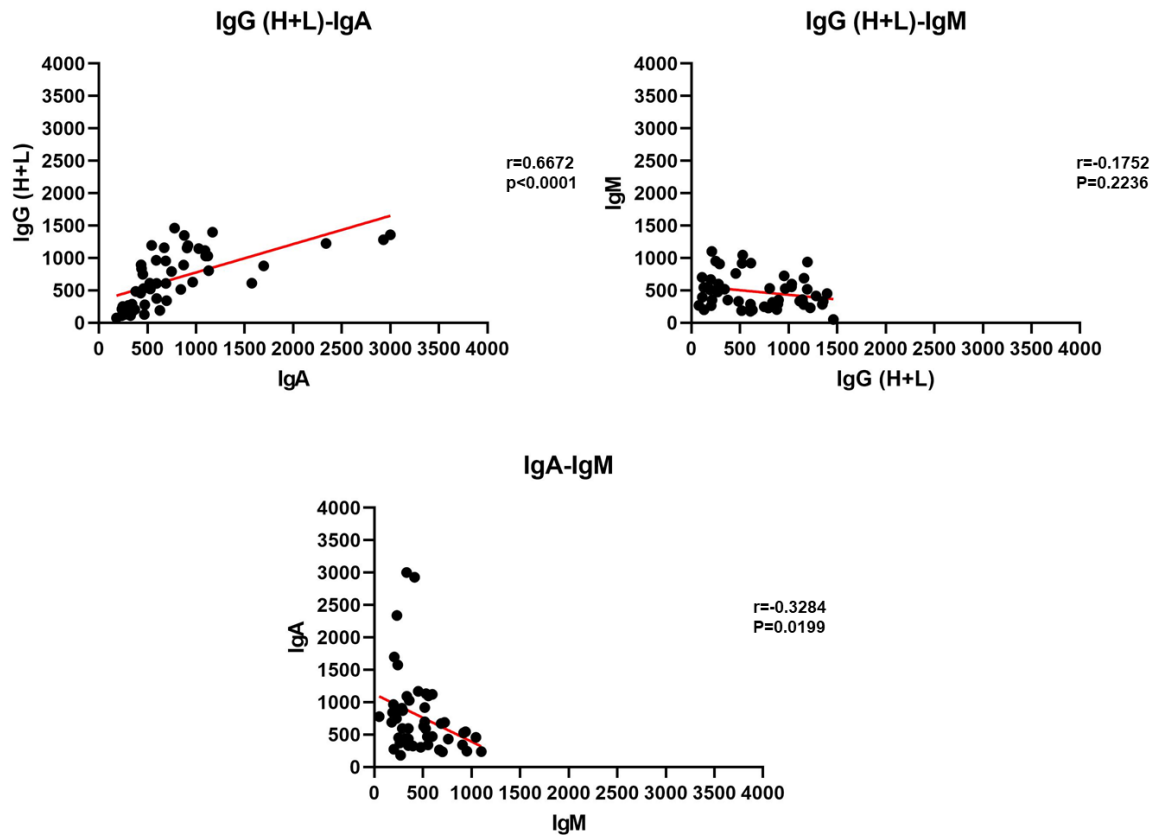


Figura 3. Correlación entre anticuerpos contra proteínas N en sueros de pacientes con enfermedad leve. Se muestra la línea de regresión para pares de valores UE correspondientes a los anticuerpos. Se indican el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r) y el valor de significancia (p).

La comparación del nivel de anticuerpos de tipo IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 entre hombres y mujeres no arrojó diferencias significativas (Figura 4), y el análisis del nivel de anticuerpos de tipo IgG (H+L), IgM, IgA e IgG1 en los diferentes grupos etarios sin tomar en cuenta la gravedad solamente determinó diferencia significativa ($p < 0,05$) para IgM (Figura 5).

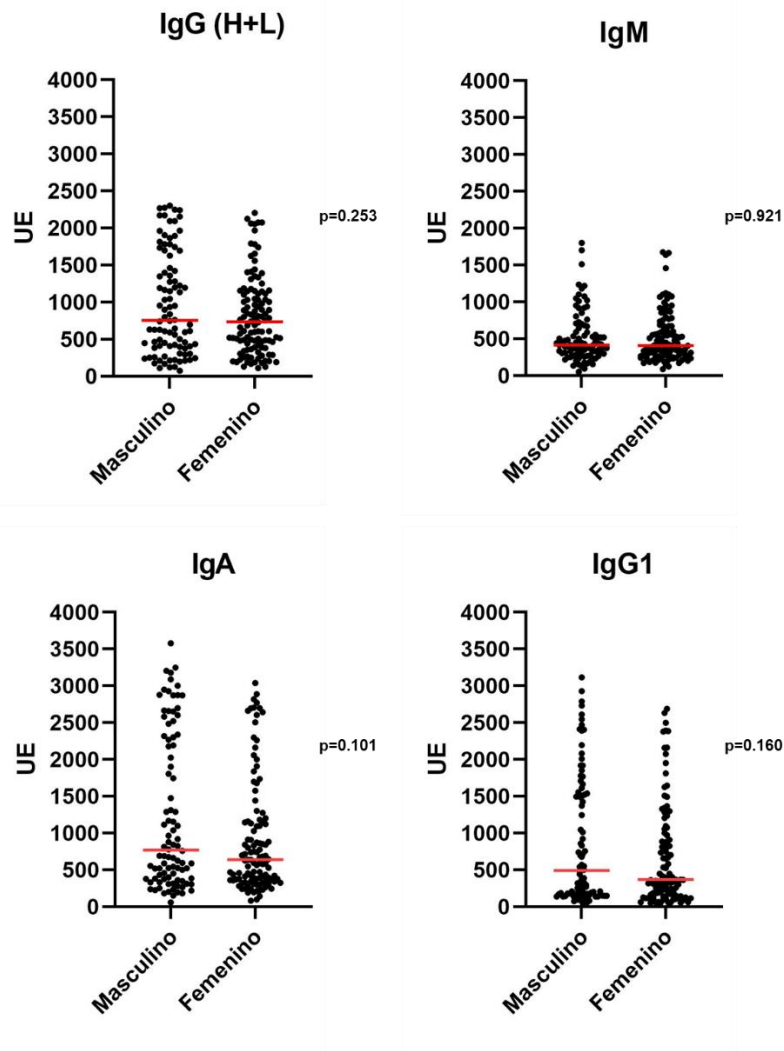


Figura 4. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 contra la proteína N de SARS-CoV-2 (medidos en unidades ELISA UE) en 92 pacientes masculinos y 112 pacientes femeninos. Las barras rojas indican las medianas. Se indica el valor de significancia (p), valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

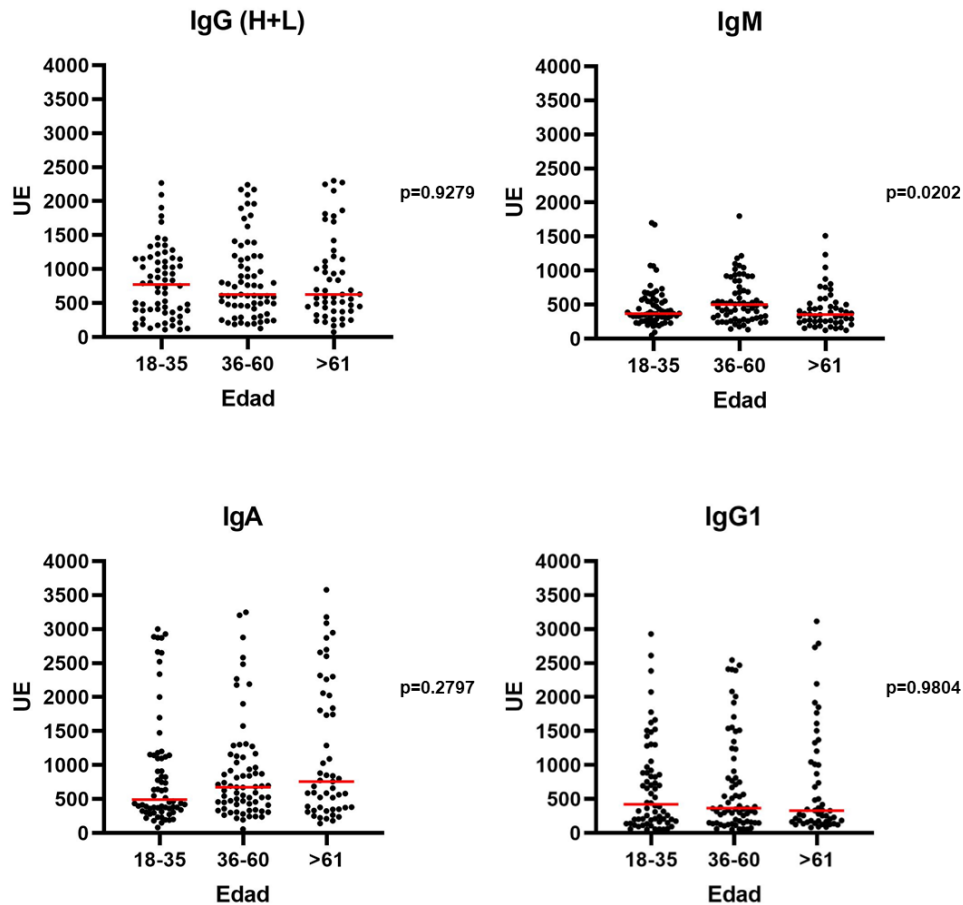


Figura 5. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 contra la proteína N de SARS-CoV-2 (medidos en unidades ELISA, UE) en tres diferentes grupos etarios sin tomar en cuenta la gravedad de la enfermedad: entre 18-35 años (n = 69), entre 36-60 años (n = 70) y mayores de 61 años (n = 65). Las barras rojas indican las medianas. Se indica el valor de significancia (p), valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Finalmente, el análisis del título de anticuerpos del grupo de pacientes graves con respecto a edad tampoco arrojó diferencias significativas (Figura 6).

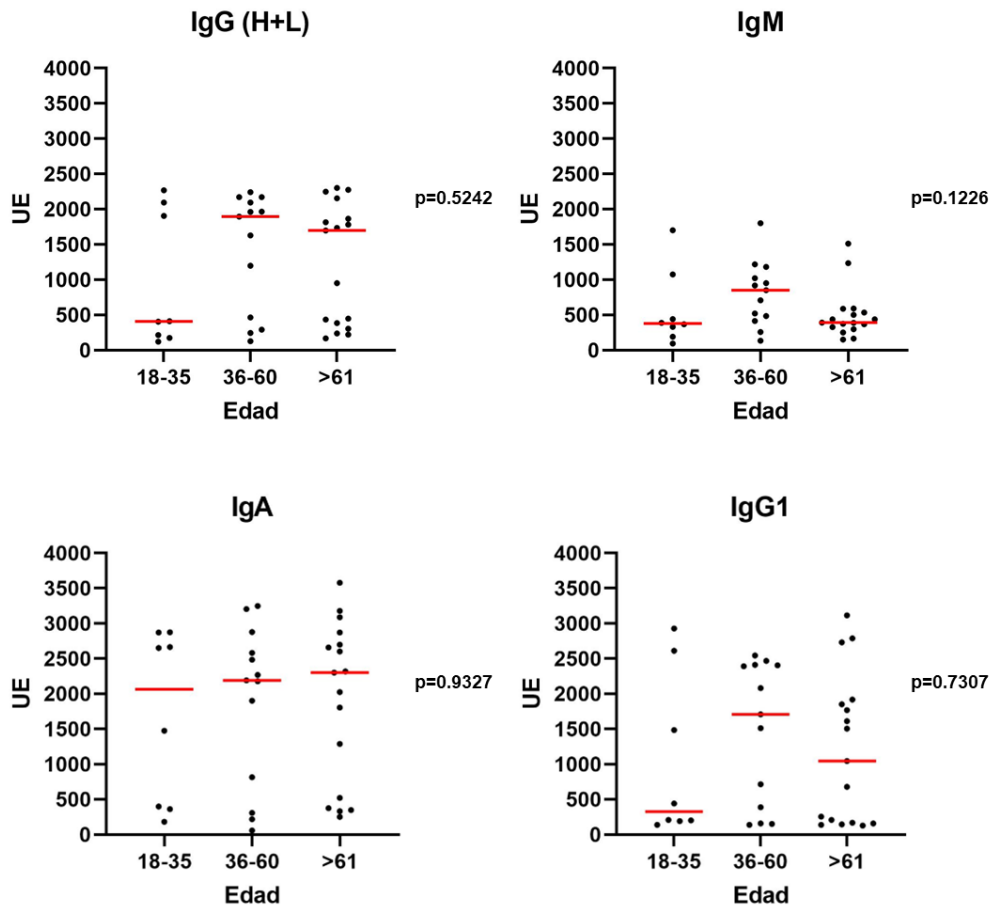


Figura 6. Comparación de títulos de anticuerpos de tipo IgG(H+L), IgM, IgA e IgG1 contra la proteína N de SARS-CoV-2 (medidos en unidades ELISA UE) en pacientes con enfermedad grave, en tres diferentes grupos etarios: 10 pacientes entre 18-35 años, 22 pacientes entre 36-60 años y 25 pacientes mayores 61 años. Las barras rojas indican las medianas. Se indica el valor de significancia (p), valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. Discusión

En el presente estudio los pacientes graves mostraron niveles significativamente más altos de anticuerpos tipo IgG (H+L), IgA e IgG1 en comparación al grupo de pacientes leves, lo que es consistente con diversos reportes como el de Chakraborty et al. (2021) y Benabdessalem et al. (2022), donde encontraron títulos más altos de IgG(H+L) e IgG1 en pacientes con enfermedad grave de COVID-19 en comparación con pacientes con enfermedad leve. En el

estudio de Zervou et al. (2021) determinaron títulos más altos de IgA en pacientes con enfermedad grave. Así mismo, Sterlin et al. (2021) reportaron sobre todo una respuesta inmune humoral de tipo IgA en sangre de pacientes con COVID19, así mismo Zervou et al. (2021) demostraron en su estudio que los niveles de IgA se correlacionaban estadísticamente con la enfermedad grave. Debido a que las mucosas son el sitio de entrada del virus, se explicaría una mayor activación de esta inmunoglobulina. Además, en el estudio de Cervia et al. (2021) observaron para la proteína S títulos totales de anticuerpos de tipo IgA e IgG en las muestras de suero comparables con los títulos en muestras de lágrimas, fluido nasal y saliva.

Numerosos estudios han establecido además existencia de una correlación entre la gravedad de la enfermedad y la intensidad de la respuesta humoral. Es bien sabido que altos niveles de citoquinas inflamatorias se asocian con enfermedad grave, y se ha sugerido un vínculo entre la respuesta inmunitaria y el daño orgánico (Carnicelli et al., 2022). En los pacientes en estado crítico hay además un aumento de la carga viral lo cual aumenta la secreción de citoquinas, lo que conlleva a un aumento en la presentación de antígenos y aumento de la respuesta humoral (Yates et al., 2021; Imai et al., 2021). Mientras que respuestas de anticuerpos más bajas en los pacientes con enfermedad leve pueden reflejar cargas de antígenos virales más bajas (Benabdessalem et al., 2022).

En los sueros de pacientes que enfermaron durante la dominancia de la variante ómicron el anticuerpo detectado en altos niveles fue IgG (H+L), pero no en niveles tan altos como los que enfermaron en forma grave al inicio de la pandemia. Esto puede deberse a que en la variante ómicron se utiliza la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), de forma ineficiente, la cual es la encargada de permitir el ingreso del virus a las células pulmonares, dando como resultado una replicación viral atenuada y una patogenicidad muy reducida, lo que explicaría los niveles de anticuerpos más bajos (Chu & Yuen, 2022).

La IgG4 se observó en mayor proporción en enfermos graves de la primera variante y enfermos graves durante la ola de ómicron. Estos datos son similares a los encontrados por Moura y colaboradores (2021), donde también encontraron la subclase IgG4 con mayor frecuencia en pacientes graves, aunque no especificaron

la variante. Algunos autores como Della-Torre et al. (2021) señalan que niveles detectables de IgG4 pueden predecir a un mal pronóstico de la enfermedad ya que personas con predominancia de anticuerpos IgG4 parecen ser más susceptibles a la infección, lo que coincide con nuestros hallazgos.

Se observó una correlación moderada entre los títulos de IgA e IgG (H+L) en pacientes leves, mientras que para los demás anticuerpos la correlación fue débil y negativa. Esto contrasta con lo reportado por Patil et al. (2021) donde encontraron una correlación más fuerte entre los anticuerpos IgA e IgG (H+L) ($r=0.6390$, $p<0.0001$) en pacientes con enfermedad leve. Una correlación débil negativa de IgM e IgA en sangre puede deberse a una suficiente protección conferida por la IgA en mucosas obviando la necesidad de desarrollar otros tipos de anticuerpos séricos (Kaduskar et al., 2022b), ya que la IgA de las mucosas impide la unión y entrada del virus a las células previniendo su diseminación sistémica (Reinholdt & Husby, 2013).

Para el género no se estableció ninguna diferencia significativa, esto se encuentra en línea con los resultados de Huang et al. (2021) donde demostraron que los niveles de IgG (H+L) eran similares en hombres y mujeres. Sin embargo, en el estudio de Klein et al. (2020) asociaron niveles altos de IgG (H+L) dirigidos contra la proteína S con el sexo masculino.

Los estudios de Cervia et al. (2022) demostraron que los niveles de IgM se correlacionaron negativamente con la edad, es decir a mayor edad menores niveles de IgM, esto contrasta con nuestro estudio donde encontramos una mediana menor en los mayores de 61 años en comparación a los otros grupos. En el estudio de Yang, et al. (2021) los niveles de IgG (H+L) no mostraron diferencia significativa entre grupos de edad de 19 a 24 años y de 25 a 30 años, pero si mostraron una mediana significativamente menor en el grupo de pacientes de 51-80 años.

En conclusión, se determinó que los niveles de anticuerpos contra la proteína N en sangre se correlacionaron significativamente con la gravedad de la infección por COVID-19, además, se establecieron niveles altos de IgA e IgG (H+L) en pacientes con infección grave y bajos niveles de IgM en pacientes de mayor edad, sin importar la gravedad de la enfermedad. Se recomienda realizar estudios

longitudinales para monitorear la respuesta inmune humoral contra la proteína N de SARS-CoV-2.

5. Conclusiones

- ✓ Se determinó asociación entre los niveles de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad por COVID-19, pacientes con enfermedad grave mostraron niveles más altos de anticuerpos en comparación con pacientes con enfermedad leve y moderada, o pacientes enfermos durante la predominancia de la variante ómicron.
- ✓ No se encontró asociación entre los niveles de anticuerpos y el sexo.
- ✓ Solo se encontró asociación entre los niveles de anticuerpos y la edad para IgM.

6. Recomendaciones

- ✓ Realizar estudios longitudinales para monitorear la respuesta inmune humoral contra la proteína N de SARS-CoV-2 y tiempo de permanencia de estos anticuerpos en pacientes con COVID-19.
- ✓ Evaluar en un futuro en qué medida las comorbilidades afectan la respuesta humoral contra el SARS-CoV-2.

7. Bibliografía

- Benabdessalem, C., Marzouki, S., Hamouda, W. Ben, Trabelsi, K., Boumaiza, M., Hamouda, S. Ben, Ouni, R., Bchiri, S., Chaaban, A., Gdoura, M., Gorgi, Y., Sfar, I., Yalaoui, S., Khelil, J. Ben, Hamzaoui, A., Abdallah, M., Cherif, Y., Petres, S., Ka, C., ... Ahmed, M. Ben. (n.d.). *COVID-19 in Tunisia (North Africa): IgG and IgG subclass antibody responses to SARS-CoV-2 according to disease severity*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.01.22271696>
- Carnicelli, A., Fiori, B., Ricci, R., Piano, A., Bonadia, N., Taddei, E., Fantoni, M., Murri, R., Cingolani, A., Christian Barillaro, -, Salvatore, -, Cutuli, L., Marchesini, D., Antonio, D., Polla, D., Forte, E., Fuorlo, M., Luca, -, Maurizio, D., ... Sanguinetti, M. (2022). Characteristic of IgA and IgG antibody response to

- SARS-CoV-2 infection in an Italian referral COVID-19 Hospital. *Internal and Emergency Medicine*, 17, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s11739-021-02750-8>
- Casella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Updated March 20, 2023. Retrieved June 7, 2023, from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
- Cervia, C., Zurbuchen, Y., Taeschler, P., Ballouz, T., Menges, D., Hasler, S., Adamo, S., Raeber, M. E., Bächli, E., Rudiger, A., Stüssi-Helbling, M., Huber, L. C., Nilsson, J., Held, U., Puhan, M. A., & Boyman, O. (2022). Immunoglobulin signature predicts risk of post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Communications* (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-27797-1>
- Cervia, C., Nilsson, J., Zurbuchen, Y., Valaperti, A., Schreiner, J., Wolfensberger, A., Raeber, M. E., Adamo, S., Weigang, S., Emmenegger, M., Hasler, S., Bosshard, P. P., de Cecco, E., Bächli, E., Rudiger, A., Stüssi-Helbling, M., Huber, L. C., Zinkernagel, A. S., Schaer, D. J., ... Boyman, O. (2021). Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(2), 545-557.e9. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.10.040>
- Chakraborty, S., Gonzalez, J., Edwards, K., Mallajosyula, V., Buzzanco, A. S., Sherwood, R., Buffone, C., Kathale, N., Providenza, S., Xie, M. M., Andrews, J. R., Blish, C. A., Singh, U., Dugan, H., Wilson, P. C., Pham, T. D., Boyd, S. D., Nadeau, K. C., Pinsky, B. A., ... Wang, T. T. (2021). Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nature Immunology*, 22(1), 67–73. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00828-7>
- Chu, H., & Yuen, K. (2022). Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron. *Clinical and Translational Medicine*, 12(5). <https://doi.org/10.1002/CTM2.880>
- Della-Torre, E., Lanzillotta, M., Strollo, M., Ramirez, G. A., Dagna, L., & Tresoldi, M. (2021). Serum IgG4 level predicts COVID-19 related mortality. *European*

Journal of Internal Medicine, 93, 107–109.
<https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2021.09.012>

Imai, K., Kitagawa, Y., Sakiko Tabata, |, Katsumi Kubota, |, Nagura-Ikeda, M., Matsuoka, M., Miyoshi, K., Sakai, J., Ishibashi, N., Tarumoto, N., Takeuchi, S., Ito, T., Maesaki, S., Tamura, K., & Maeda, T. (2021). Antibody response patterns in COVID-19 patients with different levels of disease severity in Japan. *J Med Virol*, 93, 3211–3218. <https://doi.org/10.1002/jmv.26899>

Kaduskar, O., Gurav, Y. K., Deshpande, K., Desphande, G. R., Yadav, P., Rakhe, A., Tilekar, B. N., Gomade, P., Salunke, A., Patil, C., Dange, V., Salve, P., Patsute, S., Abraham, P., & Sapkal, G. N. (2022). Understanding the dynamics of IgM & IgG antibodies in COVID-19-positive patients. *The Indian Journal of Medical Research*, 155(5–6), 565. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_675_21

Klein, S. L., Pekosz, A., Park, H. S., Ursin, R. L., Shapiro, J. R., Benner, S. E., Littlefield, K., Kumar, S., Naik, H. M., Betenbaugh, M. J., Shrestha, R., Wu, A. A., Hughes, R. M., Burgess, I., Caturegli, P., Laeyendecker, O., Quinn, T. C., Sullivan, D., Shoham, S., ... Tobian, A. A. R. (2020). Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(11), 6141. <https://doi.org/10.1172/JCI142004>

Ko, J. Y., Danielson, M. L., Town, M., Derado, G., Greenlund, K. J., Kirley, P. D., Alden, N. B., Yousey-Hindes, K., Anderson, E. J., Ryan, P. A., Kim, S., Lynfield, R., Torres, S. M., Barney, G. R., Bennett, N. M., Sutton, M., Talbot, H. K., Hill, M., Hall, A. J., ... George, A. (2021). Risk Factors for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Associated Hospitalization: COVID-19-Associated Hospitalization Surveillance Network and Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(11), E695–E703. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1419>

Korobova, Z. R., Zueva, E. v., Arsentieva, N. A., Batsunov, O. K., Liubimova, N. E., Khamitova, I. v., Kuznetsova, R. N., Rubinstein, A. A., Savin, T. v., Stanevich, O. v., Kulikov, A. N., Pevtsov, D. E., & Totolian, A. A. (2022). Changes in Anti-

- SARS-CoV-2 IgG Subclasses over Time and in Association with Disease Severity. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/V14050941>
- Liu, S., & Lu, S. (2020). Antibody responses in COVID-19 patients. *Journal of Biomedical Research*, 34(6), 410. <https://doi.org/10.7555/JBR.34.20200134>
- Luo, H., Jia, T., Chen, J., Zeng, S., Qiu, Z., Wu, S., Li, X., Lei, Y., Wang, X., Wu, W., Zhang, R., Zou, X., Feng, T., Ding, R., Zhang, Y., Chen, Y. Q., Sun, C., Wang, T., Fang, S., & Shu, Y. (2021). The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 12, 460. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632814/BIBTEX>
- Mata, L. de C., Piñero, J., Vaquero, S. T., Tachó-Piñot, R., Kuksin, M., Aldea, I. A., Melero, N. R., Carolis, C., Furlong, L., Cerutti, A., Villar-García, J., & Magri, G. (2020). SARS-CoV-2-Specific Antibody Profiles Distinguish Patients with Moderate from Severe COVID-19. *MedRxiv*, 2020.12.18.20248461. <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.20248461>
- Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I. A. T. M., Goonawardane, N., Saito, A., Kimura, I., Yamasoba, D., Gerber, P. P., Fatihi, S., Rathore, S., Zepeda, S. K., Papa, G., Kemp, S. A., Ikeda, T., Toyoda, M., Tan, T. S., Kuramochi, J., Mitsunaga, S., Ueno, T., ... Gupta, R. K. (2022). Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature* 2022 603:7902 (7902), 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>
- Moura, A. D., da Costa, H. H. M., Correa, V. A., Ana, A. K., Lindoso, J. A. L., De Gaspari, E., Hong, M. A., Cunha-Junior, J. P., & Prudencio, C. R. (2021). Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95045-z>
- National Institutes of Health (n.d.). Clinical Spectrum | COVID-19 Treatment Guidelines. (n.d.). Retrieved May 2, 2022, from <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
- Ranjbar, M., Asadi, M., Nourigorji, M., Sarkari, B., Mostafavi-Pour, Z., Zomorodian, K., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., Maleksabet, A., Moghadami, M., & Savardashtaki, A. (2022). Development of a recombinant nucleocapsid protein-

- based ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, October 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1002/bab.2308>
- Reinholdt, J., & Husby, S. (2013). IgA and Mucosal Homeostasis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6628>
- Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claër, L., Quentric, P., Fadlallah, J., Devilliers, H., Ghillani, P., Gunn, C., Hockett, R., Mudumba, S., Guihot, A., Luyt, C. E., Mayaux, J., Beurton, A., Fourati, S., Bruel, T., ... Gorochov, G. (2021). IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Science Translational Medicine*, 13(577), 2223. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABD2223/SUPPL_FILE/ABD2223_S_M.PDF
- World Health Organization. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 18 May 2023. (n.d.). Retrieved May 21, 2023, from <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---18-may-2023>
- Yang, H. S., Costa, V., Racine-Brzostek, S. E., Acker, K. P., Yee, J., Chen, Z., Karbaschi, M., Zuk, R., Rand, S., Sukhu, A., Klasse, P. J., Cushing, M. M., Chadburn, A., & Zhao, Z. (2021). Association of Age with SARS-CoV-2 Antibody Response. *JAMA Network Open*, 4(3), 1–12. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.4302>
- Yates, J. L., Ehrbar, D. J., Hunt, D. T., Girardin, R. C., Dupuis, A. P., Payne, A. F., Sowizral, M., Varney, S., Kulas, K. E., Demarest, V. L., Howard, K. M., Carson, K., Hales, M., Ejemel, M., Li, Q., Wang, Y., Peredo-Wende, R., Ramani, A., Singh, G., ... Lee, W. T. (2021). Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. *Cell Reports Medicine*, 2(7). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100329>
- Yongchen, Z., Shen, H., Wang, X., Shi, X., Li, Y., Yan, J., Chen, Y., & Gu, B. (2020). Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 833. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756699>

Discusión general

La primera parte del estudio demostró que utilizar la tecnología de producción de proteínas recombinantes mediante bacterias como la *E.coli*, BL 21 Star (DE3), resulta ser un sistema bastante eficiente y tiene la ventaja de que se cuenta con un sinnúmero de protocolos (Rossano & Ceccarelli, 2014). La proteína N purificada se obtuvo a partir de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), sin embargo, se pudo observar que esta proteína forma cuerpos de inclusión no clásicos, pudiéndose extraer en los lavados en condiciones poco desnaturizantes. Los cuerpos de inclusión no clásicos han sido reportados también por Jevševar et al. (2005) y plantean una ventaja respecto a los cuerpos de inclusión clásicos, en cuanto a que se pueden obviar pasos como la desnaturización y renaturalización de la proteína, además de que se reportan mayores rendimientos de proteína funcional con la formación de estos cuerpos de inclusión no clásicos. Para evitar la agregación de la proteína, se redujo la concentración de ésta antes de dializarla utilizando una dilución 1:2. Algunos autores como Chura-Chambi et al. (2022) y Das & Suresh (2006) recomiendan diluir la proteína aún más, por debajo de 100 µg/ml para evitar la agregación y tener una proteína funcional.

El rendimiento de la proteína producida en el presente estudio fue similar a lo reportado por otros investigadores como Li et al. (2021) (50 mg/L), donde utilizaron condiciones desnaturizantes con urea (8M), aunque produjeron su proteína con el plásmido pET28a y utilizaron una resina catiónica débil para la purificación, reportando una mejor afinidad de unión a la proteína N en comparación a la resina Ni-NTA. Entre las principales diferencias de este plásmido están en que el plásmido pET 28a posee un gen de resistencia a la kanamicina, mientras que el plásmido pET 24a cuenta con un gen que confiere resistencia a la ampicilina. En el caso del pET 24a, posee un sistema de fusión de polihistidina C-terminal, mientras que el plásmido pET 28a ofrece un sistema de fusión de etiqueta His N-terminal junto con un sitio de escisión de trombina, lo cual permite la eliminación opcional de la etiqueta luego de la purificación. Además, es importante mencionar que se ha documentado aumentos del doble del rendimiento con el plásmido pET28a en

comparación con pET24a. En última instancia, la elección del plásmido dependerá de las necesidades y preferencias del investigador (Shilling et al., 2020).

Otros estudios como el de Chura-Chambie et al. (2022) reportaron un rendimiento mayor al de este estudio (370 mg/L de cultivo bacteriano inicial) utilizando condiciones no desnaturalizantes y evitando así el proceso de purificación y diálisis. Con la proteína producida en este estudio es posible analizar aproximadamente 9600 sueros utilizando 1 µg de proteína por pocillo.

En el presente estudio se estandarizaron inmunoensayos para la detección de anticuerpos tipo IgG (H+L), IgM, IgA, IgG1 e IgG4 contra la proteína N de SARS-CoV-2. Al estandarizar el ELISA se decidió utilizar el PBS ya que mostró mejor rendimiento para la adsorción de la proteína, aunque se probó también un buffer de carbonatos (pH 9,6). La literatura recomienda que durante la estandarización de un ELISA se prueben tampones con pH entre 7,0 y 10,0, ya que se debe encontrar el pH apropiado para la proteína a adsorber a la placa y este puede variar ampliamente. Otro punto importante es encontrar la concentración correcta del antígeno a adsorber, por lo que se deben probar diferentes concentraciones (0,5 a 10,0 µg/mL) (Jordan, 2009). Otros autores han probado concentraciones de 12 µg/mL (Rokni et al., 2010) y de hasta 40 µg/mL (ProSci Incorporated, s/f), sin embargo, la mayor parte de la literatura informa que 10 µg/ml es una concentración de recubrimiento óptima y es la que se utilizó en este estudio. La concentración que utilizamos en este ensayo fue más alta que la utilizada por Ranjbar et al. (2022), donde utilizaron 100 µl por pocillo a una concentración de proteína N de 5µg/ml, sin embargo, utilizaron una concentración de suero mayor (1:100) y en nuestro caso la que mejor nos resultó fue la dilución del suero de 1:400.

No se logró estandarizar los inmunoensayos para la detección de anticuerpos tipo IgG2 e IgG3, debido a algunas limitaciones como la carencia de controles positivos para estas subclases. Por otra parte, en el estudio de Korobova et al., (2022) probaron diluciones del suero más concentradas para IgG2 e IgG3 (1:25), mientras que para IgG1 e IgG4 utilizaron una dilución de 1:100, esto también podría explicar porque no se pudieron estandarizar.

Hasta la fecha, se han propuesto varios criterios, principalmente basados en análisis ROC para seleccionar el punto de corte más adecuado. En algunos casos, la sensibilidad es más importante que la especificidad, sin embargo, el punto requiere un balance entre las dos. Un enfoque razonable es aumentar ambos exponentes, aunque algunos investigadores prefieren un método sobre el otro (Habibzadeh et al., 2016). En este caso para determinar la exactitud de las pruebas de ELISA, se optó por el análisis de la curva ROC, el cual mostró un área bajo la curva (AUC) muy bueno para los inmunoensayos de IgG (H+L) (91,3), IgA (90,9), IgM (88,3) e IgG1 (88,2), lo que indica que estos son bastante eficientes a la hora de establecer pacientes con y sin anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2. Ensayos con intervalo de AUC entre 0.75 y 0.90 se consideran buenos y entre 0.90 y 0.97 muy buenos (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

Nuestros resultados muestran que la RVP+ de los ensayos tiene un alto valor diagnóstico, y que la probabilidad de que un paciente con infección por SARS-CoV-2 de positivo en la prueba es muy alta. Por otra parte, la RVP- de nuestro ensayo se compara con un metaanálisis realizado por Xie et al. (2022) donde reportaron RVP- de 0.24 para las pruebas de antígeno para SARS-CoV-2. Según la literatura cuanto mayor sea el valor de RVP + mejor será la capacidad para distinguir individuos con la enfermedad y cuanto menor sea el RVP- más fuerte la relación entre un resultado negativo en la prueba y la ausencia de la enfermedad (Ferreira & Patino, 2018).

El aumento de la sensibilidad de las pruebas con el grupo de SARS-CoV-2 RT-qPCR positivos con menos de 15 días de evolución de la enfermedad concuerda con los encontrados por Nakano et al. (2021), que establecieron un 100% de sensibilidad de su prueba (SARS-CoV-2 IgG (H+L)), cuando analizaron muestras de pacientes con 15 días de haber iniciado con los síntomas. Las sensibilidades y especificidades de los inmunoensayos estandarizados para la detección de anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2 son satisfactorias en comparación con reportes previos. Un estudio realizado por Liu et al. (2020) basado en la proteína N recombinante y analizando 214 muestras reportó una sensibilidad de 70,1% y 68,2% para IgG (H+L) e IgM respectivamente, valores debajo de los obtenidos en

el presente trabajo (81,3% y 83,3%), además, establecieron tasas positivas para IgG (H+L) e IgM de aproximadamente 30% a 52% en los grupos de 0 a 5 días y de 6 a 10 días de inicio de síntomas, todos valores inferiores a los encontrados en nuestro estudio. En línea con nuestro trabajo Ranjbar et al. (2022) implementaron un ELISA basado en la proteína N y analizando 67 sueros positivos obtuvieron una sensibilidad de 91,0% y 92,5% y una especificidad del 98,2 % y 97,3 % para los inmunoensayos IgG (H+L) e IgM, respectivamente. Además, encontraron un aumento de la sensibilidad del ELISA IgG (H+L) en el grupo de pacientes de 0-7 días desde el inicio de síntomas, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio. En el estudio de Li et al., (2021) reportaron tasas positivas de 69,0% y 72,4% para su ELISA casero IgM e IgG (H+L) respectivamente, dichos valores están por debajo de los nuestros. Para IgM encontramos un aumento de la tasa positiva en el grupo de 16-25 días con respecto al grupo de <15 días desde la evolución de la enfermedad Kaduskar et al. (2022a) encontraron que el anticuerpo IgM alcanzó su punto máximo alrededor del día 35 después de inicio de síntomas y disminuyó rápidamente para volver aparecer a los 90 días, esto resalta que el anticuerpo IgM puede ser poco confiable para el diagnóstico de casos activos.

La mayoría de los estudios sobre SARS-CoV-2 reportan datos de acuerdo con los días después de inicio de síntomas, sin embargo, en nuestro trabajo reportamos de acuerdo con los días de evolución de la enfermedad. Al realizar una comparación agrupando los datos de acuerdo con los días de inicio de síntomas y los días de evolución de la enfermedad no se determinó diferencias significativas en las tasas positivas o los valores de sensibilidad y especificidad entre los dos grupos (datos no mostrados).

El anticuerpo IgG1 se encontró en 84,8% de los pacientes e IgG4 se detectó en 12 pacientes solamente, estos resultados concuerdan con los encontrados en otros estudios como los de (Benabdessalem et al., 2022) y (Luo et al., 2021), en donde observaron que en las respuestas de subtipos de IgG (H+L) dominaban las de tipo IgG1 y rara vez IgG4. En infecciones virales, especialmente en SARS-CoV-2 las principales subclases de IgG (H+L) reportadas son IgG1 e IgG3, los cuales se sabe tienen actividad antiviral Benabdessalem et al. (2022).

En la segunda parte del estudio se demostró que los pacientes graves mostraron niveles significativamente más altos de anticuerpos tipo IgG (H+L), IgA e IgG1 en comparación al grupo de pacientes leves, lo que es consistente con diversos reportes como el de Chakraborty et al. (2021) y Benabdessalem et al. (2022), donde encontraron títulos más altos de IgG(H+L) e IgG1 en pacientes con enfermedad grave de COVID-19 en comparación con pacientes con enfermedad leve. En el estudio de Zervou et al. (2021) determinaron títulos más altos de IgA en pacientes con enfermedad grave. Así mismo, Sterlin et al. (2021) reportaron sobre todo una respuesta inmune humoral de tipo IgA en sangre de pacientes con COVID19, mientras que Zervou et al. (2021) demostraron en su estudio que los niveles de IgA se correlacionaban estadísticamente con la enfermedad grave. Debido a que las mucosas son el sitio de entrada del virus, explicaría una mayor activación de esta inmunoglobulina. Además, en el estudio de Cervia et al. (2021) observaron títulos totales de IgA e IgG para la proteína S en las muestras de suero comparables con los títulos en muestras de lágrimas, fluido nasal y saliva.

También existen numerosos estudios que han demostrado la existencia de una correlación entre la gravedad de la enfermedad y la intensidad de la respuesta humoral. Es bien sabido que los niveles más altos de citoquinas inflamatorias están asociados con una enfermedad más grave, y se ha sugerido un vínculo entre la respuesta inmunitaria y el daño orgánico. Las respuestas inmunitarias del huésped pueden estar asociadas con una activación inmunitaria excesiva y daños en los órganos (Carnicelli et al., 2022). En los pacientes en estado crítico hay un aumento de la carga viral lo cual aumenta la secreción de citoquinas, lo que lleva a un aumento en la presentación de antígenos y las respuestas humorales (Yates et al., 2021; Imai et al., 2021). Mientras que respuestas de anticuerpos más bajas en los pacientes con enfermedad leve pueden reflejar cargas de antígenos virales más bajas (Benabdessalem et al., 2022).

En los sueros de pacientes que enfermaron durante la dominancia de la variante ómicron el anticuerpo detectado en altos niveles fue IgG (H+L), pero no en niveles tan altos como de los que enfermaron en forma grave al inicio de la pandemia. Esto puede deberse a que en la variante ómicron se presenta una

utilización ineficiente de la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), la cual es la encargada de mediar el ingreso del virus a las células pulmonares, dando como resultado una replicación viral atenuada y una patogenicidad muy reducida, lo que explicaría los niveles de anticuerpos más bajos (Chu & Yuen, 2022).

La IgG4 se observó en mayor proporción en enfermos graves de la primera variante y graves durante la ola de Ómicron. Estos datos son similares a los encontrados por Moura y colaboradores (2021), donde también encontraron la subclase IgG4 con mayor frecuencia en pacientes graves, aunque no especificaron la variante. Algunos autores, como Della-Torre et al. (2021) señalan que niveles detectables de IgG4 pueden predecir a un mal pronóstico de la enfermedad ya que personas con predominancia de anticuerpos IgG4 parecen ser más susceptibles a la infección, lo que coincide con nuestros hallazgos.

Se observó una correlación moderada entre los títulos de IgA e IgG (H+L) en pacientes leves, para los demás anticuerpos la correlación fue débil y negativa. Esto contrasta con lo reportado por (Patil et al., 2021) donde encontraron una correlación más fuerte entre los anticuerpos IgA e IgG (H+L) ($r=0.6390$, $p<0.0001$) en los pacientes leves. Una correlación débil negativa de IgM e IgA en sangre puede deberse a la suficiente protección conferida por la IgA en mucosas obviando la necesidad de desarrollar otros tipos de anticuerpos séricos (Kaduskar et al., 2022b), ya que la IgA de las mucosas impide la unión y entrada de microbios y antígenos moleculares, previniendo sus efectos potenciales a nivel sistémico (Reinholdt & Husby, 2013).

Para el género no se estableció ninguna diferencia significativa, esto se encuentra en línea con los resultados de Huang et al. (2021) donde demostraron que los niveles de IgG (H+L) eran similares entre hombres y mujeres en general. Sin embargo, en el estudio de Klein et al. (2020) asociaron niveles altos de IgG (H+L) dirigidos contra la proteína S con el sexo masculino. Los estudios de Cervia et al. (2022) demostraron que los niveles de IgM se correlacionaron negativamente con la edad, es decir a mayor edad menores niveles de IgM, esto contrasta con nuestro estudio donde encontramos una mediana menor en los mayores de 61 años en comparación a los otros grupos. En el estudio de Yang, et al. (2021) los niveles

de IgG (H+L) no mostraron diferencia significativa entre grupos de edad de 19 a 24 años y de 25 a 30 años, pero si mostraron una mediana significativamente menor en el grupo de pacientes de 51-80 años.

La producción del antígeno recombinante N de SARS-CoV-2 y la estandarización de los ensayos inmunoenzimáticos permitirá obtener información epidemiológica relevante, relacionada con infecciones naturales en la población, medir los niveles y la duración de anticuerpos postexposición, monitorear prevalencias e incidencias, y calcular la proporción de infecciones asintomáticas en la población. Sobre todo, permitiría a países en vías de desarrollo producir sus propios ensayos en forma rápida y de bajo costo, tanto para tiempos de pandemia o para diagnóstico de rutina o de investigación. Una limitación en este estudio fue que las muestras de sueros prepanémicas no fueron analizadas para detectar anticuerpos contra otros coronavirus y así evitar posibles reacciones cruzadas.

Conclusiones generales

- ✓ La proteína N fue expresada y purificada exitosamente.
- ✓ Se logro estandarizar técnicas inmunoenzimáticas sensibles y específicas que detectan anticuerpos tipo IgG(H+L), IgM, IgGA, IgG1 e IgG4 contra la proteína N de SARS-CoV-2.
- ✓ . Se determinó mayor sensibilidad de los inmunoensayos estandarizados en el grupo de pacientes <15 días de evolución de la enfermedad con respecto a los grupos de 16-25 y de >25 días, excepto para el ELISA IgM.
- ✓ Se determinó un aumento significativo de la media de los valores UE para IgG (H+L), IgA e IgG1 para el grupo de menos de 15 días de evolución de la enfermedad, mientras que para el ELISA IgM se determinó un aumento de los valores UE en el grupo de 16-25 dias de evolución de la enfermedad.
- ✓ Anticuerpos de tipo IgG4 se detectaron solamente en 12/204 muestras.
- ✓ Se determinó asociación entre los niveles de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad por COVID-19, pacientes con enfermedad grave mostraron los niveles más altos de anticuerpos en comparación con los pacientes con enfermedad leve y moderada, o pacientes enfermos durante la predominancia de la variante ómicron.

- ✓ No se encontró asociación entre los niveles de anticuerpos y el sexo.
- ✓ Solo se encontró asociación entre los niveles de anticuerpos y la edad para IgM.

Recomendaciones generales

- ✓ Implementar métodos de purificación de la proteína N con menor nivel de agente desnaturizante o bajo condiciones no desnaturizantes, con el fin de ahorrar tiempo, evitar pérdidas y utilizar una alternativa más amigable con el medio ambiente.
- ✓ Producir la proteína S recombinante de SARS-CoV-2 para utilizarla en inmunoensayos para medir la respuesta protectora.
- ✓ Realizar estudios longitudinales para monitorear la respuesta inmune humoral contra la proteína N de SARS-CoV-2 y tiempo de permanencia de estos anticuerpos en pacientes con COVID-19.
- ✓ Evaluar en un futuro en qué medida las comorbilidades afectan la respuesta humoral contra el SARS-CoV-2.

Anexos

Anexo 1. Secuencia en formato Fasta de la proteína N recombinante expresada en células *E. coli* BL21 Star(DE3).

pET-24a(+) - SARS-CoV-2-N-C-terminal-His:

```
MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASW  
FTALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSP  
RWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQL  
PQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGN  
GGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATK  
AYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRI  
GMEVTPSGTWLTYTGAIKLDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKA  
DETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQALEHHHHHH
```