

Evaluación del desempeño analítico de dos ensayos inmunológicos de diferente configuración para la detección de anticuerpos anti SARS-CoV-2

Alumna: Bioq. Laura Gutiérrez
Instructora: Bioq. Esp. María Gabriela Barbás



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



UNC

Diciembre 2019

- Se reportan los primeros casos de neumonía atípica en Wuhan.

Enero 2020

- Autoridades de China confirman que han identificado un nuevo virus, denominado inicialmente 2019-nCoV.
- Se multiplican los casos en China y se reportan otros en Tailandia, Japón, Corea del Sur, Francia, Estados Unidos.
- La OMS declara la emergencia internacional de salud pública.

9.927 casos





Novel 2019 coronavirus genome

SARS-CoV-2 coronavirus



edward_holmes

6 Jan '20

10th January 2020

This posting is communicated by Edward C. Holmes, University of Sydney on behalf of the consortium led by Professor Yong-Zhen Zhang, Fudan University, Shanghai

The Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health, in collaboration with the Central Hospital of Wuhan, Huazhong University of Science and Technology, the Wuhan Center for Disease Control and Prevention, the National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control, and the University of Sydney, Sydney, Australia is releasing a coronavirus genome from a case of a respiratory disease from the Wuhan outbreak. The sequence has also been deposited on GenBank ([accession MN908947](#) 32.3k) and will be released as soon as possible.

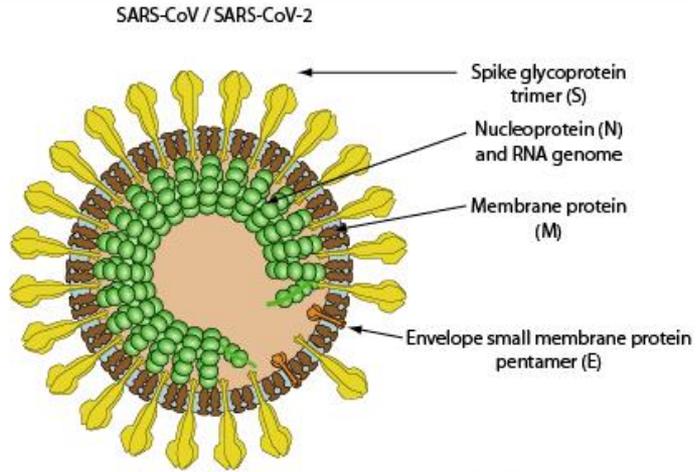
Update: [This genome is now available on GenBank and an updated version has been posted](#) 32.3k.

Disclaimer:

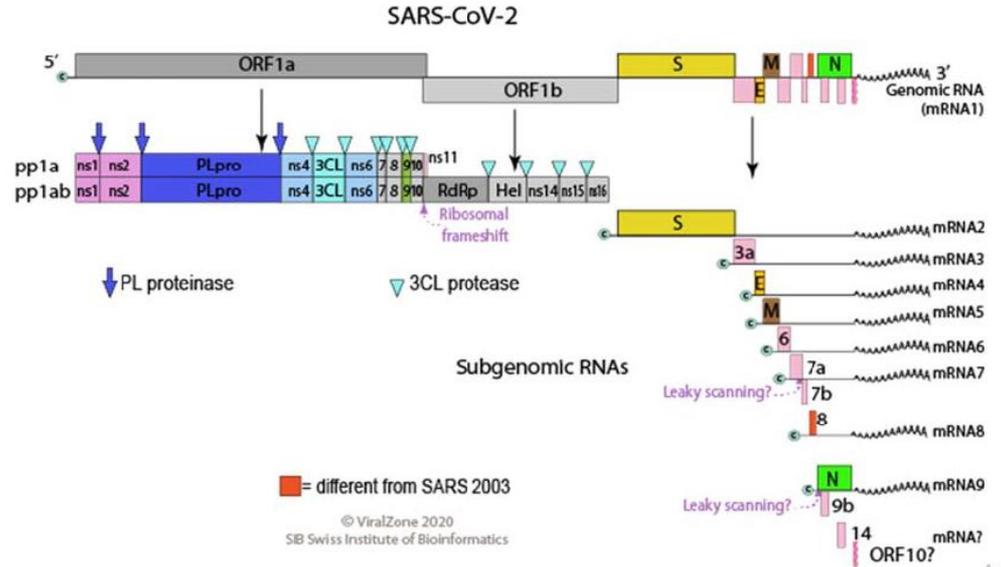
Please feel free to download, share, use, and analyze this data. We ask that you communicate with us if you wish to publish results that use these data in a journal. If you have any other questions –then please also contact us directly.

Professor Yong-Zhen Zhang,
Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health,
Fudan University,
Shanghai, China.

SARS-CoV-2



© ViralZone 2020
SIB Swiss Institute of Bioinformatics



Febrero 2020

- La OMS define a la enfermedad por coronavirus como COVID-19.
- Muere de COVID-19 el Dr. Li Wenliang, el primero en advertir sobre una enfermedad "similar al SARS".

86.013 casos

Marzo 2020

- La OMS declara que el brote por el nuevo coronavirus es una pandemia.
- Se detecta el primer caso en Argentina.
- El gobierno nacional decreta el Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio

875.739 casos

Abril 2020

- China reabre Wuhan, después de 76 días de bloqueo.
- Estados Unidos supera el millón de casos confirmados.
- Chile comienza a hablar de pasaportes de inmunidad.

3.279.073 casos



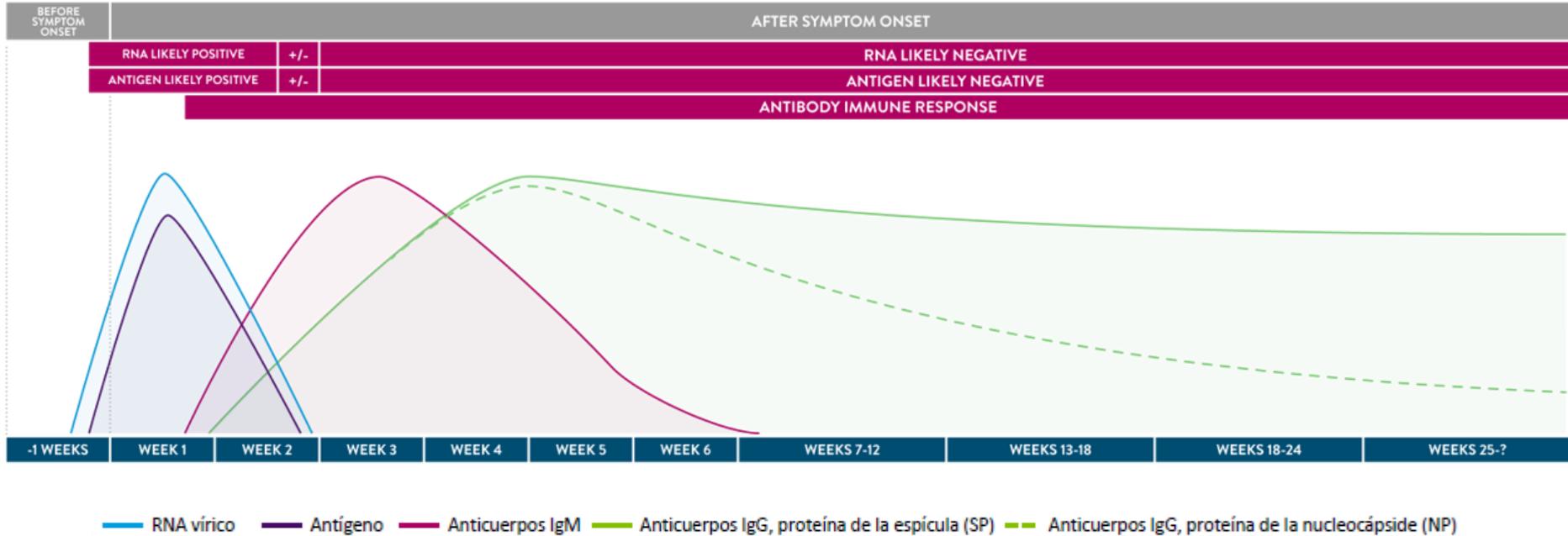
Mayo 2020

- Líderes mundiales se comprometen a destinar un presupuesto de USD 8.000 millones para el desarrollo de kits diagnósticos, tratamientos y vacunas contra el SARS-CoV-2.
- Investigadores argentinos del CONICET y la Fundación Instituto Leloir logran desarrollar el primer test serológico del país.
- En Córdoba, se realiza el primer testeo combinando hisopados (RT-PCR) y test rápidos serológicos.

6.187.617 casos



Historia natural de la infección por SARS-CoV-2



Pruebas de laboratorio para detección de SARS-CoV-2

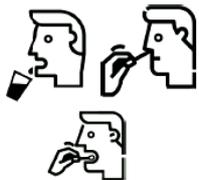
MÉTODOS DIRECTOS

RT-PCR: amplificación de ácidos nucleicos virales

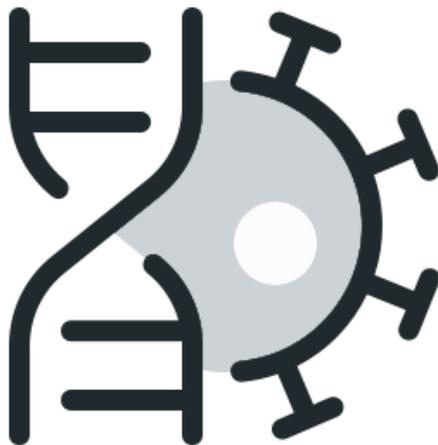
Alta sensibilidad y especificidad



Muestras nasales,
orofaríngeas, saliva



Resultados en 3-4 hs.



Personal capacitado,
infraestructura de bioseguridad
nivel II



Centralización del diagnóstico



Diagnóstico sujeto a la definición
de caso sospechoso.

Pruebas de laboratorio para detección de SARS-CoV-2

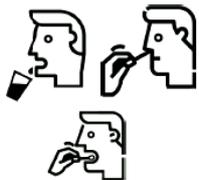
MÉTODOS DIRECTOS

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

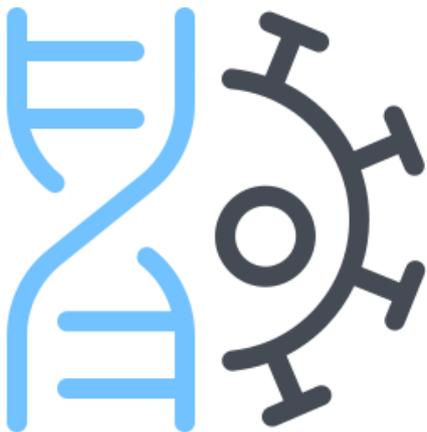
Sensibilidad y especificidad aceptables



Muestras nasales, orofaríngeas, saliva



Resultados en 1 hs.



Personal capacitado, infraestructura de bioseguridad nivel II



Ampliación diagnóstica



Diagnóstico sujeto a la definición de caso sospechoso en áreas de alta prevalencia.

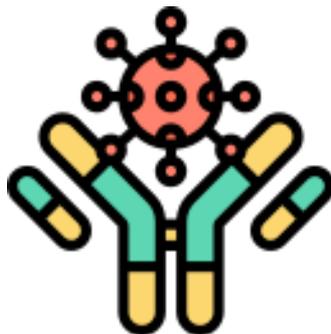
Pruebas de laboratorio para detección de SARS-CoV-2

MÉTODOS INDIRECTOS

ELISA, QUIMIOLUMINISCENCIA, INMUNOCROMATOGRAFÍA: Detección cualitativa de anticuerpos anti SARS-Cov-2

Dirigidos contra proteína S, S-RBD y N. Indicativos de contacto previo pero no del momento en que ocurrió el contacto

Muestras de sangre entera, suero o plasma.



Complejidad variable de acuerdo a configuración.

Resultados en 15 min a 3 hs.



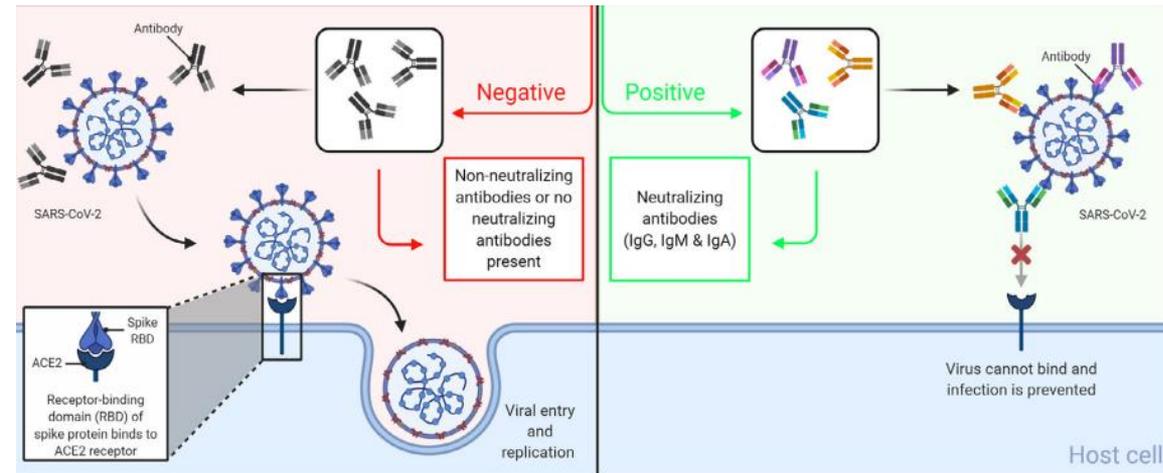
Baja sensibilidad en los primeros días de infección

Pruebas de laboratorio para detección de SARS-CoV-2

MÉTODOS INDIRECTOS

PRNT: Detección cuantitativa de Anticuerpos Neutralizantes

- Necesidad terapéutica: recomendación de la OMS de realizar la determinación de anticuerpos neutralizantes antes de transfundir plasma.
- Dirigidos contra la proteína S-RBD.
- Se demuestra la capacidad de los anticuerpos presentes en la muestra del paciente de inhibir la infección viral en un medio celular.

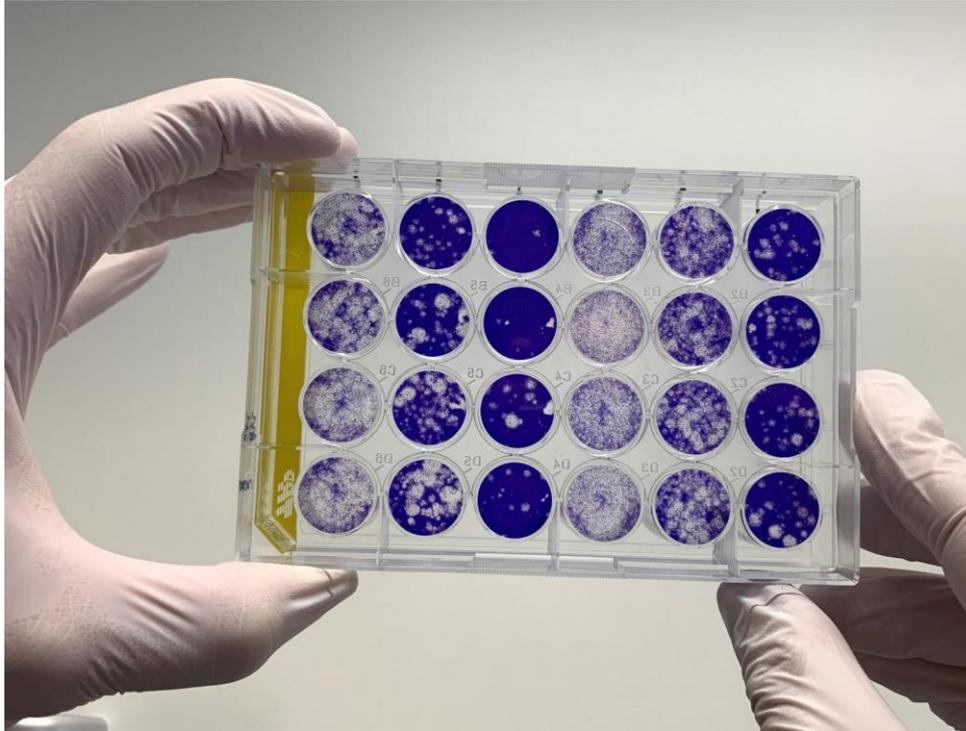


<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115294>

Pruebas de laboratorio para detección de SARS-CoV-2

MÉTODOS INDIRECTOS

PRNT: Detección cuantitativa de Anticuerpos Neutralizantes



- Laboriosa, personal altamente calificado, condiciones estrictas de bioseguridad.
- Diluciones seriadas de plasma + [virus] conocidas + células susceptibles.
- Establecimiento de punto de corte y observación de efecto citopático.
- Título de anticuerpos neutralizantes: última dilución en la que se observa preservación de la monocapa.
- Reservada para el estudio de plasma de potenciales donantes (no de rutina).

Usos recomendados de las pruebas de laboratorio para la detección de SARS-CoV-2

RT-PCR

- Confirmación diagnóstica en pacientes con sospecha clínica de infección;
- Alta de aislamiento en pacientes con formas graves de COVID-19.

LAMP

- Confirmación diagnóstica en pacientes considerados casos sospechosos en áreas de alta prevalencia y necesidad de incrementar el acceso a otras técnicas diagnósticas moleculares.

SEROLOGÍA

- Estudios de vigilancia poblacional;
- Identificación de donantes de plasma de convalecientes;
- Diagnóstico tardío o retrospectivo en situaciones definidas.

Estrategias de diagnóstico en el abordaje de la pandemia

PROPÓSITO

DESEMPEÑO ANALÍTICO

CONTEXTO CLÍNICO

CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO



ARTICLE IN PRESS

Te

an

ob

Kelv

Tak-

Publ

Report

Combined Antibody Emergence

Petra Mlcochova^{1, 2, 16},
Bo Meng^{1, 2}, Krishna
Ciazynska⁸, Xiaoli Xiong,
Surendra Parmar

[Show more](#) ▾

[+ Add to Mendeley](#)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.100099>

Under a Creative Commons



ELSEVIER

Journal of Virological Methods

Volume 283, September 2020, 113919



Combination of serological total antibody and RT-PCR test for detection of SARS-COV-2 infections

Pei Wang [✉](#)

[Show more](#) ▾

[+ Add to Mendeley](#)

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113919>

[Share](#)

[Cite](#)

[Get rights and content](#)

Objetivos

- Calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de dos ensayos inmunológicos de diferente configuración (CMIA y ELISA) para la detección de anticuerpos anti SARS-CoV-2.
 - Evaluar la concordancia analítica entre los diferentes ensayos.
-

Materiales y Métodos

- Estudio retrospectivo, descriptivo, observacional y anónimo no vinculante.
 - 1588 muestras de suero de individuos con infección confirmada (RT-PCR y/o PRNT).
 - Ensayos serológicos evaluados: SARS-CoV-2 IgG (Architect i System, Abbott Laboratories) y COVIDAR Test de ELISA IgG (Laboratorio Lemos S.R.L, CONICET, Fundación Instituto Leloir y UNSAM.)
-

SARS-CoV-2 IgG

Architect i System, Abbott Laboratories
x100 det
x500 det



Test principle*



Solid Phase
Recombinant autoantigen
coated to magnetic particles

+



Sample/calibrators/controls
Specific autoantibodies

Washing



+



Conjugate
DMAE labeled
monoclonal antibody

Washing



→

Activation



**Chemiluminescence
detection**

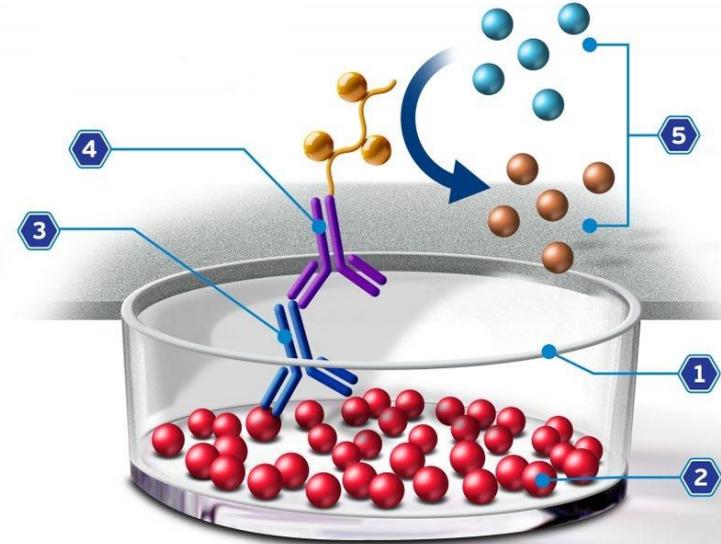
Antígeno SARS-CoV-2: Nucleocápside (N)

Interpretación de resultados: ≥ 1.4 POSITIVO

< 1.4 NEGATIVO

COVIDAR Test de ELISA IgG

Laboratorios LEMOS S.R.L
x96 det
x192 det



- 1 Placa sensibilizada,
- 2 Antígeno RBD de la proteína S del virus SARS-CoV-2,
- 3 Anticuerpos anti-SARS-CoV-2 isotipo IgG presentes en suero,
- 4 Anticuerpo anti-IgG humano acoplado a peroxidasa de rábano HRP,
- 5 Reacción cromogénica dada por el sustrato TMB.

COVIDAR Test de ELISA IgG



Antígeno SARS-CoV-2: Proteína S + RBD

Interpretación de resultados:

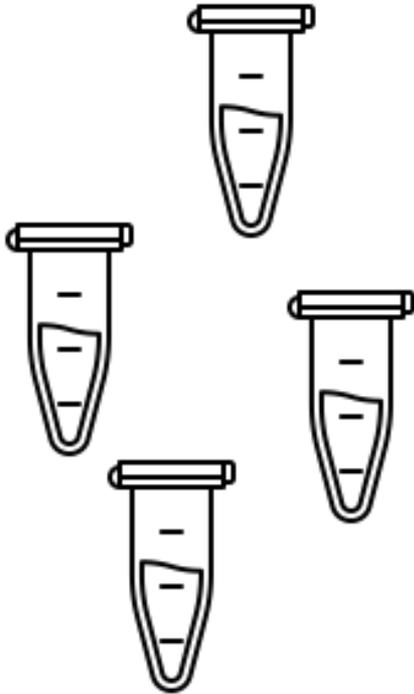
M DO 450nm > CO + 10% **REACTIVO**

M DO 450 nm < CO -10% **NO REACTIVO**

Evaluación de Especificidad

Panel de 50 muestras de suero (Pre-pandemia)

$$E(\%) = \frac{VN}{VN+FN} \times 100$$



INFECCIONES VIRALES



- VIH
- Hepatitis A
- Hepatitis B
- Hepatitis C
- Citomegalovirus
- Epstein Barr
- Dengue
- Influenza A
- Influenza B

INFECCIONES BACTERIANAS



- Mycoplasma pneumoniae
- Chlamydia pneumoniae
- Treponema pallidum

Evaluación de Sensibilidad

Con intervalo de confianza del 95% (IC95) y prueba de Chi Cuadrado de Pearson ($p < 0,05$).

$$S(\%) = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

- Global;
- Estratificada según días de evolución, tomando los resultados de los pacientes que habían reportado algún síntoma relacionado a la COVID-19:
 - 0-14 días de evolución;
 - 15-21 días de evolución;
 - >21 días de evolución.

Cálculo de Valores Predictivos

Valor Predictivo Positivo

$$\text{VPP}(\%) = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

Valor Predictivo Negativo

$$\text{VPN}(\%) = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

Concordancia entre ensayos

- Concordancia Porcentual: Porcentaje de coincidencia entre resultados.

- Coeficiente Kappa de Cohen (k): medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada.

0,00 - 0,20	LEVE
0,21 - 0,40	REGULAR
0,41 - 0,60	MODERADA
0,61 - 0,80	CONSIDERABLE
0,81 - 1,00	EXCELENTE

Resultados

CMIA

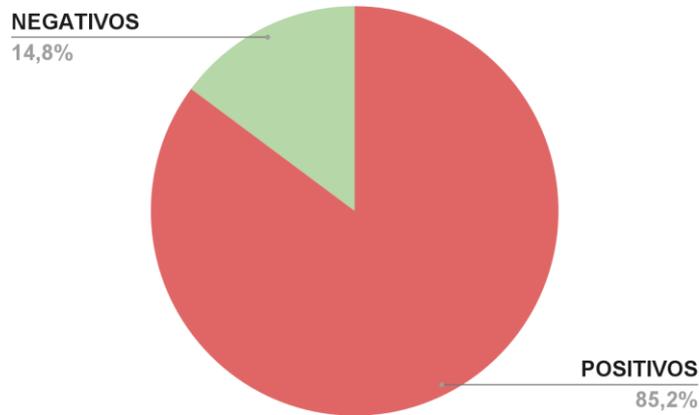
ELISA

- Sensibilidad
 - Global
 - Estratificada (dde)
 - Especificidad
 - VPP y VPP
 - Concordancia inter-ensayos
-

SARS-CoV-2 IgG (CMIA)



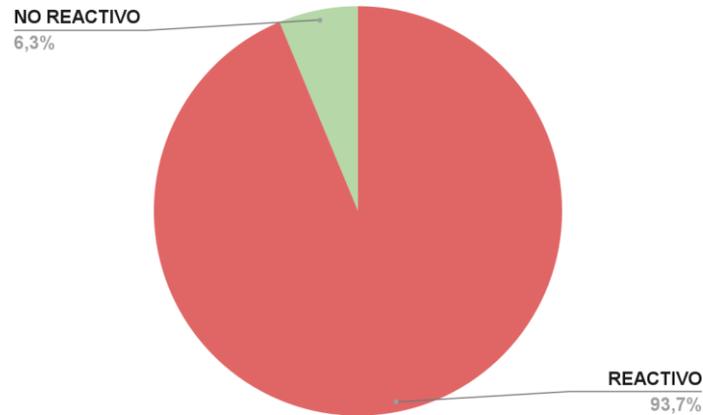
1530 muestras analizadas
1303 positivas | 227 negativas



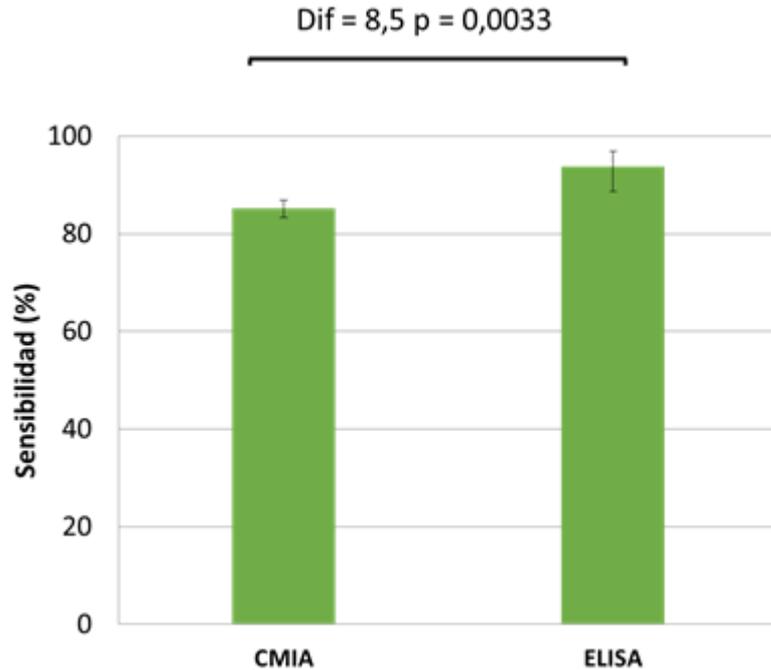
COVIDAR Test de ELISA IgG



159 muestras analizadas
149 muestras reactivas | 10 no reactivas



Sensibilidad Global



SARS-CoV-2 IgG (CMIA)

$$\frac{1303}{1303 + 227} \times 100 = 85,2\%$$

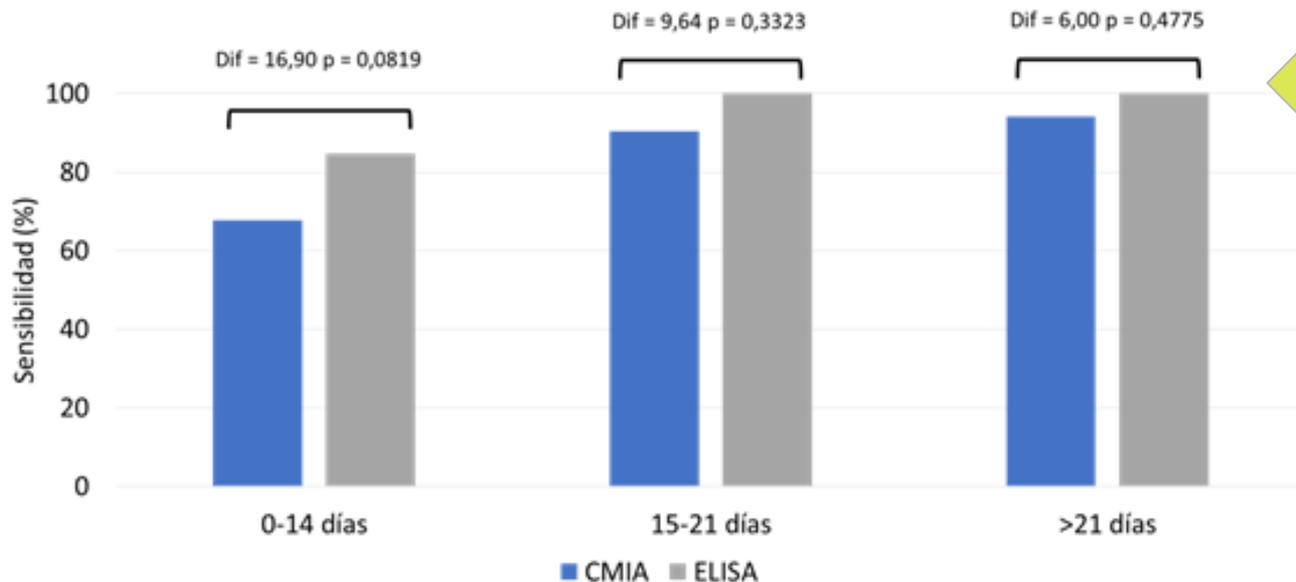
IC95%=83,3-86,9

COVIDAR Test de ELISA IgG

$$\frac{149}{149 + 10} \times 100 = 93,7\%$$

IC95%=88,7-96,9

Sensibilidad Estratificada según dde



67,7% 84,6%
(59,8-74,9) (65,1-95,6)
[107/158] [22/26]

90,4% 100%
(81,9-95,7) (66,4-100)
[75/83] [9/9]

94,0% 100%
(88,2-97,6) (63,1-100)
[111/118] [8/8]

Sintomáticos(n):

- CMIA = 359/1530
- ELISA = 43/159

SARS-CoV-2 IgG (CMIA)

COVIDAR Test de ELISA IgG

Especificidad

100%
(50/50)

100%
(50/50)

VPP

100%
IC95%=(99,7-100%)

100%
IC95%=(97,6-100%)

VPN

18,1%
IC95%=(13,7-23,1%)

83,3%
IC95%=(71,5-91,7%)

Concordancia inter-ensayos

n = 151	ELISA	
CMIA	NO REACTIVO	REACTIVO
NEGATIVO	54	4
POSITIVO	2	91

96,03%

$k=0,92$

Conclusiones

- Desempeño analítico aceptable.
 - Alta concordancia inter-ensayos.
 - La sensibilidad varía dependiendo del momento de toma de la muestra ($S > 90\%$ a partir de 15 dee)
 - Diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad global entre ensayos (Ag S vs. Ag N)
 - Altos VPP; CMIA bajo VPN. Tener en cuenta escenario clínico epidemiológico en la investigación serológica.
 - Los test serológicos serían útiles como herramienta complementaria a los test moleculares para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2
-

Agradecimientos

- Familia y amigos.
- Bioq. Agustina Fragueiro, Bioq. Florencia Fattore y Bioq. Natalia Gómez
- Bioq. Sebastián Blanco, Dra. Natalia Altamirano
- Mg. María Beatriz Isa

¡Muchas gracias!

