

## Evaluación de ensayos ultramicroanalíticos para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2

Evaluation of ultramicroanalytic assays to detect antibodies against SARS-CoV-2

Licel de los Ángeles Rodríguez Lay<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7742-3146>

Yahisel Tejero<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4781-6088>

José L. Pelegrino<sup>1</sup> <http://orcid.org/0000-0003-0833-653X>

Darling Danay Morales Verdecia<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6264-1204>

María Caridad Montalvo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7496-023X>

Odalys Valdés<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9352-488X>

Sonia Resik<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7318-7206>

María G. Guzmán<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3927-0844>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [licel@ipk.sld.cu](mailto:licel@ipk.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** En el presente trabajo se muestran los resultados de la validación de los ensayos serológicos *in vitro* para la detección de anticuerpos IgM, IgG y anticuerpos totales contra el SARS-CoV-2 UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA ANTI-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG desarrollados por el Centro de Inmunoensayo (CIE).

**Métodos:** Se utilizaron paneles de muestras de suero de individuos negativos y de casos confirmados de COVID-19 para determinar el desempeño analítico de cada ensayo.

**Resultados:** La especificidad clínica de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA ANTI-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG fue del 100 % en todos los ensayos y la

especificidad analítica fue de 100 % para los dos primeros ensayos y del 93,1 % para el último. La sensibilidad clínica fue de 64,3, 80,8 y 97,5 %, respectivamente. El valor predictivo positivo fue de 100 % en todos los ensayos, en tanto que el negativo osciló entre 83,3 y 95,2 %. La concordancia fluctuó entre 92,4 y 96,9 % y el índice kappa de todos los ensayos fue muy bueno. La sensibilidad de los ensayos se incrementó a 82,76, 96,5 y 100 %, respectivamente, en las muestras de suero colectadas con más de 14 días de iniciado el cuadro clínico.

**Conclusiones:** Los ensayos demostraron una elevada sensibilidad y especificidad, lo que permite contar con herramientas basadas en una tecnología desarrollada en Cuba que posibilita la realización de estudios serológicos, vigilancia epidemiológica y de otro tipo, incluyendo los relacionados con vacunas en una plataforma con amplia distribución nacional.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2; COVID-19; UMELISA; anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2; anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2; anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2; respuesta inmune humoral.

## ABSTRACT

**Introduction:** This paper shows the results obtained in the validation of in vitro serological assays to detect IgM, IgG antibodies, and total antibodies against SARS-CoV-2 UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA ANTI-SARS-CoV-2 and UMELISA SARS-CoV-2 IgG developed by the Immunoassay Center.

**Methods:** Panels of serum samples from negative and COVID-19 confirmed patients were used to determine the analytical performance of each assay.

**Results:** UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA ANTI-SARS-CoV-2 and UMELISA SARS-CoV-2 IgG assays demonstrated 100% clinical specificity for all assays; and 100% analytical specificity for the first two assays, and 93.1% for the last one. Clinical sensitivity was 64.3%, 80.8% and 97.5%, respectively. The positive predictive value was 100% in all assays, while the negative predictive value ranged from 83.3% to 95.2%. Concordance varied from 92.4% to 96.9%, and kappa index in every assay was very good. Assays

sensitivity increased to 82.7%, 96.5% and 100 %, respectively for serum samples collected more than 14 days after onset of the symptoms.

**Conclusions:** The assays demonstrated high sensitivity and specificity, which allows us to have Cuban technology-based tools for serological, epidemiological surveillance, and other types of studies, including those related to vaccines on a platform with wide national distribution.

**Keywords:** SARS-CoV-2; COVID-19; UMELISA; IgM anti-SARS-CoV-2 antibodies; IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies; anti-SARS-CoV-2 total antibodies; humoral immune response.

Recibido: 21/05/2021

Aceptado: 02/07/2021

## Introducción

A finales de diciembre de 2019 aparecieron en Wuhan, China, casos de neumonía de etiología desconocida. La evolución sin precedentes de esta condujo a que el 11 de marzo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara una pandemia mundial. El agente causal es un virus de la familia *Coronaviridae* que ha sido denominado SARS-CoV-2. Desde el inicio de la epidemia hasta la fecha se han detectado más de 165 millones de casos en el mundo, con una letalidad del 2,07%.<sup>(1,2)</sup>

Los coronavirus son una familia de virus que causan infección en los seres humanos y en una variedad de animales. Los coronavirus que afectan al ser humano pueden producir cuadros clínicos que van desde el resfriado común con patrón estacional en invierno hasta otros más graves como los producidos por los virus del síndrome respiratorio agudo grave (por sus siglas en inglés, SARS) y del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV).<sup>(3,4,5,6)</sup>

El diagnóstico virológico se realiza mediante la detección del ARN viral a través de la técnica de PCR en tiempo real, la cual se considera el estándar de oro del diagnóstico.

Esta técnica permite detectar el genoma del virus en las etapas iniciales de la infección, incluso antes de la aparición de los síntomas. Los ensayos serológicos para el SARS-CoV-2, ahora ampliamente disponibles, pueden desempeñar un papel importante en la comprensión de la epidemiología del virus y en la identificación de los grupos con mayor riesgo de infección. A diferencia de los métodos de detección directa, las pruebas serológicas detectan la infección por el virus SARS-CoV-2 en resolución o pasada midiendo indirectamente la respuesta inmunitaria humoral del individuo. Actualmente, el papel de la serología en la COVID-19 es para realizar estudios epidemiológicos que permitan acciones de salud pública, conocer la respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2, realizar el diagnóstico retrospectivo de la enfermedad reciente y la evaluación de donantes de plasma y candidatos vacunales.<sup>(7)</sup>

Existe una comprensión muy limitada sobre la respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2: la cinética de la respuesta inmunitaria, longevidad de los anticuerpos, protección, título protector de los anticuerpos neutralizantes, entre otros, y además algunos de estos ensayos pueden tener reactividad cruzada con otros coronavirus. La mayoría de las personas inmunocompetentes desarrollarán una respuesta inmunitaria después de la infección por SARS-CoV-2, e incluso algunas personas no desarrollarán anticuerpos IgG o IgM detectables después de la infección.<sup>(8)</sup>

La tecnología SUMA, desarrollada hace más de 30 años en Cuba, tiene la característica que, al emplear pequeños volúmenes de muestras y reactivos, resulta económicamente sustentable, características de gran utilidad para una circunstancia como la que enfrentamos hoy en día: la COVID-19. En el contexto de la pandemia de COVID-19, el Centro de Inmunoensayo (CIE) desarrolló las técnicas cualitativas UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA ANTI SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG, las cuales utilizan como fase sólida, placas revestidas con proteínas de la espiga (S), la nucleocápside (N) y la membrana (M) del SARS-CoV-2. En el presente trabajo se muestran los resultados de la evaluación de dichos ensayos según los criterios expresados en la Regulación No. 47/2007 del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), del Ministerio de Salud Pública de Cuba.<sup>(9)</sup>

## Métodos

Para medir el desempeño analítico de las técnicas UMELISA desarrolladas, se utilizaron paneles de muestras de suero de individuos negativos y de casos confirmados de COVID-19, que se describen a continuación.

Muestras clínicas:

- Panel de muestras de suero negativas al SARS-CoV-2: Se utilizaron 100 muestras de suero colectadas en 2018, para estudio de especificidad clínica. Estas eran muestras provenientes del Banco de Sangre y residuales de un estudio de seroprevalencia de hepatitis E.
- Panel de muestras de suero positivas a diferentes agentes virales infecciosos (con genomas ARN o ADN) que pueden coinfectar junto al SARS-CoV-2, o que poseen cuadros clínicos similares para estudio de especificidad analítica colectadas en 2019: Se utilizaron 32 muestras, caracterizadas de la forma siguiente: positivas a virus de la hepatitis A (VHA)  $n = 1$ , virus de la hepatitis B (VHB)  $n = 3$ , virus de la hepatitis C (VHC)  $n = 3$ , virus de la hepatitis E (VHE)  $n = 1$ , virus de inmunodeficiencia humana (VIH)  $n = 3$ , sarampión  $n = 3$ , parotiditis  $n = 1$ , dengue  $n = 3$ , virus del Zika  $n = 2$ , virus de Epstein-Barr (VEB)  $n = 3$ , citomegalovirus (CMV)  $n = 3$ , y agentes virales que producen infección respiratoria aguda (IRA)  $n = 6$  (positivos a influenza A [5] y coronavirus estacional HKU1 [1]).
- Panel de muestras de suero procedentes de pacientes o individuos positivos al SARS-CoV-2 diagnosticados por PCR en tiempo real en muestras de exudados nasofaríngeos ( $n = 70$ ) que fueron colectadas entre 1 y 30 días del inicio de los síntomas (DIS): entre 1-7 días, 19 muestras; entre 8-14 días, 21 muestras; más de 14 días, 30 muestras. Estos pacientes se encontraban ingresados en los hospitales del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) y Luis Díaz Soto en el momento de la colecta de muestras.

- Muestras de plasma de individuos convalecientes (más de 21 DIS y alta clínica y epidemiológica) de la infección por SARS-CoV-2 (n = 67) procedentes de todo el país.

Todas las muestras se encontraban almacenadas a menos de 20 °C hasta su posterior utilización. El ensayo se realizó en condiciones de Bioseguridad Nivel II, utilizando cabina de seguridad biológica Clase II para realizar el paso de dilución y adición de las muestras positivas al SARS-CoV-2 en las placas de reacción del UMELISA.

*Consideraciones éticas:* Esta evaluación fue parte de la validación de los nuevos ensayos diagnósticos recibidos en el IPK antes de su introducción en el Sistema de Salud. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IPK en cumplimiento de la Declaración de Helsinki (CEI-IPK 65-20). Se utilizaron muestras clínicas del archivo de sueros del Departamento de Virología del IPK. El archivo de sueros se encontraba adecuadamente almacenado y organizado y sus muestras provienen del diagnóstico, la vigilancia y las investigaciones (muestras no COVID-19). Se tomaron muestras de suero de pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2 a partir de determinaciones de laboratorio clínicas de rutina, así como de técnicas virológicas. Se tomaron muestras de plasma o suero de pacientes convalecientes para seguimiento clínico o serológico del COVID-19 y todos ofrecieron su consentimiento informado verbal. Todos los participantes en la evaluación se comprometieron a salvaguardar la confidencialidad de las personas y los pacientes positivos al SARS-CoV-2, cuyas muestras se incluyeron en la evaluación. El estudio se llevó a cabo siguiendo las buenas prácticas clínicas y de laboratorio y siguiendo las instrucciones del fabricante. El personal que realizó el estudio está calificado y se utilizaron métodos para realizar las pruebas de laboratorio y estadísticas reconocidas a nivel internacional.

*Características de los ensayos a evaluar:* Los ensayos evaluados son cualitativos. En el caso de UMELISA SARS-CoV-2 IgM se utiliza como fase sólida, placas de ultramicro-ELISA revestidas con proteínas de la espiga (S), la nucleocápside (N) y la membrana (M) del SARS-CoV-2, el UMELISA anti-SARS-CoV-2 emplea como fase sólida, placas de ultramicro-ELISA revestidas con proteínas de la espiga (S) y la nucleocápside (N) del

SARS-CoV-2 y el UMELISA SARS-CoV-2 IgG usa como fase sólida placas de ultramicro-ELISA revestidas con una proteína recombinante y péptidos sintéticos representativos de las regiones inmunodominantes de las proteínas S y N del SARS-CoV-2. En los tres sistemas, las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y, si contienen anticuerpos específicos, estos se fijan a los antígenos del recubrimiento. La realización de lavados posteriores elimina los componentes de la muestra no fijados.

Posteriormente se añade el conjugado anti-IgM humana / fosfatasa alcalina o anti-IgG humana / fosfatasa alcalina, en dependencia del ensayo (IgM o IgG), el cual se unirá a los anticuerpos fijados en la reacción anterior. En el caso del UMELISA anti-SARS-CoV-2, se añaden los antígenos biotinilados los cuales se unirán a los anticuerpos fijados en la reacción anterior, formando un complejo antígeno-anticuerpo-antígeno / biotinilado. Un nuevo lavado eliminará los antígenos/biotinilados que no reaccionaron y quedaron en exceso. Seguidamente se añade el conjugado estreptavidina / fosfatasa alcalina, el cual se unirá a las moléculas de biotina. Un nuevo lavado eliminará el conjugado en exceso. El paso final ocurre al añadir el sustrato fluorogénico el cual será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos al SARS-CoV-2 en las muestras.

*Análisis estadísticos:* Se creó una base de datos de Microsoft Excel 2010 para el análisis de los datos. Se utilizaron métodos estadísticos (Labcal 1.0.1 app<sup>(10)</sup> y Epidat 3.1) para evaluar el ensayo (de acuerdo con el Reglamento No. 47/2007 Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores del CECMED, La Habana, Cuba).<sup>(9)</sup> Específicamente para el índice kappa (K) basado en la comparación de índices de concordancia esperados y observados, se emplearon los resultados de todas las muestras analizadas en los estudios de sensibilidad clínica y especificidad clínica y analítica. Los márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice K fueron: < 0 sin acuerdo, 0-0,2 insignificante, 0,2-0,4 bajo, 0,4-0,6 moderado, 0,6-0,8 bueno y 0,8-1 muy bueno.

## Resultados

### Desempeño analítico de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 de producción nacional

La tabla 1 muestra los resultados del desempeño analítico del UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG.

**Tabla 1** - Desempeño analítico de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG

Parámetros	UMELISA SARS-CoV-2 IgM	UMELISA anti-SARS-CoV-2	UMELISA SARS-CoV-2 IgG
Especificidad (IC 95 %)	100 % (97,24-100)	100 % (95,55-100)	100 % (91,11-99,82)
Sensibilidad (IC 95 %)	64,3 % (51,93-75,39)	80,8 % (73,05-88,5)	97,5 % (90,43-99,57)
VPP (IC 95 %)	100 % (100-100)	100 % (100-100)	100 % (93,52-99,87)
VPN (IC 95 %)	92,3 % (87,9-96,6)	95,2 % (90,7-99,8)	96,15 % (85,67-99,33)
Concordancia (IC 95 %)	93,9 % (90,4-97,4)	96,9 % (94-99,8)	98,46 % (93,99-99,73)
Índice de kappa	0,837 (0,744-0,930) Muy buena	0,934 (0,871-0,998) Muy buena	0,968 (0,923-1,012) Muy buena

VPP: valores predictivos positivos; VPN: valores predictivos negativos; IC 95 %: intervalos de confianza 95 %

No se detectó reactividad cruzada con UMELISA SARS-CoV-2 IgM ni con UMELISA anti-SARS-CoV-2. Sin embargo, se detectó reactividad cruzada en muestras de dos pacientes con infección por VHC con el ensayo UMELISA SARS-CoV-2 IgG.

La tabla 2 muestra la sensibilidad del UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG, teniendo en cuenta el tiempo entre el inicio de los síntomas y la colecta de las muestras.

### Sensibilidad de los ensayos a partir del octavo día de comenzado el cuadro clínico

El ensayo UMELISA SARS-CoV-2 IgM posee una sensibilidad del 78 % (IC 95 % [64,04-88,47]) (39/50) en muestras de suero de pacientes confirmados de COVID-19 tomadas a



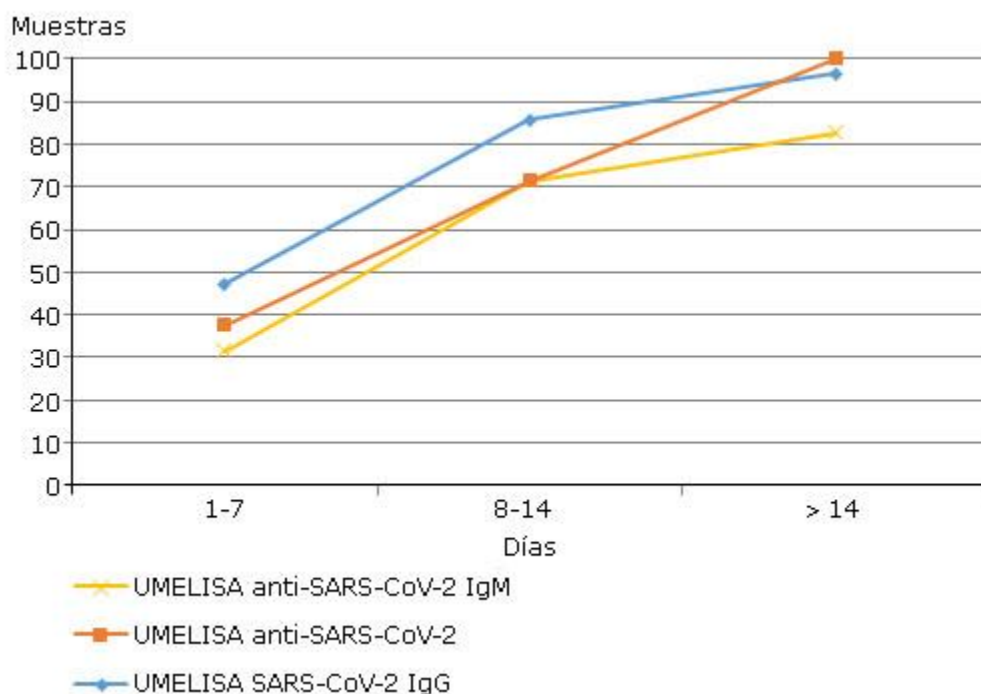
partir del 8.º DIS. La sensibilidad del ensayo UMELISA anti-SARS-CoV-2 fue del 92 % (IC 95 % [84,4-99,5]) (46/50).

La figura resume la sensibilidad de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG en muestras tomadas en diferentes etapas de la infección por el virus SARS-CoV-2.

**Tabla 2** - Sensibilidad de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG, utilizando las muestras positivas de pacientes confirmados

DIS y colecta de la muestra	Sensibilidad (IC 95%)		
	UMELISA SARS-CoV-2 IgM	UMELISA anti-SARS-CoV-2	UMELISA SARS-CoV-2 IgG
Entre 1-7 días	31,58 % (12,58-56,55)	47,3 % (24,9-69,8)	37,5 % (10,2-74,1)
Entre 8-14 días	71,43 % (47,82-88,72)	85,7 % (70,7-100,6)	71,43 % (47,7-87,8)
Más de 14 días	82,76 % (64,23-94,15)	96,5 % (89,9-103,1)	100 % (71,6-99,3)
Total	65,22 % (52,79-76,29)	79,7 % (70,2-89,1)	73,8 % (57,7-85,6)

DIS: día del inicio de los síntomas.



**Fig.** - Sensibilidad de los ensayos UMELISA SARS-CoV-2 IgM, UMELISA anti-SARS-CoV-2 y UMELISA SARS-CoV-2 IgG en muestras tomadas en diferentes etapas de la infección por el virus SARS-CoV-2.

## Discusión

El diagnóstico virológico del SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19, es importante tanto para el manejo de la enfermedad individual como de la pandemia a nivel global. Si bien el diagnóstico por excelencia es la PCR, también es necesario disponer de otros ensayos rápidos, simples, automatizados e idealmente con alta sensibilidad y precisión y que se puedan realizar a gran escala. El objetivo es un diagnóstico precoz, para un mejor manejo y monitorización de los pacientes, la aplicación de medidas de prevención y control de la expansión y la vigilancia epidemiológica.

Al determinar quién es inmune al SARS-CoV-2, los datos serológicos pueden ser utilizados para estimar variables epidemiológicas, como la tasa de ataque o tasa de letalidad, que son necesarias para evaluar la transmisión y su carga; para evaluar la eficacia de candidatos vacunales y, finalmente, para identificar a las personas que desarrollaron una fuerte respuesta inmunitaria al virus y cuyos anticuerpos se pueden emplear para tratar a los pacientes mediante terapia con plasma. Sin embargo, aún quedan varios desafíos para abordar correctamente la implementación, validación e interpretación adecuadas de pruebas serológicas, entre ellos, comprender la cinética de los anticuerpos.<sup>(11)</sup>

Las técnicas serológicas más comúnmente usadas para el diagnóstico serológico del SARS-CoV-2 son las de inmunocromatografía (flujo lateral), los enzimoanálisis (ELISA) y los ensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA). Los inmunoensayos se utilizan para detectar la presencia de anticuerpos séricos (ya sea IgA, IgG o IgM) a proteínas virales y pueden indicar cuándo una persona ha desarrollado una respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2. Normalmente, cuando un virus infecta el organismo, la respuesta IgM se produce en primer lugar contra el virus; y con la progresión de la enfermedad, comienzan a producirse los anticuerpos IgG y gradualmente se vuelven detectables. En el caso de la infección por SARS-CoV-2, los datos han demostrado que la positividad a IgM o IgG es extremadamente baja en los primeros 5 días después de la aparición inicial de los síntomas, y aumentan rápidamente a medida que avanza la enfermedad y la convalecencia.<sup>(12)</sup>

Los UMELISA son altamente sensibles y específicos, característica que han demostrado en el arsenal de pruebas diagnósticas con que cuenta actualmente la tecnología, y en el caso de los ensayos que nos ocupan, también se han obtenido valores elevados de sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad de los inmunoensayos depende del momento en que se realiza la prueba al paciente, del epítipo del antígeno viral utilizado<sup>(13)</sup> y del isotipo de detección de anticuerpos, entre otros.<sup>(14)</sup> La mayor sensibilidad se observa cuando se detecta una mezcla de anticuerpos.

El SARS-CoV-2 tiene cuatro proteínas estructurales: membrana (M), envoltura (E), espiga (S) y la nucleocápside (N). Entre ellas, S y N se consideran los principales inmunógenos y se utilizan ampliamente en inmunoensayos. La nucleocápside es una proteína de pequeño tamaño, se ha demostrado que los anticuerpos antinucleocápside aparecen antes que los anticuerpos antiespiga. Por lo tanto, la detección de anticuerpos antinucleocápside en las pruebas ELISA puede aumentar la sensibilidad clínica del ensayo si las muestras se extraen temprano. La proteína S del SARS-CoV-2 posee dos subunidades (S1 y S2). La subunidad S1 interacciona y se une al receptor, en este caso la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2, por sus siglas en inglés) por medio del dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés), mientras que la subunidad S2 determina la fusión de la membrana del virus con la de la célula huésped. Se ha sugerido que el uso de la proteína S1, y particularmente el RBD, mejoraría la especificidad de los inmunoensayos.<sup>(15,16)</sup>

En los ensayos UMELISA aquí evaluados, las placas de ultramicro-ELISA están revestidas con las proteínas S, M y N del SARS-CoV-2 en el caso de la detección de IgM; con las proteínas S y N en el caso de los totales; y con una proteína recombinante y péptidos sintéticos representativos de las regiones inmunodominantes de las proteínas S y N en el ensayo de detección de IgG. Como se ha demostrado, los antígenos de la espiga y de la nucleocápside son altamente inmunogénicos y se expresan abundantemente durante la infección,<sup>(17)</sup> de ahí que los ensayos evaluados hayan obtenido un desempeño adecuado en cuanto a sensibilidad y especificidad. A esta característica se une el hecho de que UMELISA anti-SARS-CoV-2 muestra mejor desempeño, dado fundamentalmente

por la detección de anticuerpos totales, lo cual es otro factor importante en la sensibilidad de los ensayos.

La sensibilidad a partir del 8.º día del inicio de los síntomas del ensayo UMELISA SARS-CoV-2 IgM es del 78 % y el UMELISA anti-SARS-CoV-2 del 92 %. Este resultado es superior a la sensibilidad que caracteriza a ambos ensayos según su fabricante cuando plantean que son capaces de detectar anticuerpos en el 60 % y 84,9 % en el ensayo de IgM y anticuerpos totales, respectivamente. Este aspecto es importante en el sentido de que los anticuerpos (IgM/IgG) contra el virus son detectables alrededor del día 7 desde el inicio de los síntomas (en aproximadamente 50 % de los casos) y permite evaluar su desempeño.<sup>(18)</sup>

Si bien encontramos reactividad cruzada en muestras de dos pacientes con infección por VHC con el ensayo UMELISA SARS-CoV-2 IgG, estos anticuerpos no son específicos al SARS-CoV-2, ya que estas muestras fueron colectadas en 2019 cuando todavía no circulaba el virus en Cuba. La posibilidad de que estas muestras posean anticuerpos a otros coronavirus estacionales humanos que reaccionen de forma cruzada en este ensayo o enfermedades autoinmunes que produzcan falsos positivos no puede ser descartada, lo cual constituye una limitación de la presente investigación al no contar con sueros obtenidos de pacientes con infecciones producidas por otros coronavirus estacionales humanos (229E, OC43 y NL63) para el estudio de especificidad analítica; este aspecto debe tenerse en cuenta para futuras evaluaciones.

En Brasil, un metaanálisis para estudiar la precisión de las pruebas diagnósticas tipo ELISA disponibles encontró para anticuerpos IgM una sensibilidad del 82 % y especificidad del 97 %; mientras que para los anticuerpos IgG, halló una sensibilidad del 97 % y especificidad del 98 %.<sup>(19)</sup> Otros autores como *Zhao* y otros encontraron una positividad del 38,3 % a los 7 días de iniciar el cuadro clínico, que se incrementó al 89,3 % en la segunda semana. En ambos estudios se comparó la detección de casos por PCR y por anticuerpos y fue mayor con el uso de anticuerpos a partir de los 6-8 días tras el inicio de síntomas.<sup>(20)</sup> Estos resultados permiten el uso complementario de los ensayos serológicos para una mayor rentabilidad en el diagnóstico de los pacientes.

*Xiang* y otros, utilizando ensayos tipo ELISA, también hallaron que la seroconversión de anticuerpos IgM e IgG específicos se observó ya al cuarto día después del inicio de los síntomas y al igual que el presente estudio obtuvieron buenos resultados en la evaluación tanto para IgM como IgG, apoyando su utilidad en el serodiagnóstico de COVID-19.<sup>(21)</sup>

Autores de Austria evaluaron comparativamente sensibilidad y especificidad de cuatro ensayos tipo ELISA agrupados por intervalo desde el inicio de los síntomas. A pesar de que la sensibilidad de la prueba, fueron bajas (< 40 %) dentro de los primeros 5 días después del inicio de la enfermedad, y la IgM, IgA y los anticuerpos totales aumentaron en sensibilidad a más del 80 % entre los días 6 y 10 después de la aparición de los síntomas. Las pruebas evaluadas proporcionaron resultados positivos en todos los pacientes después del 11.º día del inicio de la enfermedad. Las especificidades de los ELISA fueron del 83 % (IgA), 98 % (IgG) y 97 % (IgM y anticuerpo total).<sup>(22)</sup> Estos resultados concuerdan con los descritos en el presente trabajo.

*Lou* y otros, por su parte, realizaron un estudio sobre la detección de anticuerpos totales, de IgM e IgG, en pacientes diagnosticados por PCR a lo largo del tiempo desde el inicio de los síntomas, y encontraron que en una etapa temprana (0-7 días) de la enfermedad, el ELISA de detección de anticuerpos totales mostró la mayor sensibilidad (64,1 %) en comparación con ELISA-IgM y ELISA-IgG (33,3 % para ambos,  $p < 0,001$ ). La sensibilidad de detección de anticuerpos totales, IgM e IgG aumentaron significativamente en la etapa posterior, alcanzando el 100 %, 96,7 % y 93,3 %, respectivamente, 2 semanas después ( $p < 0,05$ ).<sup>(23)</sup> Igualmente, autores franceses evaluaron un ELISA de detección de anticuerpos totales y obtuvieron un 100 % de especificidad y de sensibilidad, esta última en muestras de pacientes confirmados de más de 14 días de iniciado el cuadro clínico.<sup>(24)</sup> Estos resultados son más elevados que los obtenidos en el presente trabajo, no obstante, concuerdan en que la detección de anticuerpos totales aumenta la sensibilidad del sistema.

## Conclusiones

La validación realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de enfermedades víricas del IPK confirmó la validez de poseer una tecnología desarrollada

por el Centro de Inmunoensayo y que posibilita contar con ensayos serológicos de detección de IgM, IgG o anticuerpos totales con elevada sensibilidad, especificidad, concordancia, valores predictivos e índice kappa. Dichos ensayos formarán parte del arsenal diagnóstico de la COVID-19, la vigilancia epidemiológica, la evaluación de plasmas inmunitarios y de su utilidad en la evaluación de la respuesta a los candidatos vacunales, así como para el seguimiento de los individuos convalecientes y otras investigaciones necesarias para el control de la enfermedad. El contar con sistemas diagnósticos basados en plataformas de producción nacional ampliamente distribuidas en el país contribuye a una independencia tecnológica que abarata costos en el enfrentamiento a una pandemia que requiere un gasto cada vez mayor de recursos económicos.

## Referencias bibliográficas

1. WHO. Cronología de la respuesta de la OMS a la COVID-19, 29 de junio de 2020. [Acceso 14/10/2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/29-06-2020-covidtimeline>
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 2020 March;5(536):536-44. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, Frieman M, Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses*. 2019;11(1):e41. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11010041>
4. Heng L, Shang-Ming L, Xiao-Hua Y, Shi-Lin T, Chao-Ke T. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 May;55(5):105951. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105951>
5. Junejo Y, Ozaslan M, Safdar M, Khailanyd RA, Rehman S, Yousaf W, *et al.* Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses

- and phylogenetic analysis. *Gene Rep.* 2020 Sep;20:100752. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752>
6. Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Suwaidi HA, Hassan Al-Marzouqi AH, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses* 2020;12:526. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12050526>
7. la Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): A systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *RBMO.* 2020 [Acceso 05/11/2020];00(0). Disponible en: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(20\)30318-7/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(20)30318-7/pdf)
8. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jul;20(7):758-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30322-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30322-4)
9. CECMED. Regulación No. 47/2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores [Acceso 05/11/2020]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/patologiaclinica/reg\\_47-07\[1\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/patologiaclinica/reg_47-07[1].pdf)
10. Guadis Salazar E, Rodriguez Lay L, Montalvo Villalba M, Bello Corredor M, López Hernandez D, Marrero Sánchez B, et al. Android applications for viral hepatitis diagnosis, research and training. *J International AIDS Society.* 2018 [Acceso 05/11/2020];21(S3):e25093. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jia2.25093>
11. Tré-Hardy M, Blairon L, Wilmet A, Beukinga I, Malonne H, Dogné JM, et al. The role of serology for COVID-19 control: Population, kinetics and test performance do matter. *Journal of Infection.* *J Infect.* 2020 Aug;81(2):e91-e92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.019>
12. Liu L, Liu W, Zheng Y, Jiang X, Kou G, Ding J, et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *Microbes and Infection.* 2020;05(8). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.008>
13. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-



CoV-2: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):565-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.008>

14. Zhao J, Yuan Q, Wang H. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19;71(16):2027-34. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)

15. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, *et al.* Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *medRxiv reprint.* 2020/04/20 DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.20.20071423>

16. Okba NM, Muller MA, Li W, Wang C, Geurtsvan Kessel CH, Corman VM, *et al.* SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv.* 2020. [Acceso 05/11/2020]. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1>

17. Muench P, Jochum S, Wenderoth V, Ofenloch-Haehnle B, Hombach M, Strobl M, *et al.* Development and Validation of the Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay as a Highly Specific Tool for Determining Past Exposure to SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020;58(10):e01694-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01694-20>

18. OPS. Interpretación de resultados de laboratorio para diagnóstico de COVID-19. OPS; 6 may 2020. Disponible en: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52129/OPSPHEIHMC0VID-19200015\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52129/OPSPHEIHMC0VID-19200015_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

19. Russo A, Minichini C, Starace M, Astorri R, Calò F, Coppola N, *et al.* Current Status of Laboratory Diagnosis for COVID-19: A Narrative Review. *Infection and Drug Resistance.* 2020;13:2657-65. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S264020>

20. Zhao J. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19;71(16):2027-34. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>

21. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, *et al.* Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov;71(8):1930-4. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>



22. Traugott M, Aberle SW, Aberle JH, Griebler H, Karolyi M, Pawelka E, *et al.* Performance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Assays in Different Stages of Infection: Comparison of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Rapid Tests. *The Journal of Infectious Diseases.* 2020;222:362-6. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa305>
23. Lou B, Li T, Zheng S, Su Y, Li Z, Liu W, *et al.* Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. 2020 March 27. medRxiv. 2020/03/23. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.23.20041707v1>
24. Abravanel F, Miédouge M, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Izopet J. Clinical performance of a rapid test compared to a microplate test to detect total anti SARS-CoV-2 antibodies directed to the spike protein. *J Clin Virol.* 2020;130:104528. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104528>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

### Contribución de los autores

Licel de los Ángeles Rodríguez Lay: Conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, administración de proyecto, recursos, supervisión, validación, visualización, redacción - borrador original, redacción - revisión y edición.

Yahisel Tejero: Análisis formal, investigación, metodología, recursos, redacción - revisión y edición.

José L. Pelegrino: Análisis formal, investigación, metodología, recursos, redacción - revisión y edición.

Darling Danay Morales Verdecia: Análisis formal, investigación, metodología, recursos, redacción - revisión y edición.

Maria Caridad Montalvo Villalba: Análisis formal, investigación, metodología, recursos, redacción - revisión y edición.

Odalys Valdés: Análisis formal, investigación, metodología, recursos, redacción - revisión y edición.

Sonia Resik: Redacción - revisión y edición.

Maria G. Guzmán: Análisis formal, redacción - revisión y edición.