

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO MULTIPLEXADO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON INFECCIONES AGUDAS VIRALES PREVALENTES EN MÉXICO: ENFOQUE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA COVID-19.

Dr. José L. Maravillas Montero¹, Dr. David E. Meza Sánchez¹, M. en C. Víctor A. Sosa Hernández^{1,2},
Dr. Alfredo Ulloa Aguirre¹.

1. Red de Apoyo a la Investigación; Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
2. Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

Ante la actual pandemia de COVID-19, la Organización Mundial de la Salud ha declarado la posibilidad de que la infección con SARS-CoV-2 se vuelva endémica a nivel mundial. Ante ello, y sumado a que la patología de esta enfermedad puede presentarse de manera asintomática, se hace necesaria la implementación de métodos de diagnóstico serológicos robustos y que para el caso de nuestro país, permitan inclusive su discriminación de entre otras enfermedades con manifestaciones respiratorias y sistémicas similares, tales como la influenza o inclusive, el dengue. Por ello, proponemos el desarrollo de un método multiplexado para la detección de anticuerpos en suero de individuos expuestos a SARS-CoV-2 y a otros patógenos virales, mediante la plataforma xMAP.

ANTECEDENTES

En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus (CoV) surgió en China generando una enfermedad respiratoria aguda conocida como COVID-19. El virus fue identificado como un betacoronavirus relacionado con el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), por lo tanto, fue llamado SARS-CoV-2. En menos de dos décadas, este virus es el tercer coronavirus conocido que cruza la barrera de especies y causa graves infecciones respiratorias en los seres humanos después del SARS-CoV en 2003 y el síndrome respiratorio del Oriente Medio en 2012 (MERS), presentando una propagación sin precedentes en comparación con los dos anteriores.

Debido al rápido aumento del número de casos sin control y con una amplia diseminación a nivel mundial, la OMS ha declarado el SARS-CoV-2 como pandemia. Desde finales del 2019, el virus ha infectado a más de 4 millones de personas en más de 120 países, donde cerca del 7% tuvo un desenlace fatal. El análisis del genoma del SARS-CoV-2 mostró que este virus es levemente diferente al virus SARS-CoV y al virus MERS-CoV, pero los ORFs funcionalmente importantes: ORF1a y ORF1b y las principales proteínas

estructurales como las proteínas espícula (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) están bien anotadas.

Se reconoce que cuatro proteínas estructurales son esenciales para el ensamblaje de los viriones y la infección de los CoV. Los homotrímeros de las proteínas S forman las espículas en la superficie de las partículas del virus, representando la única proteína de la membrana viral responsable de la entrada en la célula; éstas se unen al receptor de la célula blanco y median la subsiguiente fusión virus-célula. La proteína S del SARS-CoV-2 (2019-nCoV), contiene dos subunidades: S1 y S2. La S1 contiene principalmente el dominio de unión al receptor (RBD), mientras que la S2 contiene los elementos básicos necesarios para el proceso de fusión de la membrana. Por su parte, la proteína M tiene tres dominios transmembrana y da forma a los viriones, promoviendo la curvatura de la membrana y a través de la unión a la nucleocápside. La proteína E juega un papel en el ensamblaje y liberación del virus, y es necesaria para la patogénesis. La proteína N contiene dos dominios, ambos pueden unirse al genoma de RNA del virus a través de diferentes mecanismos.

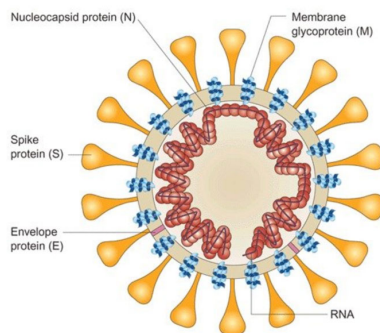


Figura 1. Estructura del virus SARS-CoV-2.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA SARS-CoV-2

Respecto a la inducción de la respuesta inmune durante el desarrollo de COVID-19, se conocen ya datos suficientes para describir los principales eventos involucrados en la misma. La respuesta humoral por ejemplo, es crítica para la eliminación de los virus citopáticos y es una parte importante de la respuesta de la memoria que previene la reinfección. El SARS-CoV-2 provoca una robusta respuesta de las células B, como lo demuestra la rápida y casi universal detección de IgM, IgG e IgA específicas para el virus, así como la generación de anticuerpos neutralizantes IgG (nAbs) en los días posteriores a la infección.

La cinética de la respuesta de los anticuerpos contra el SARS-Cov-2 está ahora razonablemente bien descrita. De manera similar a la infección por el SARS-CoV-1, la seroconversión se produce en la mayoría de los pacientes con COVID-19 entre 7 y 14 días después de la aparición de los primeros síntomas, mientras que los títulos de anticuerpos persisten en las semanas posteriores tras la eliminación del virus (Figura 2).

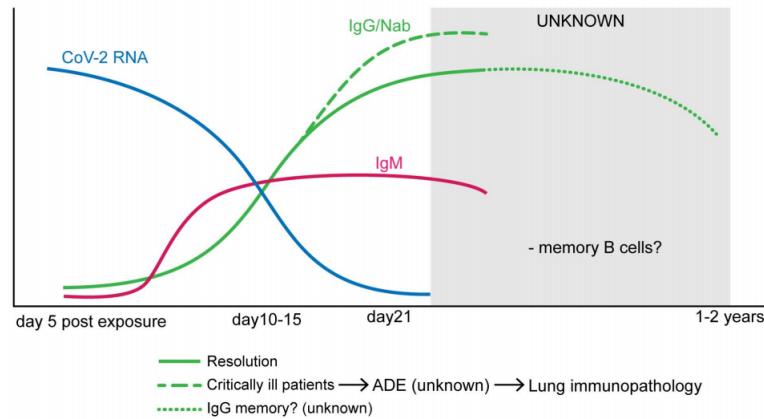


Figura 2: Inmunidad mediada por anticuerpos en el SARS-CoV-2. La IgM y la IgG específicas del virus son detectables en el suero entre 7 y 14 días después de la aparición de los síntomas. El ARN viral está inversamente correlacionado con los títulos de anticuerpos neutralizantes. Se han observado títulos más altos en pacientes en estado crítico, pero se desconoce si las respuestas de los anticuerpos contribuyen de alguna manera a la patología pulmonar. La respuesta humoral del SARS-CoV-1 es relativamente corta y las células de memoria B pueden desaparecer por completo, lo que sugiere que la inmunidad con el SARS-CoV-2 puede disminuir 1-2 años después de infección primaria.

Los anticuerpos que se unen a la proteína N y a la glicoproteína S del SARS-CoV-2 se detectan comúnmente en los pacientes con COVID-19. El dominio RBD de la proteína S es altamente inmunogénico y los anticuerpos que se unen a este dominio pueden neutralizar y bloquear las interacciones del virus con el receptor de entrada al huésped ACE2. Aunque se ha detectado una reactividad cruzada con las proteínas S y N del SARS-CoV-1 y con la proteína S del MERS-CoV en el plasma de los pacientes de COVID-19, no se encontró ninguna reactividad cruzada con la RBD del SARS-CoV-1 o del MERS-CoV [1].

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE COVID-19 Y TECNOLOGÍA xMAP

La rápida identificación de la etiología y la publicación de la secuencia genética del virus, seguido de los esfuerzos de colaboración internacional iniciados debido a la aparición del SARS-CoV-2, ha dado lugar a la rápida disponibilidad de ensayos de diagnóstico de PCR en tiempo real que apoyan el diagnóstico de los casos y el seguimiento de brotes [2]. La disponibilidad de estos métodos ha contribuido en la detección de individuos infectados y en los esfuerzos para contener el virus. Sin embargo, pruebas serológicas específicas y validadas poseen aún una disponibilidad limitada, siendo de alto grado de necesidad para entender la epidemiología del SARS-CoV-2.

Las pruebas serológicas validadas son cruciales para el seguimiento de contactos de los individuos afectados, identificando aquellos que funcionan como reservorios virales (portadores “sanos”) y necesarias para el desarrollo estudios epidemiológicos. En este sentido, se necesitan urgentemente estudios epidemiológicos para ayudar a determinar las dimensiones reales de la enfermedad y en particular, la tasa de infecciones asintomáticas, y conseguir mejores estimaciones sobre la morbilidad y la mortalidad. Además, estos estudios epidemiológicos pueden ayudar a revelar el alcance de la

propagación del virus en los hogares, comunidades y entornos específicos; lo que podría ayudar a orientar las medidas de control y mitigación. Igualmente se requiere de los ensayos serológicos para evaluar los resultados de estudios de desarrollo de vacunas y de anticuerpos terapéuticos.

En el contexto de detección de patógenos, la técnica basada en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) se ha empleado, entre muchas otras aplicaciones, para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida; sin embargo, es claro que los ensayos ELISA son laboriosos y propensos a errores debido a su baja sensibilidad y a los posibles falsos negativos. También se dispone de enfoques basados en ácidos nucleicos como la RT-PCR y la PCR en tiempo real para detectar e identificar el VIH; sin embargo, el uso de dichos enfoques para la detección de alto rendimiento de este y otros virus y patógenos en general, es complicado técnicamente y emplea mucho tiempo en la práctica cuando se manipula un gran número de muestras simultáneamente [3].

Una robusta y recientemente desarrollada plataforma de detección multiplexada, creada para sobrepasar las limitaciones del ELISA, es la tecnología “Multi Analyte Profile” (xMAP) de Luminex. Esta es una tecnología emergente que utiliza *microesferas de poliestireno* que se tiñen internamente con dos colorantes fluorescentes: uno con emisión roja y otro que emite en infrarrojo. El hecho de detectar una variación en la relación de la emisión de los dos fluorocromos, hace posible la diferenciación de hasta 100 diferentes variedades cromáticas de microesferas. Cada conjunto de microesferas puede acoplarse con diferentes biomoléculas tales como proteínas purificadas o recombinantes, anticuerpos o incluso sondas de DNA capaces de interactuar con los analitos a detectar en las muestras biológicas que se deseen examinar (de las que por cierto, se requiere de una cantidad mínima para el desarrollo de esta técnica), mismas que son identificadas por un elemento de detección (un anticuerpo, una enzima, una sonda de hibridación, etc.) que puede fungir de forma directa o indirecta como reportero. Las microesferas son detectadas y caracterizadas por un citómetro de flujo dedicado, usando un láser de excitación (635 nm) que permite la obtención de emisiones que se miden entre los 645/669 nm y >712 nm. Después de que las microesferas se clasifican, se mide la señal de reportero. La molécula reportera general utilizada es la ficoeritrina (PE), que es excitada por un láser verde (532 nm) y generando una emisión que se mide a 580 nm. Como se mencionó previamente, el desarrollo de métodos con estas microesferas es sumamente versátil, ya que pueden acoplarse con una gran variedad de biomoléculas como sondas de DNA o RNA, péptidos, proteínas, anticuerpos, receptores, polisacáridos y lípidos [4, 5].

Entre las áreas de investigación biomédicas en las que se han empleado exitosamente la tecnología xMAP incluyen la detección de patógenos, inmunología clínica, genética humana y caracterización de proteínas. De estas, las pruebas inmunológicas son las más comunes y son las preferidas por sus altos niveles de sensibilidad y especificidad, con valores superiores a los que ofrece el ELISA. Como algunos de los diversos ejemplos aplicativos relevantes de esta tecnología, se puede mencionar la cuantificación de citocinas en líquido cefaloraquídeo en pacientes con meningitis (un fluido del que

usualmente se dispone en pequeñas cantidades) , distintas determinaciones de marcadores inflamatorios sanguíneos, pruebas de expresión génica y mediciones de anticuerpos dirigidos contra polisacáridos de neumococos. Otra área donde el xMAP ha demostrado su relevancia es la microbiología general y clínica, apoyando en el diagnóstico de parásitos intestinales como *Cryptosporidium* y *Cyclospora cayetanensis* además de la tipificación de bacterias de relevancia médica como las Microbacterias, Igualmente, se ha logrado la detección múltiple de marcadores en ácidos nucleicos de hongos y protozoarios asociados a infecciones oportunistas [5].

Una de las áreas de mayor éxito respecto al empleo de xMAP es la virología; por ejemplo, en el tamizaje de EBV en sueros de pacientes con diferentes etiologías y orígenes geográficos, respecto a la presencia de anticuerpos IgA dirigidos contra las proteínas virales gp78 y IgGgp78 como biomarcadores de la enfermedad, usando combinaciones de dos tipos de microesferas y péptidos sintetizados para este propósito. También se describe la detección de material genético de ocho diferentes virus respiratorios en una plataforma múltiple basada en microesferas, la cual es una alternativa eficaz ante los procedimientos convencionales de cultivo y detección de fluorescencia en formato individual, que son usados de forma rutinaria para estos diagnósticos. De forma similar, se tiene el análisis de la metilación del DNA en un modelo de “citología basada en fluidos” para tamizaje de la fase pre-invasiva de cáncer cervical, usando PCR múltiple y la plataforma *Luminex* (xMAP) para el diagnóstico de virus del papiloma humano, así como también estrategias para diagnóstico diferencial de fiebre aftosa y otras enfermedades similares usando un ensayo múltiple de RT-PCR basado en microesferas, una alternativa eficaz para tamizaje y vigilancia en medicina veterinaria [5].

En conclusión; es claro que la metodología basada en xMAP ya ha sido empleado con éxito para el diagnóstico de diversas enfermedades genéticas e infecciosas, tanto en medicina humana como veterinaria; por ende, consideramos adecuada su aplicación para la detección de exposición al virus y desarrollo de inmunidad humoral contra SARS-CoV-2, con particular interés en el desarrollo de un método, con aplicaciones epidemiológicas que permita distinguir esta enfermedad de otras patologías con sintomatología similar. Esto debido a que se ha encontrado que hasta 28% de los casos de sospecha de COVID-19 representan en realidad infecciones de influenza, lo que indica que los pacientes deben someterse a un examen con un panel rápido de agentes patógenos respiratorios dado que el diagnóstico diferencial es muy amplio dados los signos y síntomas inespecíficos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método serológico basado en xMAP para la detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2 y adicionalmente contra antígenos de otros patógenos virales de importancia epidemiológica en México.

METODOLOGÍA GENERAL

Antígenos virales

Para la detección de anticuerpos específicos, se emplearán proteínas recombinantes purificadas de los patógenos por analizar; en este sentido, se elegirán proteínas con poca variabilidad antigénica entre diferentes cepas (serovariedades) de los patógenos relacionados para evitar reacciones cruzadas y falsos positivos, aumentando la especificidad de las determinaciones:

- a. Dominio RBD de la proteína S; SARS-CoV-2.
- b. Proteína M (matriz); influenza tipo A.
- c. Proteína M (matriz); influenza tipo B.
- d. Proteína E (envoltura); DENV.
- e. Proteína E (envoltura); ZIKV.

Cualquiera de estas proteínas es de inclusión opcional para el análisis.

Acoplamiento de proteínas a las perlas

Las preparaciones de proteína se acoplarán a perlas magnéticas (*Bio-Plex Pro COOH, Luminex*) utilizando un método que se describe a continuación. Se utilizará un protocolo de incubación de 3 pasos para asegurar altos niveles de saturación de antígeno en las perlas. Brevemente, se resuspenderán 1.25×10^7 perlas en 250 μL de ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico 0.1 M (en buffer MES; pH 5, *Sigma-Aldrich*). A continuación, después de la agitación en vórtex (10 s) y la sonicación (20 s), se añadirán 750 μL de la proteína por acoplar en tampón MES y 25 μL de solución fresca de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC; *Sigma-Aldrich*) (50 mg/mL). La suspensión se agitará en vórtex y luego se incubará durante 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (RT) en un agitador orbital. Se añadirán 1 000 μL adicionales de proteína diluida, junto con 25 μL de EDC fresco, para incubar con las perlas durante 40 min en la oscuridad a RT en el agitador. El último paso de incubación se repetirá una vez más para un total de 3 incubaciones con la proteína. Se utilizará un imán (*DynaMag-5, Thermo Fisher Scientific*) para tubos de 5 mL para lavar las perlas (3 veces) con 3 000 μL de PBS con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA), 0.02% de Tween 20 y 0.05% de azida sódica (PBS-TBN; pH 7.4). Las cuentas se almacenarán en la oscuridad a 2-8°C en 1 mL de PBS-TBN. El procedimiento de acoplamiento se optimizará en lo que respecta a la cantidad de antígeno, buffers y al tiempo de incubación, así como a las condiciones que proporcionen la mayor relación señal/ruido de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) al probar las perlas con sueros positivos control (en caso de estar disponibles).

Inmunoensayo múltiple

Las diferentes suspensiones de microesferas recubiertas de antígeno se mezclarán con un vortex (10 s) y se diluirán a una concentración de 8×10^4 microesferas/mL en un

solo volumen de buffer de ensayo A (PBS 0.05 M, 0.05% Tween, 1% BSA, 0.5 M NaCl). Después de la agitación (10 s) y la sonicación (20 s), se añadirán 25 μ L de suspensión de microesferas a placas negras de fondo plano transparente y 96 pozos (*BioPlex Pro*, *Bio-Rad*) junto con 25 μ L de suero problema diluido en la solución ensayo A (dilución final del suero, 1:200). Todas las incubaciones se realizarán a temperatura ambiente en la oscuridad (cubiertas con papel de aluminio) en un agitador rotatorio. Las placas se incubarán durante 45 minutos y se lavarán con buffer de lavado (PBS, 0.05% Tween) utilizando un lavador de placas automatizado para perlas magnéticas (*BioPlex Pro*, *Bio-Rad*). A continuación, los anticuerpos de detección conjugados con biotina (anti-IgM humano y anti-IgG humano, de chivo) se diluirán 1:1 500 en buffer de ensayo B (PBS, 0.05% Tween, 1% BSA), se añadirán 25 μ L por pozo y se incubará con las perlas durante 30 min. Las placas se lavarán en el lavador de placas automatizado y se incubarán durante 30 min con 75 μ L de estreptavidina-PE diluida 1:700 en buffer de ensayo B. Las placas se agitarán en agitador rotatorio durante 30 s, y las muestras se leerán en una plataforma citométrica de flujo dedicada al análisis multiplexado (lector *Bio-Plex 200*, *Bio-Rad*) que se ajustará para adquirir una muestra de 50 μ L y contar un mínimo de 50 perlas/análisis. Todas las muestras se analizarán por duplicado y los datos se adquirirán utilizando el software de la plataforma (*software BioPlex Manager v.6.1*, *Bio-Rad*).

Toda la metodología se esquematiza en la Figura 3.

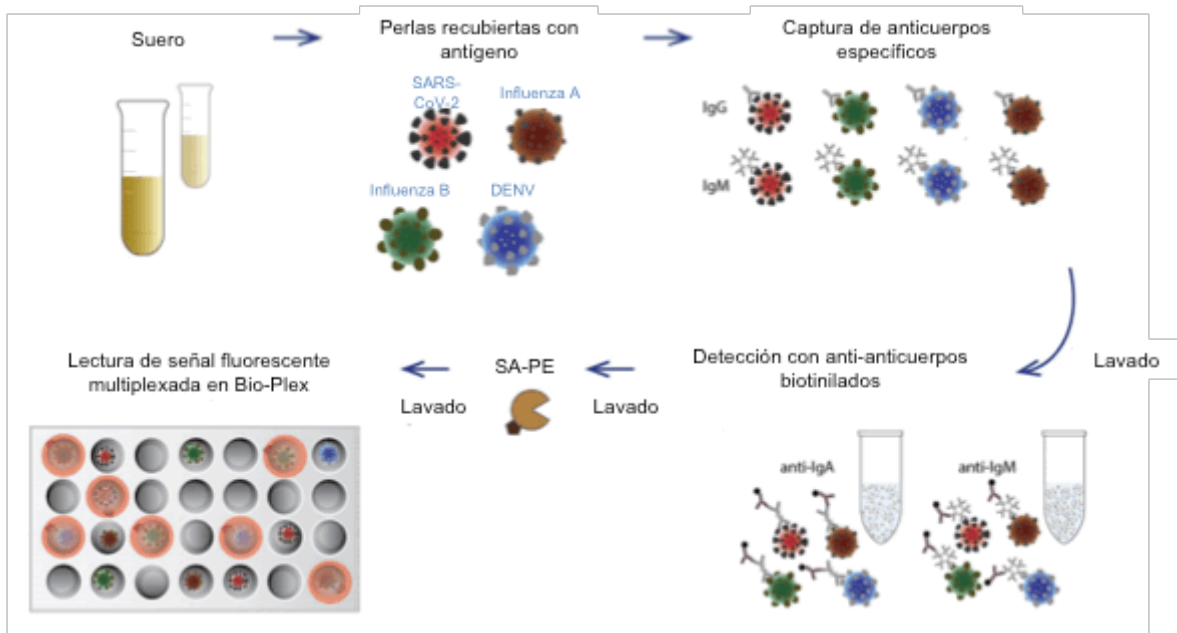


Figura 3. Flujo metodológico para el acoplamiento antigénico a las perlas magnéticas y montaje del método xMAP.

Validación del método

Para el caso de métodos xMAP no cuantitativos, el nivel de anticuerpos detectables en las muestras problema no se expresa como un título (a diferencia de un ELISA), es decir, la máxima dilución de suero que aún permite la detección del anticuerpo. En cambio, el nivel de estos analitos se expresa como un valor de “índice de anticuerpos”. Es importante aclarar el término índice de anticuerpos en este contexto, que nos indica la relación entre la señal derivada de los anticuerpos en el suero de un paciente y la señal de una muestra calibradora, conteniendo anticuerpos positivos para el antígeno en cuestión, utilizado en el ensayo. El calibrador se utiliza para una diferenciación óptima entre las muestras negativas y positivas y hace que la prueba sea más fiable que cuando se utilizarían valores de corte absolutos para las señales medidas en el ensayo (que representa otra opción válida, aunque menos precisa, para expresar un resultado). En pruebas serológicas similares, típicamente un valor de índice inferior a 0.20 se considera seronegativo, entre 0.20 y 0.40 indeterminado (lo que requiere más pruebas) y superior a 0.40 implica un estado de seropositividad.

Las muestras calibradoras se pueden obtener de repositorios comerciales avalados por la OMS para patógenos epidémicos ya circulantes desde hace algunos años (como en el caso de la influenza o DENV); sin embargo, para el caso de SARS-CoV-2, al no tener esta opción disponible, procederemos a emplear un *pool* de sueros derivados de pacientes convalecientes, confirmados para COVID-19.

Para la validación del método se procederá de igual forma al análisis de sueros de pacientes convalecientes o que sean de reciente diagnóstico por RT-PCR, para la detección de los anticuerpos IgG e IgM respectivamente; en este sentido se emplearán TODOS los sueros disponibles para este propósito:

- Para el caso de los pacientes COVID-19, se podrán emplear las muestras de seguimiento obtenidas de los pacientes confirmados, que fueron reclutados para el protocolo del Departamento de Infectología del INCMNSZ, colectadas después de uno-dos meses de la ausencia de síntomas o en el momento que indique dicho protocolo.
- Para el caso de pacientes de otras patologías virales y de individuos no expuestos (sueros pre-pandemia), se buscarán muestras de suero disponibles en el Departamento de Infectología del INCMNSZ o en otras fuentes posibles.

Con los valores obtenidos se procederá a calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica, al emplear también sueros de individuos no expuestos (negativos) sin síntomas recientes para infección.

REFERENCIAS

1. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. Tai W, Zhang X, He Y, Jiang S, Du L. *Antiviral Res.* 2020 May 13;179:104820. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104820. Online ahead of print. PMID: 32458809
2. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. Loeffelholz MJ, Tang YW. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):747-756. doi: 10.1080/22221751.2020.1745095. PMID: 32196430
3. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. Bohn MK, Lippi G, Horvath A, Sethi S, Koch D, Ferrari M, Wang CB, Mancini N, Steele S, Adeli K. *Clin Chem Lab Med.* 2020 May 27:/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0722/cclm-2020-0722.xml. doi: 10.1515/cclm-2020-0722. Online ahead of print. PMID: 32459192
4. Development and implementation of a proficiency testing program for Luminex bead-based cytokine assays. Lynch HE, Sanchez AM, D'Souza MP, Rountree W, Denny TN, Kalos M, Sempowski GD. *J Immunol Methods.* 2014 Jul;409:62-71. doi: 10.1016/j.jim.2014.04.011. Epub 2014 May 4. PMID: 24801479
5. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. Graham H, Chandler DJ, Dunbar SA. *Methods.* 2019 Apr 1;158:2-11. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.01.007. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30659874