

Tira rápida para el diagnóstico de SARS Cov-2 mediante detección de la proteína N en exudados nasofaríngeos

Autores: Carlos Hernández Díaz
Daymí Abreu Remedios
Magalis Delgado Rigo
Reinaldo Blanco Avila
Dayamí Dorta Hernández
Andy G Domínguez Rodríguez

Selección de un par de anticuerpos monoclonales para prototipo de tira de detección de proteína N del SARS Cov 2

AcM	Kaf (L/mol)
CovN1	$(3,99 \pm 1,53) \times 10^8$
CovN2	$(5,47 \pm 1,13) \times 10^8$
CovN3	$(3,26 \pm 0,29) \times 10^9$
CovN7	$(9,04 \pm 1,58) \times 10^8$
CovN9	$(8,52 \pm 0,96) \times 10^8$
CovN10	$(1,65 \pm 0,43) \times 10^9$
CovN13	$(6,99 \pm 2,43) \times 10^8$

Par de AcM CovN3 y CovN10

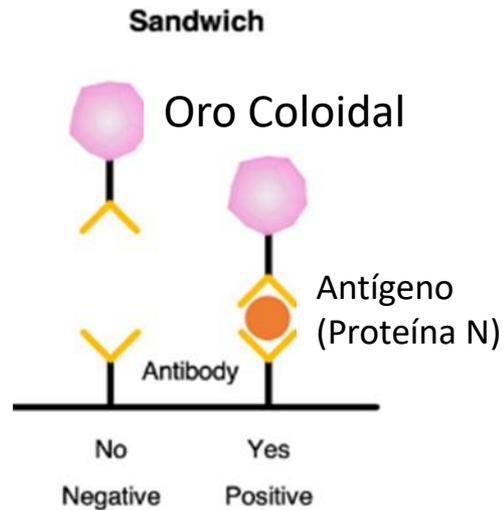
↓
Anticuerpos monoclonales de mayor afinidad

AcM	Cov 1	Cov 2	Cov 3	Cov 7	Cov 9	Cov 10	Cov 13
Cov 1	-5,76	1,61	NE	NE	14,56	47,66	40,37
Cov 2		-14,46	9,46	-10,94	11,58	41,11	53,46
Cov3			-11,63	10,81	46,02	70,29	NE
Cov7				-5,91	19,64	60,72	NE
Cov 9					-5,41	56,98	46,06
Cov 10						1,87	1,51
Cov 13							-0,3

Par de anticuerpos de probada funcionalidad en ELISA de detección de antígenos (UMELISA SARS Cov2 de antígeno, CIE) .

Par con mayor *índice de aditividad*, reconocen epítomos más distantes en la molécula de proteína N

Tira rápida para detección de antígeno (proteína N del SARS Cov 2) en formato Sandwich



Variantes evaluadas

1.

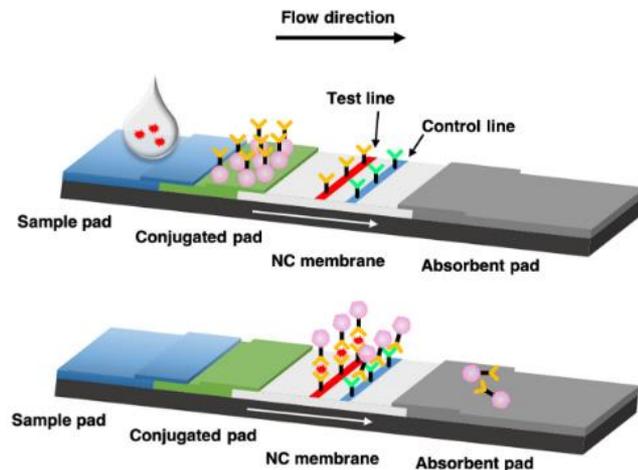
Línea específica: AcP anti N
Línea Control: AcP anti especie
Conjugado: AcM CovN3-oro o AcM CovN10-oro

2.

Línea específica: AcM covN3
Línea Control: AcP anti especie
Conjugado: AcM CovN10-oro

3.

Línea específica: AcM CovN10
Línea Control: AcP anti especie
Conjugado: AcM CovN3-oro



- La variante 2 fue la seleccionada
- El AcM CovN10 es el que mejor se conjuga a oro coloidal

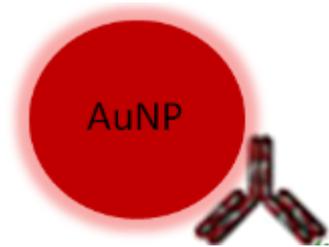
Desarrollo de la tira inmunoreactiva

AcM CovN10

- IgG 1
- Punto isoelectrico e/ 7 y 8,5

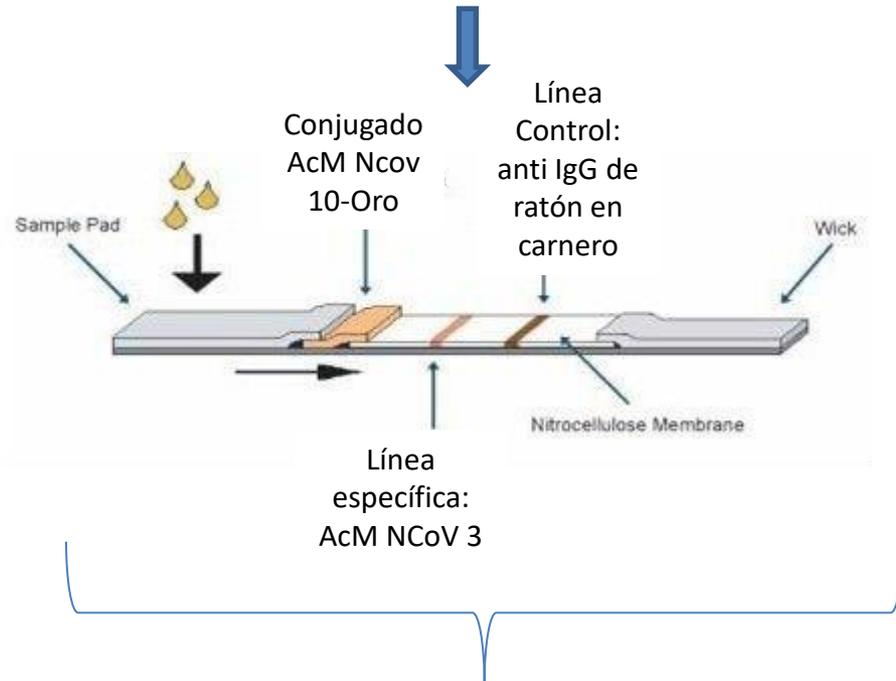


Diálisis en buffer borato 2mM, pH 9



Conjugación a oro coloidal de 40 nm

Membranas de nitrocelulosa de 10 μ m



Los componentes de las líneas control y específica se recubren disueltos en 20 mM de PBS+2,5% de Isopropanol+0,05% de SDS

Detección de proteína N recombinante

Proteína N (ng/mL)

200 50 12,5 3,13 0,78



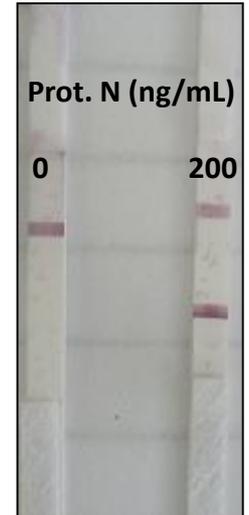
+ + + + +

La tira detecta hasta 0,78 ng/mL de proteína N recombinante

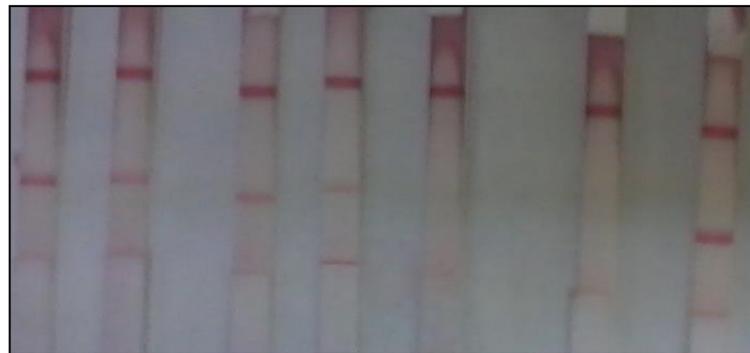
Funcionalidad de la tira en vehículo de exudado nasofaríngeo de Biocen



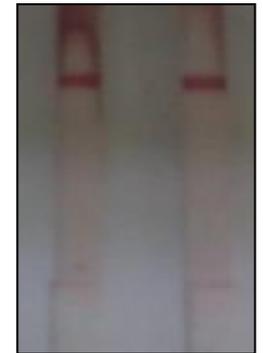
Esto permite evaluar muestras ya evaluadas por PCR



Evaluación en el Laboratorio de Biología Molecular de Sancti Spíritus (MINSAP) con muestras SARS CoV-2 positivas y negativas por PCR



+ + + + +débil +débil +



- -

La tira detecta la proteína N nativa (9 positivas de 10 evaluadas)

Evaluación del tiempo de extracción de la proteína N a partir de aislados virales no inactivados, con el buffer de extracción CIGB-SS.

Variante D614-G del SARS Cov- 2

Tiempo de extracción

1min

5min

10min



Virus puro

Concentración virus: 1000 TCID50/mL

Tiempo de extracción

1min

5min

10min



Concentración virus: 100 TCID50/mL

Fueron evaluadas otras 3 diferentes variantes virales, demostrándose reconocimiento específico en todos los casos : Cepas B, Delta y Omicron

Conclusiones :

- La tira detecta la proteína N de aislados virales activos del SARS Cov-2
- Es sensible a la disminución de concentraciones virales
- El tiempo de extracción se hace importante a medida que disminuye la concentración de virus
- A una Cx viral de 10 TCID50/mL aún vimos señales , aunque demasiado bajas, con D614-G

Nota: La literatura reporta que los kits comerciales de detección de antígenos tienen límites de detección entre 100-400 TCID50/mL

Conclusiones

- Se obtuvo un prototipo de tira rápida para la detección de la proteína N del SARS Cov 2 en exudados nasofaríngeos.
- La detectabilidad de la tira desarrollada está en el orden de lo que se reporta en la literatura para este tipo de inmunoensayo.
- La tira detecta la proteína N de aislados virales activos del SARS Cov-2