

Producción de un material de referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2

Daniela Zambrano Solano

Universidad de Pamplona

Facultad de Ingenierías y arquitectura

Programa de Ingeniería Química

Pamplona Norte del Santander

2022

Producción de un material de referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2

Daniela Zambrano Solano

Trabajo de grado para optar al título de ingeniera química

Director

Álvaro Eulalio Villamizar Villamizar

Ing. Químico MSc

Codirectores

Daniel Iván Barrera Valderrama

QA., Mg., Dr.

María Mercedes Arias Cortes

Qca., Ms., Sc.

Universidad de Pamplona

Facultad de Ingenierías y arquitectura

Programa de Ingeniería Química

Pamplona Norte del Santander

2022

Nota De Aceptación

Director

Álvaro Eulalio Villamizar Villamizar

Ing. Químico MSc

Codirectores

Daniel Iván Barrera Valderrama

QA., Mg., Dr.

María Mercedes Arias Cortes

Qca., Ms., Sc.

Firma de Jurado

Firma de Jurado

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado principalmente a Dios, por haberme dado una vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi familia en especial a mis padres, Ancizar Zambrano y Gloria Amparo Solano Sánchez, por ser los pilares más importantes y por demostrarme siempre su cariño, su amor incondicional, trabajo y sacrificio. A mis hermanos Sebastian y Valentina por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

Finalmente, a mis compañeras en especial Yesmhind Daniela y Karol Andrea amigas que durante todo el proceso de nuestra carrera nos dimos ese apoyo mutuo y ánimo para poder culminar nuestra carrera, profesores y todos aquellos que formaron parte con su apoyo y compartiéndome sus conocimientos a lo largo de esta formación.

AGRADECIMIENTOS

A mi director Álvaro Eulalio Villamizar Villamizar y mis codirectores Daniel Iván Barrera Valderrama y María Mercedes Arias Cortes por el acompañamiento, motivación y orientación en este proceso de mi proyecto. Sin ustedes y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado.

A mi madre y mi padre quienes son ejemplo que, con sacrificio y lucha, me han demostrado siempre amor incondicional y me han llevado a ser quien soy en la vida. Hoy cuando concluyo mis estudios, les dedico a ustedes este logro, como una meta más en mi vida y en la cual siempre me han apoyado en todo lo que me propongo, orgullosa y agradecida de que Dios me diera una familia tan bonita y que estén a mi lado en este momento tan importante. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

Al Instituto Nacional de Metrología por el apoyo y su disposición para brindarme lo necesario para llevar a cabo el desarrollo de mi trabajo de grado.

Agradezco a la Universidad de Pamplona, también a todos los docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo, siendo parte de mi formación profesional.

Tabla de contenido

RESUMEN	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	22
4.1. Marco teórico	22
4.1.1. Estructura del SARS-CoV-2	22
4.1.2. Pruebas de diagnóstico para el SARS-CoV-2.....	23
4.1.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	24
4.2. Estado del arte.....	27
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1. Desarrollo metodológico.....	31
5.1.1. Revisión bibliográfica	31

5.1.2. Planeación de producción	32
5.1.3. Preparación del candidato a material de referencia	37
5.1.4. Caracterización del candidato a material de referencia	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	53
6.1. Resultados	53
6.1.1. Preparación del Material	53
6.1.2. Caracterización del candidato a material de referencia	54
6.2. Discusión.....	64
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES.....	66
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
10. ANEXOS	72

Listado de tablas

Tabla 1 Diseño experimental de Homogeneidad del candidato a Material de Referencia	39
Tabla 2 Medición de la propiedad	40
Tabla 3 Expresiones para calculo ANOVA de un factor	41
Tabla 4 Criterios de aceptación.....	43
Tabla 5 Análisis de la tabla de varianza para la regresión lineal	43
Tabla 6 Botellas asignadas de forma completamente aleatorizada para Homogeneidad	44
Tabla 7 Organización aleatorizada en la microplaca ELISA para medición de homogeneidad...	45
Tabla 8 Botellas asignadas de forma completamente aleatorizada para estabilidad a corto plazo	51
Tabla 9 Organización aleatorizada en la microplaca ELISA para medición de Estabilidad a corto plazo.....	51
Tabla 10 Volumen para dilución de control de 1.5 y 5 ($\mu\text{g/mL}$)	54
Tabla 11 Preparación del buffer 1X.....	54
Tabla 12 Resultados de evaluación de Homogeneidad por ELISA indirecto.....	56
Tabla 13 Análisis de varianza ANOVA.....	57
Tabla 14 Análisis de regresión para evaluación de estabilidad a corto plazo a temperatura de 4°C	58
Tabla 15 Análisis de regresión para evaluación de estabilidad a corto plazo a temperatura de -20 °C	59
Tabla 16 Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de 4 y -80°C..	60
Tabla 17 Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de -20 y -80°C	61

Tabla 18 Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de 4 y -80°C

(Eliminación de valores atípicos) 62

Tabla 19 Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de -20 y -80°C

(Eliminación de valores atípicos) 63

Listado de figuras

Figura 1 Estructura del SARS-CoV-2 (José Eduardo Oliva Marín, 2020).....	22
Figura 2 Diseño microplaca ELISA (Robert Hnasko, 2015).....	25
Figura 3 Balanza Sartorius AF06560 con capacidad de 220g y resolución 0.01mg. Fuente propia	33
Figura 4 Juego de pesas E2 marca OIML. Fuente propia.....	33
Figura 5 Buffer de resuspensión aforado a 25 mL. Fuente propia.....	34
Figura 6 Buffer de resuspensión. Fuente propia	34
Figura 7 Equipo autoclave para la esterilización marca PHCbi MLS-3751L. Fuente propia	35
Figura 8 Buffer Carbonatos. Fuente propia	35
Figura 9 Diseño de etiqueta para el Material de Referencia	36
Figura 10 Preparación del candidato a material de referencia. Fuente propia.....	37
Figura 11 Dispensación de 330 μ L del candidato a MR. Fuente propia.....	38
Figura 12 Candidatos a material de referencia para la evaluación de Homogeneidad y Estabilidad. Fuente propia	38
Figura 13 Ejemplo de la evaluación de homogeneidad dentro y entre botellas (Adriana Liceth Rodríguez Torres, 2021).....	42
Figura 14 Botellas asignadas de forma completamente aleatorizadas para Homogeneidad. Fuente propia	45
Figura 15 Organización aleatorizada en la microplaca ELISA Costar N° 2240096 para medición de Homogeneidad. Fuente propia	46

Figura 16 Solución de lavado buffer PBS 1X en el procedimiento activación de placa y unión de antígeno. Fuente propia	46
Figura 17 Aplicación de 300 μ L de la solución de bloqueo. Fuente propia	47
Figura 18 (A) Anticuerpo primario dilución 1:1000. (B) Anticuerpo secundario dilución 1:5000 en PBS 1X. Fuente propia	48
Figura 19 Aplicación de los 100 μ L de la solución de revelado. Fuente propia.....	50
Figura 20 Solución de revelado después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Fuente propia	50
Figura 21 Lector de placas VARIOUSKAN LUX. Fuente propia	50
Figura 22 Botellas asignadas de forma completamente aleatorizadas para homogeneidad. Fuente propia	52
Figura 23 Evaluación de la fluorescencia del Material de referencia en función del envasado. Los círculos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.	55
Figura 24 Fluorescencia del candidato a Material de Referencia en función del almacenamiento a corto plazo (4°C). Los rombos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.	58
Figura 25 Fluorescencia del candidato a Material de Referencia en función del almacenamiento a corto plazo (-20°C). Los rombos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.	59

Índice de abreviaturas

µL: Microlitro.

AAA: Análisis de aminoácidos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Ag: Antígeno.

ANOVA: Análisis de varianza.

ARN: Ácido ribonucleico.

Cq: Ciclo de amplificación.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IC: Índice de confianza.

INM: Instituto Nacional de Metrología.

k: Factor de cobertura.

LC-ID-MS/MS: Cromatografía líquida de doble dilución isotópica-espectrometría de masas en tándem.

LC-SEC: Cromatografía líquida de exclusión por tamaño.

mL: Mililitro.

MR: Material de referencia.

MS: Media cuadrática (ANOVA).

NAT: Pruebas de ácido nucleico.

NTC: Normas Técnica Colombiana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDR: Pruebas de diagnóstico rápido.

SMQB: Subdirección de Metrología de Química y Biología.

SS: Suma de los cuadrados (ANOVA).

SS_{lab}: Desviación estándar de la homogeneidad entre botellas.

SS_R: Desviación estándar de la homogeneidad dentro de las botellas.

U_{dentro}: Homogeneidad dentro botellas.

U_{entre}: Homogeneidad entre botellas.

UV-Vis: Espectroscopia ultravioleta-visible.

X_{kj}: Resultado de una sola medición en el experimento (ANOVA).

Resumen

El método de diagnóstico más usado para la detección del coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo (SARS-CoV-2) es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés), no obstante, han surgido otros procedimientos alternativos que la complementan tales como los basados en el análisis de antígenos o de anticuerpos, y otros menos comunes como los basados en biosensores y compuestos orgánicos volátiles (VOCs). A pesar de su uso frecuente en el diagnóstico para análisis basados en antígenos no se cuenta con herramientas para el aseguramiento de la validez de los resultados, por ello en el Instituto Nacional de Metrología en el desarrollo de esta pasantía empresarial enmarcada en el programa ESTADO JOVEN se evaluó la estabilidad y homogeneidad a corto plazo en temperaturas de 4, -20 y -80°C de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671). Estas dos variables, se determinaron mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario en la prueba de ELISA indirecto. Los resultados muestran que el candidato a Material de Referencia fue estable y homogéneo a corto plazo en las temperaturas estudiadas. La producción en masa de este MR dependerá de los estudios a largo plazo.

Palabras clave: COVID-19, estabilidad, homogeneidad, material de referencia, proteína *Spike*, SARS-CoV-2.

Abstract

The most widely used diagnostic method for the detection of the coronavirus causing Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV-2) is the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), however, other alternative procedures have emerged to complement it such as those based on antigen or antibody analysis, and other less common ones such as those based on biosensors and volatile organic compounds (VOCs). In spite of their frequent use in diagnosis for antigen-based analysis, there are no tools available to ensure the validity of the results. Therefore, at the National Metrology Institute, during the development of this business internship within the framework of the STATE YOUNG program, the short-term stability and homogeneity of the SARS-CoV-2 Spike protein (Invitrogen RP-87671) was evaluated at temperatures of 4, -20 and -80°C. These two variables were determined by means of a series of tests that were carried out in order to determine the validity of the results of the analysis. These two variables were determined by quantifying the fluorescence emitted by the secondary antibody in the indirect ELISA test. The results show that the candidate Reference Material was stable and homogeneous in the short term at the temperatures studied. Mass production of this RM will depend on long-term studies.

Keywords: COVID-19, stability, homogeneity, reference material, Spike protein, SARS-CoV-2.

1. Introducción

El SARS-CoV-2 es un miembro de la familia de los coronavirus, que comprende un grupo diverso de virus de ARN monocatenario de sentido positivo, grandes, envueltos, no segmentados (Benites, 2020). El virus del SARS-CoV-2, se caracteriza por una incidencia creciente de infecciones respiratorias, que van desde portadores asintomáticos hasta pacientes que padecen neumonía bilateral grave y dificultad respiratoria, es altamente transmisible y se propaga rápidamente a través de secreciones respiratorias infectadas. En este contexto por ser un virus con rápida y alta propagación, el diagnóstico temprano y confiable se convirtió en una pieza primordial para el control epidemiológico de la enfermedad por lo que se han desarrollado varias técnicas de diagnóstico entre las que se encuentran las técnicas directas para detección de antígenos o genoma con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas indirectas para la detección de anticuerpos por medio de inmunocromatografía o ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), de las cuales la PCR es considerada la técnica de referencia por su alta sensibilidad y especificidad (Tenorio-Abreu et al., 2022).

Aunque la PCR con transcripción reversa (RT-PCR) es la técnica comúnmente utilizada para la detección del SARS-CoV-2 y recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), aún tiene algunas limitaciones, entre ellas, las tasas de falsos positivos o falsos negativos detectados en pacientes que presentan SARS-CoV-2, la baja disponibilidad de reactivos y *kits* de PCR y el proceso extenso de la técnica (Ropert et al., 2021).

Como opción a las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, la OMS recomienda las pruebas de antígenos virales para la detección de la infección por SARS-CoV-2 ya que estas pruebas son más económicas y sencillas de operar, además de brindar resultados más rápidos;

esto permite a los encargados de formular políticas y a los proveedores de atención médica asegurar una cobertura de pruebas de manera significativamente mayor en un periodo de tiempo relativamente más corto.

Se ha investigado el uso de la proteína *Spike* como uno de los instrumentos idóneos para el desarrollo de novedosas pruebas alternativas para la detección de los antígenos virales. Teniendo en cuenta que juega un papel importante en la infección y diseminación del SARS-CoV-2, la proteína *Spike* se ha convertido en una herramienta empleada en el desarrollo de nuevos inmunoensayos destinados a la detección del SARS-CoV-2 (Nascimento et al., 2022). La proteína *Spike* del SARS-CoV-2 está conformada por (i) un dominio de unión al receptor (RBD), que se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2) y media el acceso del coronavirus en las células huésped y (ii) un dominio de fusión, que une la célula huésped y las membranas virales por medio del C-terminal S2 subunidad (Moctezuma, 2021).

Aunque entre las ventajas de los métodos serológicos se encuentran la facilidad de uso y bajos requerimientos de tiempo para la obtención de resultados, en el mercado es escasa la disponibilidad de materiales de referencia basados en proteína que permitan el aseguramiento de la calidad de estas mediciones. En las mediciones químicas y biológicas, los materiales de referencia son las herramientas clave tanto para el aseguramiento de validez de los resultados como para establecimiento de la cadena de trazabilidad que permite la comparabilidad de las mediciones obtenidas en laboratorios y tiempos diferentes.

En Colombia, el Instituto Nacional de Metrología (INM) es la entidad coordinadora de la metrología científica e industrial y tiene dentro de sus funciones la producción de materiales de referencia requeridos por el país, para lo cual el INM cuenta con un sistema de gestión de la

calidad basado en la Norma ISO 17034 que brinda los requisitos para la competencia de los productores de materiales de referencia. Por lo anterior, y en el marco del programa Estado Joven, el propósito de este trabajo es desarrollar un material de referencia de la proteína *Spike* en solución el cual contribuirá a la confiabilidad de pruebas inmunológicas en la detección del virus del SARS-CoV-2.

2. Planteamiento del problema y justificación

En la lucha contra la enfermedad causada por la infección con SARS-CoV-2, un aspecto fundamental para contener y manejar la enfermedad es detectar correctamente a las personas infectadas para lo cual son fundamentales los métodos de diagnóstico. El método más usado es RT-PCR que detecta la presencia de ARN viral, esta prueba molecular es útil durante las primeras 3 semanas de infección y es el método de referencia recomendado por la OMS; sin embargo, la prueba tiene algunos inconvenientes: Alto costo, difícil de implementar en escenarios con recursos limitados, sensibilidad variable según el tipo de muestra y del periodo de infección (Vidal-Anzardo et al., 2020).

A la fecha, se han desarrollado múltiples pruebas de diagnóstico rápido (PDR) que utilizan reacciones antígeno-anticuerpo, y dentro de estas pruebas se distinguen los que detectan antígenos como la proteína *Spike* (proteína de membrana del virus SARS-CoV-2) (Montes, 2018). Generalmente, estas son pruebas cualitativas con resultados positivos o negativos. Un resultado positivo indica una infección actual por SARS-CoV-2, ya que la detección de antígenos virales implica una replicación viral activa, mientras que un resultado negativo indica la ausencia de ésta. No obstante, la sensibilidad de la prueba hace posible la presencia de falsos positivos y negativos, aunque según lo reportado por algunos laboratorios la prueba no presenta reactividad cruzada con otros virus incluidos los coronavirus. Adicionalmente, por la experiencia con PDR de detección de antígenos (Ag) de otros virus respiratorios como la influenza, la OMS indica que si las concentraciones de la carga del virus de la influenza en muestras respiratorias son similares a las observadas en COVID-19, la sensibilidad podría variar entre el 34% y el 80% (Mamiko, 2020).

Hasta el momento, las pruebas de RT-PCR son las recomendadas por el sistema de salud, sin embargo, el ensayo enzimático (ELISA) es una de las técnicas que se ha caracterizado como herramienta de investigación y diagnóstico para la detección del SARS-CoV-2, permitiendo detectar la infección tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos. ELISA es una técnica sencilla y simple de automatizar que permite realizar pruebas con un alto rendimiento a bajo costo (Domínguez, 2019). Como uno de los inmunoensayos más sensibles, ELISA ofrece valor comercial en investigación de laboratorio, diagnóstico de biomarcadores de enfermedades, control de calidad y seguimiento en diversas industrias. Esta técnica utiliza anticuerpos ligados a enzimas que se unen a antígenos de superficie. Luego se agrega sustrato para producir un cambio de color o una señal de luz que se correlaciona con la cantidad de antígeno presente en la muestra original (Hnasko, 2015).

A pesar de tener ventajas significativas, los materiales de referencia de proteínas son escasos pero debido a esto se ha aumentado su necesidad por su rápida detección del virus, ofreciendo ventajas significativas al respaldar la precisión de medición y la confiabilidad que estos brindan, para ello se utilizan métodos como los inmunoensayos de placas enzimáticas, el cual evalúa cuantitativamente las respuestas de anticuerpos a los patógenos, incluido el SARS-CoV-2 (Stocks et al., 2022).

Para abordar esta falta de herramientas para el aseguramiento de la validez de los resultados para las pruebas rápidas de detección basadas en proteínas, el Instituto Nacional de Metrología desarrollará un material de referencia de la proteína *Spike* en solución, que sirva de patrón o control positivo para las pruebas de antígeno lo que contribuirá a aumentar la confiabilidad de los resultados de las pruebas inmunológicas para detectar el virus SARS-CoV-2.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Producir un material de referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2, a partir de un extracto proteico comercial para ser usada como herramienta de aseguramiento de la validez de resultados en las mediciones de inmunoensayos.

3.2. Objetivos específicos

- Elaborar un plan de producción de material de referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2.
- Preparar un material de referencia piloto siguiendo los lineamientos del Sistema Integrado de Gestión del INM.
- Evaluar la idoneidad del MR de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2 para su uso en el control de la calidad de métodos basados en inmunoensayos.

4. Marco teórico y estado del arte

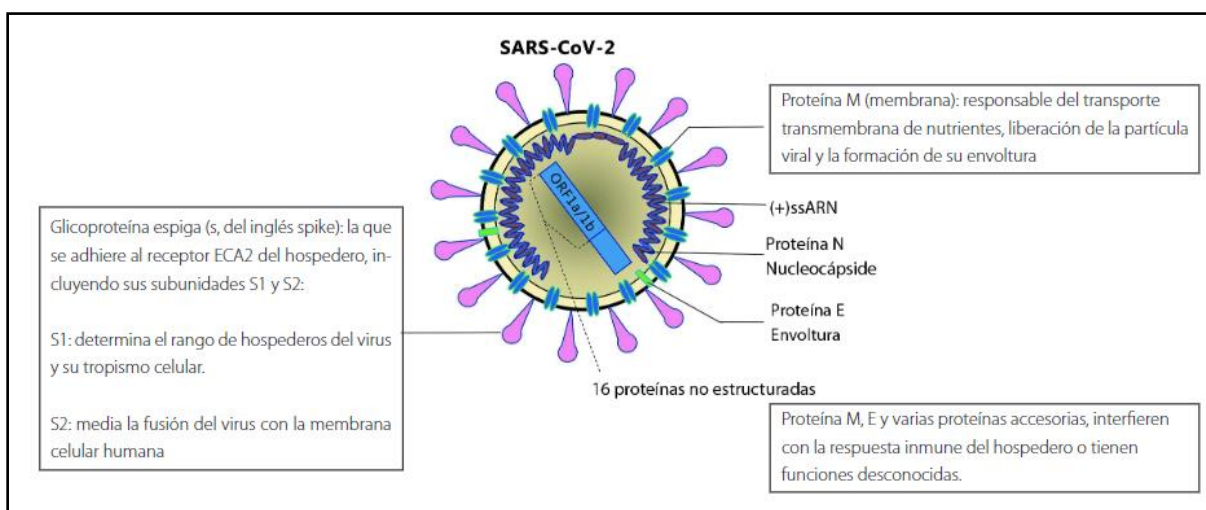
4.1. Marco teórico

4.1.1. Estructura del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2, es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, responsable del síndrome respiratorio agudo severo conocido como COVID-19, su estructura se observa en la Figura 1 (Oliva, 2020). El SARS-CoV-2 infecta las células epiteliales de las vías respiratorias humanas al unirse al receptor de superficie celular enzima convertidora de angiotensina 2 (Zhao et al., 2020). Las interacciones patógeno-huésped están mediadas por la proteína viral de membrana *Spike* (Moctezuma, 2021) por lo cual actualmente esta interacción es objeto de estudio.

Figura 1

Estructura del SARS-CoV-2 (Oliva, 2020).



Adicionalmente, se ha observado que la proteína *Spike* presenta epítopes reactivos al sistema inmunológico humano generando la producción de anticuerpos contra esta, lo que la convierte en una diana útil para la detección del virus mediante pruebas inmunológicas. La

detección directa de proteínas virales (antígenos) del SARS-CoV-2 en hisopos nasales y en otras secreciones respiratorias por medio de inmunoensayos de flujo lateral (también llamados pruebas de diagnóstico rápido (PDR)) proporciona una forma más rápida y económica que el método de referencia, es decir, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) (OMS, 2021)

4.1.2. Pruebas de diagnóstico para el SARS-CoV-2

Para muchas infecciones virales humanas como el virus de la influenza o el norovirus hay tres dianas de diagnóstico, los ácidos nucleicos, antígenos y anticuerpos (OMS, 2021). En el análisis basado en ácidos nucleicos busca detectar la infección activa y emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque generalmente esta es la prueba de referencia de detección, su implementación requiere muchos recursos, equipos especializados y personal capacitado.

Un antígeno es una sustancia la cual el cuerpo humano trata de combatir, es decir, eliminar o disminuir, proporcionando así una respuesta inmunológica, mientras que un anticuerpo, es una proteína producida por el cuerpo en respuesta a una sustancia desconocida, los anticuerpos se producen como parte del sistema inmunológico para protegerse (Bertha & Robledo, 2009). La prueba de antígeno diagnostica infecciones actuales mediante la detección de la presencia de virus. Por el contrario, las pruebas de anticuerpos usan proteínas virales inmovilizadas para capturar anticuerpos del suero de un paciente después de una infección previa y, por lo tanto, pueden usarse en programas de vigilancia viral, puesto que ayudan a establecer la magnitud de un brote o la amplitud de una infección en una población determinada. Las pruebas serológicas han despertado un interés considerable como medida alternativa o complementaria a la RT-PCR en el diagnóstico de infecciones agudas, ya que algunas pruebas pueden ser más económicas y fáciles de realizar.

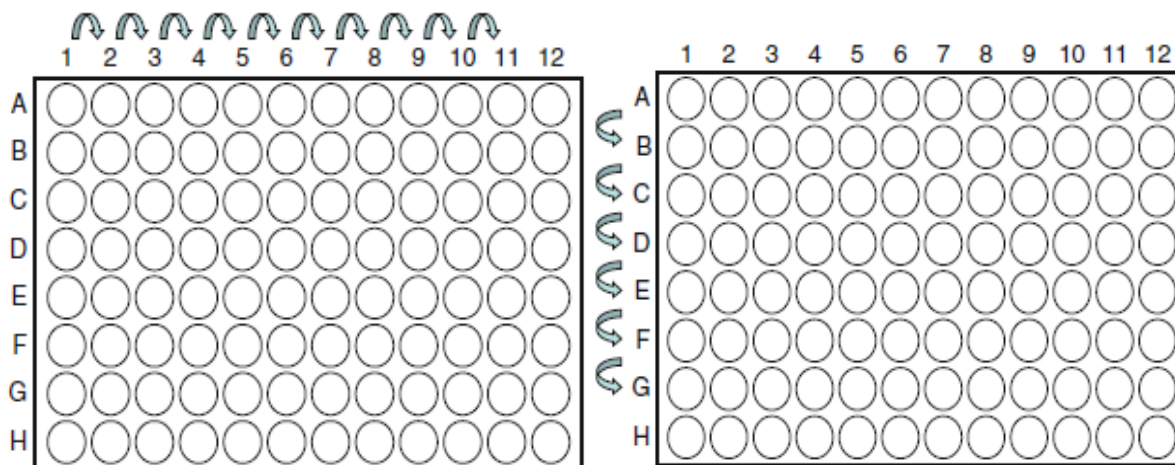
Es por ello que, los estudios serológicos tienen la posibilidad de contribuir a la investigación de un brote o conglomerado en curso, con la evaluación retrospectiva de la tasa de ataque o en casos donde las pruebas moleculares fueran negativas y existe un intenso parentesco epidemiológico y alta sospecha clínica y de laboratorio (Gallegos et al., 2020).

4.1.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Descrito por primera ocasión por Engvall y Perlmann en 1971, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica basada en un anticuerpo marcado con una enzima capaz de identificar y cuantificar la proteína inmovilizada en un área sólida. El ELISA se hace comúnmente en placas de poliestireno de 96 o 384 pocillos donde el antígeno o el anticuerpo se integran por medio de absorción pasiva (Hnasko, 2015). Para ello los micropocillos se recubren con antígenos proteicos recombinantes del SARS-CoV-2 y se agregan muestras de biofluidos, el diseño de la microplaca se observa en la Figura 2 (Hnasko, 2015). Si están presentes anticuerpos que reconocen el antígeno, están con un anticuerpo secundario, generalmente unido a una enzima distinta de la peroxidasa del rábano (HRP) que provoca un cambio medible al agregar un sustrato colorimétrico o quimioluminiscente (Colwill et al., 2022).

Figura 2

Diseño microplaca ELISA (Hnasko, 2015).



Las mediciones en las que se emplean complejos antígeno-anticuerpo se pueden evaluar de acuerdo con dos criterios: valorando directamente el complejo formado (inmunoensayo homogéneo) o retirando las moléculas no conjugadas del medio (inmunoensayo heterogéneo) (Montes, 2018). Los inmunoensayos más utilizados para la determinación de proteínas séricas son los homogéneos, en estos, la señal depende de factores como la especificidad del anticuerpo, la cinética y el equilibrio de la reacción, el estado multimérico de la proteína y el efecto matriz. La cuantificación de proteínas se basa principalmente en comparar los resultados de la medición con los obtenidos con las soluciones de patrón (Zegers et al., 2010). Los materiales de referencia formados por proteínas de interés en suero u otros fluidos biológicos son ideales para la validación mientras que las proteínas purificadas en solución son valiosas como calibradores y deben incorporarse a una matriz adecuada para simular muestras reales (Stocks et al., 2022).

Sin embargo, disponer de métodos de detección para el SARS-CoV-2 que sean capaces de brindar posibilidad y fiabilidad en el diagnóstico por laboratorio, es imprescindible. Los MR

actuales de SARS-CoV-2 para el diagnóstico molecular toman una variedad de formas, incluido el ADN plasmídico, el ARN transcrito *in vitro*, las partículas de virus que contienen ARN del SARS-CoV-2 y el propio virus SARS-CoV-2.

4.2. Estado del arte

Para el desarrollo del presente trabajo se tomaron en cuenta 4 artículos que en conjunto indican la elaboración de materiales de referencia para la detección del SARS-CoV-2, los cuales fueron publicados en los últimos 3 años. A continuación, se presentan los resultados más relevantes encontrados.

“Caracterización de un material de referencia de proteína de Spike SARS-CoV-2”.

elaborado por Bradley B. Stocks, Marie-Pier Thibeault, Joseph D. Schrag y Jeremy E. Melanson, en esta investigación se busca ayudar a la comunidad científica a superar el Covid-19, para ello el Consejo Nacional de Investigación de Canadá preparó un material de referencia de proteína de *Spike* de SARS-CoV-2. La asignación de valor se logró mediante el análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de doble dilución isotópica-espectrometría de masas en tándem (LC-ID-MS/MS) después de la hidrólisis ácida de la proteína, en combinación con espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) basada en absorbancia de triptófano y tirosina a 280 nm. La homogeneidad del material se estableció mediante lecturas espectrofotométricas de absorbancia a 280 nm. Las estabildades de transporte y almacenamiento a largo plazo se evaluaron mediante el control de los cambios relativos en el estado oligomérico mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño (LC-SEC) con detección UV. La concentración molar de la proteína *Spike* fue de $5,68 \pm 0,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($k = 2$, 95 % IC), con la forma trimérica nativa representando 94 % de la abundancia relativa. Como resultado, se ha autorizado el uso de más de 150 pruebas de este tipo solo en los EE. UU. y Canadá y se ha caracterizado un material de referencia de proteína de *Spike*, previsto para ser utilizado como fuente de proteína estándar para desarrollar pruebas serológicas y de antígenos de SARS-CoV-2. También se puede utilizar como un calibrador rastreable en el desarrollo de ensayos de

cuantificación de proteínas *Spike* (Stocks et al., 2022).

“Desarrollo de material de referencia de ARN empaquetado de SARS-CoV-2 para pruebas de ácido nucleico”. elaborado por Sang-Soo Lee, Seil Kim, Hee Min Yoo, Da-Hye Lee y Young-Kyung Bae, en esta investigación se busca evaluar la calidad de los laboratorios de análisis y la evaluación del rendimiento de los productos de diagnóstico molecular, con materiales de referencia (RM), para ello se informó la producción de un SARS-CoV-2 RM lentiviral que contiene aproximadamente 12 kilobases de su genoma, incluidos objetivos de diagnóstico comunes como el gen E que corresponde a un gen común a los betacoronavirus y los genes *RdRp*, *N* y *S* que corresponden a genes específicos del SARS-Cov-2. El RM se midió con múltiples ensayos utilizando dos plataformas de PCR digital diferentes. Para medir la homogeneidad y la estabilidad del SARS-CoV-2 RM lentiviral, se utilizó PCR digital de gotas de transcripción reversa (RT-ddPCR) con ensayos dúplex internos. La concentración del número de copias de cada gen diana en la solución de ARN extraído se convirtió luego en la de la solución RM. Como resultados el SARS-CoV-2 RM lentiviral imita de cerca las muestras reales que se someten a procesos preanalíticos idénticos para las pruebas moleculares del SARS-CoV-2 y al ofrecer valores de referencia precisos para el número absoluto de copias de los genes diana virales, el MR desarrollado se puede utilizar para mejorar la confiabilidad de las pruebas moleculares del SARS-CoV-2 (Lee et al., 2022).

“Ensayo de Aptitud: Detección del virus SARS-CoV-2 por RT-qPCR”. elaborado por Sergio Dávila, John Leguizamón, María Arias, Andrés León, Diego Ahumada, Gabriel Molina, Katherin Holguín, Antonio García, Luis Santos, Gustavo Gómez, Nicolás Vanoy, Cristina Barros

y Sergio Gómez. Como verificación técnica, el Instituto Nacional de Metrología y el Instituto Nacional de Salud, desarrolló un Ensayo de Aptitud cualitativo dirigido a la detección del virus del SARS-CoV-2 por la técnica de diagnóstico RT-qPCR. La evaluación se realizó con base al gen reportado por laboratorio, como resultados el 98.3% logro obtener un desempeño satisfactorio, mientras que el 1.7% obtuvo un desempeño no satisfactorio por lo menos en uno de los genes reportados. Para los laboratorios que obtuvieron un desempeño satisfactorio, considerando los criterios previamente establecidos (mayor o igual a 80 %), se encontró que 20 laboratorios (16.5 %), no pudieron determinar una de las muestras de los paneles entregados. En un total de 28 ensayos reportados; una de las inconvenientes encontrados fue el reporte de resultados de falsos negativos, falsos positivos, o no reportados (Leguizamon-Smqb et al., 2021).

“La producción y caracterización del material de referencia de ARN del SARS-CoV-2” elaborado por Sema Akyurek, Sumeyra Nur Sanal Demirci, Zeynep Bayrak, Alper Isleyen y Muslum Akgoz. En esta investigación se producen materiales de referencia de ARN transcritos *in vitro* del SARS-CoV-2, producido por el Consejo de Investigación Científica y Tecnológica de Turquía (TUBITAK), Instituto Nacional de Metrología (UME), para ser utilizados como referencia en el control de calidad para las mediciones de SARS-CoV-2, en forma de líquido congelado y liofilizado. Se demostró que ambos materiales de referencia son homogéneos para el uso previsto. Además de ello se realizaron estudios a corto plazo para imitar las condiciones de transporte y UME MR 2020, que se produce en forma liofilizada, como resultado el material de referencia permaneció estable durante 17 días incluso en 45 °C de temperatura. Los estudios de homogeneidad se evaluaron mediante RT-qPCR. La formulación liofilizada del material de

referencia tenía una mayor estabilidad, lo que permitiría enviarlo sin elementos refrigerantes. El desarrollo de tales materiales de referencia de ARN proporciona control de calidad para las pruebas de detección de virus basadas en ARN existentes y recientemente diseñadas y ayuda a la prevención y el control de epidemias (Akyurek et al., 2021).

5. Metodología

5.1. Desarrollo metodológico

La producción del piloto comprendió la resuspensión gravimétrica de 100 µg de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671) en 10 mL de buffer de resuspensión (Buffer PBS, pH 7.2, suplementado con 10% de glicerol v/v), para su posterior dilución en buffer carbonatos (0.05 M, pH 9.6), para obtener una concentración final de proteína de 2.5µL/mL. Una vez preparado se sirvieron 330 µL de la solución en viales de polipropileno (2mL) de tapa rosca y base, obteniendo así 103 viales para sus evaluaciones de homogeneidad y estabilidad. La caracterización y los estudios de homogeneidad y estabilidad se realizaron empleando el ensayo de ELISA indirecto.

La metodología y las actividades que se desarrollaron se describen a continuación:

5.1.1. Revisión bibliográfica

Se realizó una búsqueda sistemática de artículos en español e inglés, sobre las bases de datos de la biblioteca del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. y entre otras relacionados con el virus del SARS-CoV-2. Se tendrá en cuenta artículos recientes (desde diciembre de 2019 hasta noviembre del 2022) para obtener la información. Se espera con esta revisión mostrar la utilidad, la sensibilidad, especificidad y limitaciones de inmunoensayos que ayuden a un diagnóstico temprano del SARS-CoV-2. Este trabajo se desarrollará dando forma a los objetivos planteados.

5.1.2. Planeación de producción

Las actividades involucradas en la producción del material de referencia fueron documentadas en el formato planeación de producción M-03-F-003 del INM como se presenta en el anexo 1 y en el diagrama de producción del candidato a material de referencia como se observa en el anexo 2, los cuales tienen la información general del proyecto realizado, para la planeación de producción se abordaron los siguientes ítems.

5.1.2.1.Preparación espacio físico

Para la producción del material de referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2, se utilizaron los siguientes espacios físicos pertenecientes en el Instituto Nacional de Metrología:

Laboratorio de ADN

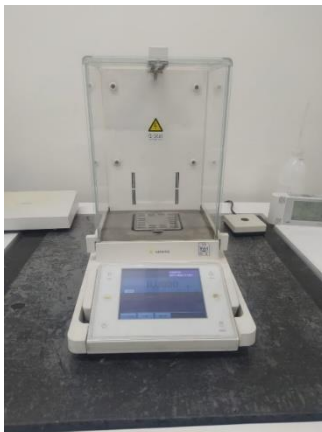
En el laboratorio de ADN se llevaron a cabo las actividades de producción y medición de la propiedad a candidatos a MR, previo a las cuales se realizó el respectivo proceso de limpieza según lo descrito en el el instructivo M-03-I-011 limpieza para áreas y superficies de laboratorios de Química.

Área de balanzas

El área de balanzas se utilizó con el fin de hacer los diferentes pesajes durante la producción del material de referencia, para ello se utilizó la balanza Sartorius AF06560 con capacidad de 220g y resolución 0.01mg como se observa en la Figura 3, la cual fue verificada antes de su uso empleando un juego de pesas E2 marca OIML con valor nominal de 1 mg- 500 mg Figura 4. Para el manejo y verificación de la balanza se siguió e instructivo M-03-L19-I-001 manejo de elementos de pesaje e igualmente se realizó el procedimiento de limpieza según el instructivo M-03-I-011.

Figura 3

Balanza Sartorius AF06560 con capacidad de 220g y resolución 0.01mg. Fuente propia

**Figura 4**

Juego de pesas E2 marca OIML. Fuente propia



5.1.2.2.Preparación del material ´

- **Buffer PBS 10X**

Se disolvieron 2g de Cloruro de potasio (KCl), 80g de Cloruro de sodio (NaCl), 14.4g Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4) y 2.4g Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 800 mL de agua tipo 1. Posteriormente, se ajustó el pH con el equipo 914 pH/DO/Conductometer marca Metrohm a 7.2 utilizando Ácido clorhídrico al 0.1M (HCl) e Hidróxido de sodio al 1M (NaOH). Finalmente, la solución se aforó a 1000 mL y se almacenó a 4°C.

- **Buffer de resuspensión**

Se mezclaron en un vaso precipitado 2.5 mL de buffer PBS 10X, 3 mL de glicerol al 85% y 10 mL de agua tipo 1. Posteriormente, se aforó la solución a 25 mL como se observa en la Figura 5 y 6, se esterilizó con el equipo de autoclave marca PHCbi MLS-3751L con capacidad de volumen de 50 litros e intervalos de temperatura de esterilización de 115° C a 135°C como se observa en la Figura 7 y se almacenó a 4°C.

Figura 5

Buffer de resuspensión aforado a 25 mL. Fuente propia



Figura 6

Buffer de resuspensión. Fuente propia

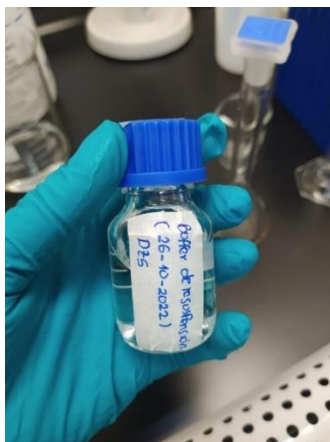


Figura 7

Equipo autoclave para la esterilización marca PHCbi MLS-3751L. Fuente propia



- **Buffer Carbonatos**

Para la preparación de buffer de carbonatos se procedió a pesar 0.1526 g de Carbonato de sodio Na_2CO_3 y 0.2943 g de Bicarbonato de sodio NaHCO_3 y se adicionaron 90 mL de agua tipo 1. Se ajustó a el pH con el equipo 914 pH/DO/Conductometer marca Metrohm a 9.6 utilizando Ácido clorhídrico al 0.1M (HCl) e Hidróxido de sodio al 1M (NaOH), y se aforó la solución a 100 mL figura 8, se esterilizó con el equipo de autoclave como se observa en la Figura 7.

Figura 8

Buffer Carbonatos. Fuente propia



- **Proteína *Spike***

Se empleó como material de partida 100 µg ($3,34672 \times 10^{14}$ µmol) de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671) almacenada a -20 °C para su posterior uso durante la preparación del material.

- **Etiquetado del material de referencia**

El etiquetado para el Material de Referencia se realizó siguiendo las recomendaciones de la Guía ISO 31 y el instructivo de codificación y etiquetado de los materiales de referencia M-03-I-014. Para ello se realizó el diseño de la etiqueta con mediciones de 3 cm de ancho y 2 cm de alto, la información prevista en la etiqueta debe servir sólo para identificar el MR y se limitó a especificar: Nombre del material, contenido aproximado, código interno del material y número del lote como se presenta en la Figura 9. Todos los viales empleados para el material se etiquetaron previo al envasado. Se emplearon etiquetas pre-impresas, plastificadas y resistentes a refrigeración,

Figura 9

Diseño de etiqueta para el Material de Referencia



5.1.3. Preparación del candidato a material de referencia

Se resuspendieron 100 μg de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671), en 10 mL de buffer de resuspensión (Buffer PBS, pH 7.2, suplementado con 10% de glicerol v/v), se homogenizó la solución con agitación por inversión durante 30 minutos utilizando el agitador rotativo MX-RD-PRO marca DLAM siguiendo el instructivo M-03-L24-I-017 manejo del agitador rotativo MX-RD-PRO. Posteriormente, se diluyó la solución en buffer carbonatos (0.05 M, pH 9.6) para obtener una concentración final de proteína de 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ como se observa en la Figura 10, la solución se homogenizó con agitación por inversión durante 60 minutos utilizando el agitador rotativo MX-RD-PRO. Una vez preparada, se dispensaron 103 viales de polipropileno de (2 mL) de tapa rosca y base con contenido de 330 μL del candidato a MR como se observa en la Figura 11 y 12.

Figura 10

Preparación del candidato a material de referencia. Fuente propia

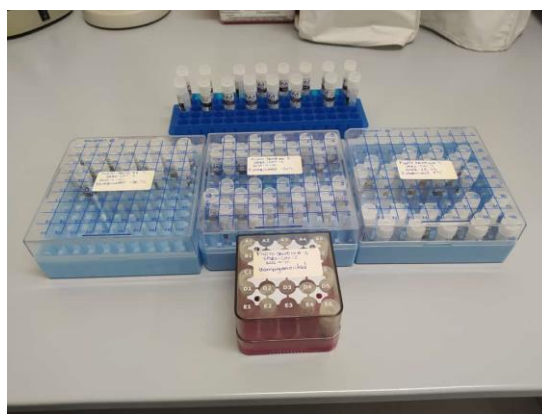


Figura 11

Dispensación de 330 μ L del candidato a MR. Fuente propia

**Figura 12**

Candidatos a material de referencia para la evaluación de Homogeneidad y Estabilidad. Fuente propia



5.1.4. Caracterización del candidato a material de referencia

5.1.4.1. Diseño experimental del candidato a material de referencia

A continuación, se muestra los diseños experimentales empleados para los estudios de homogeneidad, estabilidad y medición del valor de la propiedad del candidato a material de referencia, para ello se siguió el documento M-03-D-001 evaluación de la homogeneidad y estabilidad de materiales.

Homogeneidad

Se seleccionaron de manera aleatorizada un número de unidades representativas del candidato a material de referencia equivalente al 10% del número de unidades a preparar en este caso 11 viales, su diseño estratificado completamente aleatorizado se muestra a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Diseño experimental de Homogeneidad del candidato a Material de Referencia

Estrato	Numero de botella										Botellas para homogeneidad
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
6	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
7	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
8	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
9	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
10	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	
11	101	102	103	-	-	-	-	-	-	-	

Estabilidad a corto plazo

Se realizó un diseño isócrono esto debido a que reduce la dispersión de los puntos en el tiempo, para ello se tomó como referencia la temperatura de -80 °C esto con el fin de reflejar las condiciones de transporte a temperaturas extremas considerando la naturaleza del material y su posible inestabilidad. De manera aleatorizada se escogieron un numero representativo de botellas a medir por semana durante un mes en este caso 27 viales, el diseño se observa en la Tabla 2.

Tabla 2*Medición de la propiedad*

Medición de la propiedad				
Temperatura (°C)	Semanas	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
4	Semana 1			
	Semana 2			
	Semana 3			
	Semana 4			
-20	Semana 1			
	Semana 2			
	Semana 3			
	Semana 4			
-80	Semana 4			

5.1.4.2.Evaluación de homogeneidad y estabilidad del candidato a material a referencia

Homogeneidad

Para la evaluación de homogeneidad se tuvo en cuenta la homogeneidad entre las botellas (U_{entre}) como se muestra en la Figura 13 esto debido al tipo de presentación (Rodríguez, 2021). Esta evaluación se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo la hipótesis planteada para la aceptación del material como se observa en la tabla 4, el número de botellas fueron seleccionadas de manera aleatorizada en el diseño experimental a candidato a material de referencia. El análisis ANOVA se realizó siguiendo el libro diseño estadístico de experimentos segunda edición y sus ecuaciones se observan en la Tabla 3 (Albel Díaz, 2009).

Tabla 3*Expresiones para calculo ANOVA de un factor*

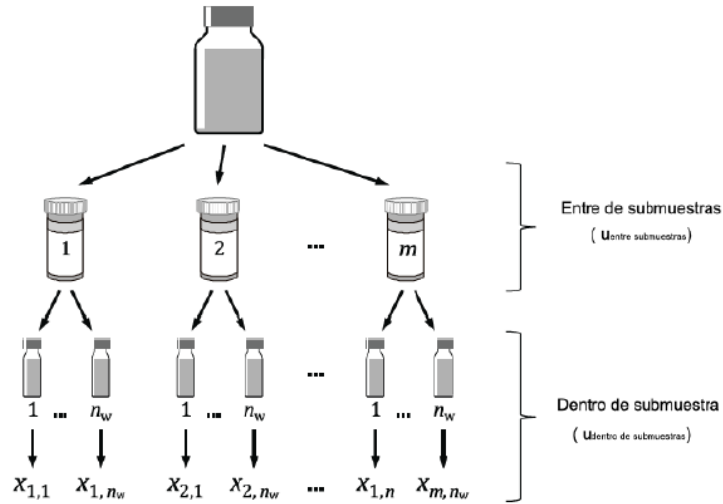
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F _{cal}
Entre botellas	$SS_{entre} = \sum_{k=1}^K n_k (\bar{X}_K - \bar{\bar{X}})^2$	$M - 1$	$MS_{entre} = \frac{SS_{lab}}{K - 1}$	
Dentro de botellas	$SS_{dentro} = \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^{n_k} (X_{kj} - \bar{X}_k)^2$	$R - M$	$MS_{dentro} = \frac{SS_R}{N - K}$	$F = \frac{MS_{entre}}{MS_{dentro}}$
Total	$SS_{Total} = \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^{n_k} (X_{kj} - \bar{\bar{X}})^2$	$R - 1$	$MS_{Total} = \frac{SS_T}{N - 1}$	

Donde:

M: Indica el número de muestras aleatorizadas*R*: Número total de las muestras con replicas)*MS*: Media cuadrática (ANOVA).*SS*: Suma de los cuadrados (ANOVA).*X_{kj}*: Resultado de una sola medición en el experimento (ANOVA).*SS_{lab}*: Desviación estándar de la homogeneidad entre botellas.*SS_R*: Desviación estándar de la homogeneidad dentro de las botellas.*K*: Factor de cobertura.

Figura 13

Ejemplo de la evaluación de homogeneidad dentro y entre botellas (Rodríguez, 2021).



La incertidumbre por homogeneidad fue calculada de la siguiente forma como se observa en la Ecuación 1,2 y 3:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{dentro}}{n}}$$

Ecuación 1 Homogeneidad dentro envases.

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{entre}}{n}}$$

Ecuación 2 Homogeneidad entre envases.

$$u_{Total} = \sum_{K=1}^K \sum_{j=1}^{nk} (u_{entre} + u_{dentro})$$

Ecuación 3 Homogeneidad total.

Donde MS_{dentro} y MS_{entre} es igual a la varianza de la repetibilidad de las mediciones usada en el estudio de homogeneidad entre envases.

Estabilidad a corto plazo

Para la evaluación de estabilidad a corto plazo se realizó un análisis de regresión lineal, teniendo en cuenta los criterios de la Tabla 4 y basándose en el análisis de varianza para la regresión lineal de la GTC-ISO 35 Tabla 5.

Tabla 4

Criterios de aceptación

Criterios		
H₀	No hay regresión lineal	Si F calculado < F tabulado No se rechaza la hipótesis nula
H_a	Si hay regresión lineal	Si F calculado > F tabulado Se rechaza la nula y se acepta la alternativa

Donde:

F: Es quien nos permite decidir si podemos mantener o debemos rechazar la hipótesis.

H₀: Hipótesis nula.

H_a: Hipótesis alternativa.

Tabla 5

Análisis de la tabla de varianza para la regresión lineal

Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad	Media de cuadrados MS	F
Debida a la regresión	$SS_{entre} = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	1	MS_{reg}	
Acerca de la regresión	$SS_{dentro} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$n - 2$	$s^2 = \frac{SS}{n - 2}$	$F = \frac{MS_{reg}}{s^2}$
Total, corregida para la media $\bar{Y}$	$SS_{Total} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$	$n - 1$		

5.1.4.3. Medición de la propiedad

Homogeneidad

- **Procedimiento activación de placa y unión de antígeno**

Ya realizado la preparación del buffer se adicionó 100 μL de la solución con proteína en la microplaca de ELISA Costar N° 2240096 del candidato a material de referencia los cuales fueron seleccionados de manera aleatorizada como se observa en la Tabla 6 y Figura 14, igualmente se realizó la preparación de volúmenes de $1.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ y $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ como soluciones de control los cuales se organizaron de forma aleatorizada como se observa en la Tabla 7 y Figura 15. Por último, se procedió a incubar toda la noche (17 horas) a 2-8 °C. Pasado las 17 horas se procedió a remover el buffer de unión por inversión y se realizó el secado sobre una toalla de material absorbente. Para ello se lavó fuertemente, agregando solución de lavado buffer PBS 1X con frasco lavador hasta llenar cada pocillo, se repitió el proceso 3 veces como se observa en la Figura 16.

Tabla 6

Botellas asignadas de forma completamente aleatorizada para Homogeneidad

Estrato	Numero de botella										Botellas para homogeneidad
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1
2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	17
3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	21
4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	37
5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	41
6	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	58
7	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	62
8	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	74
9	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	81
10	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	93
11	101	102	103	-	-	-	-	-	-	-	103

Figura 14

Botellas asignadas de forma completamente aleatorizadas para Homogeneidad. Fuente propia

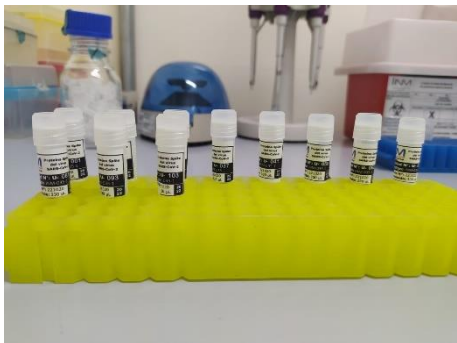


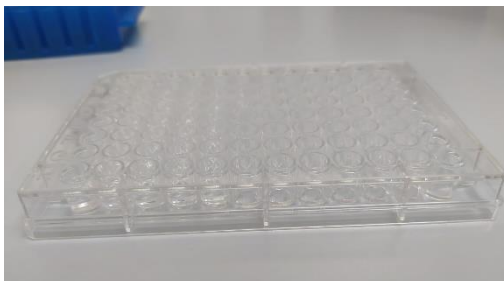
Tabla 7

Organización aleatorizada en la microplaca ELISA para medición de homogeneidad

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	81	17	Blanco	81	58	62	81	21
2	Blanco	103	21	41	37	21	Blanco	103
3	74	1	103	58	1	41	62	93
4	58	62	41	93	74	17	1	37
5	74	93	37	17	1,5	5	1,5	5
6	1,5	5						
7								
8								
9								
10								
11								
12								

Figura 15

Organización aleatorizada en la microplaca ELISA Costar N° 2240096 para medición de Homogeneidad. Fuente propia

**Figura 16**

Solución de lavado buffer PBS 1X en el procedimiento activación de placa y unión de antígeno. Fuente propia



- **Procedimiento bloqueo de placa**

Se aplicaron 300 μ L de la solución de bloqueo y se procedió a incubar por 1 hora a temperatura ambiente como se observa en la Figura 17. Para la respectiva remoción de la solución de bloqueo, se realizó por inversión y se secó sobre una toalla de material absorbente. Para ello se lavó fuertemente, agregando solución de lavado buffer PBS 1X con frasco lavador hasta llenar cada pocillo, removiendo así la solución de lavado por inversión y se secó sobre una toalla de material absorbente, este proceso se repitió 3 veces como se observa en la Figura 17.

Figura 17

Aplicación de 300 μ L de la solución de bloqueo. Fuente propia



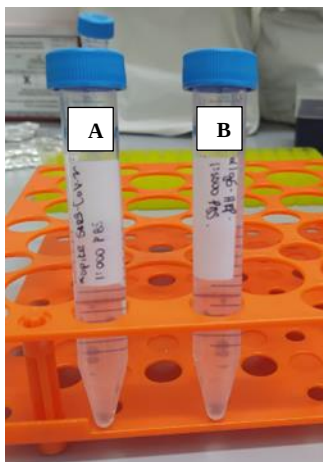
- **Procedimiento de incubación de anticuerpos**

Se prepararon las diluciones de anticuerpo primario y secundario en PBS 1X, ya listo se adicionó 100 μ L de anticuerpo primario (Dilución 1:1.000 PBS) en cada pozo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Pasado la hora se removi6 el anticuerpo primario por inversión y se sec6 sobre una toalla de material absorbente. Para ello se lav6 fuertemente, agregando soluci6n de lavado con frasco lavador buffer PBS 1X hasta llenar cada pocillo, removiendo as6 la soluci6n de lavado por inversi6n y se sec6 sobre una toalla de material absorbente, el proceso se repiti6 3 veces. Para la preparaci6n del anticuerpo secundario, se adicion6 100 μ L de anticuerpo secundario (Diluci6n 1:5000 PBS) y se incub6 por 1 hora. Nuevamente se procedi6 a realizar la remoci6n en este caso del anticuerpo secundario por inversi6n y se sec6 sobre una toalla de material absorbente. Para este procedimiento se lav6 fuertemente, agregando soluci6n de lavado buffer PBS 1X con frasco lavador hasta llenar cada pocillo, removiendo as6 la soluci6n de lavado por inversi6n y se sec6 sobre una toalla de material absorbente, este proceso se repiti6 3 veces. Las diluciones de los anticuerpos se presentan en la Figura 18.

Figura 18

(A) Anticuerpo primario dilución 1:1000. (B) Anticuerpo secundario dilución 1:5000 en PBS 1X.

Fuente propia



los respectivos cálculos en la preparación de los anticuerpos se observan en las Ecuaciones 4,5,6 y 7:

Preparación anticuerpo primario

Dilución 1: 1000 PBS

$1 \mu\text{L} \rightarrow 1000 \mu\text{L}$

$X \rightarrow 6000 \mu\text{L}$

$$X = \frac{6000 \mu\text{L} * 1 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 6 \mu\text{L de anticuerpo primario y } 6000 \mu\text{L de buffer } 1X$$

Ecuación 4 Preparación anticuerpo primario para Homogeneidad

$1 \mu\text{L} \rightarrow 1000 \mu\text{L}$

$X \rightarrow 10000 \mu\text{L}$

$$X = \frac{10000 \mu\text{L} * 1 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 10 \mu\text{L de anticuerpo primario y } 6000 \mu\text{L de buffer } 1X$$

Ecuación 5 Preparación anticuerpo primario para Estabilidad a corto plazo

Preparación anticuerpo secundario

Dilución 1: 5000 PBS

$1 \mu\text{L} \rightarrow 5000 \mu\text{L}$

$1,2 \mu\text{L} \rightarrow X$

$$X = \frac{5000 \mu\text{L} * 1,2 \mu\text{L}}{1 \mu\text{L}} = 6000 \mu\text{L de buffer 1X y } 1,2 \mu\text{L de anticuerpo secundario}$$

Ecuación 6 Preparación anticuerpo secundario

$1 \mu\text{L} \rightarrow 5000 \mu\text{L}$

$2 \mu\text{L} \rightarrow X$

$$X = \frac{5000 \mu\text{L} * 2 \mu\text{L}}{1 \mu\text{L}} = 10000 \mu\text{L de buffer 1X y } 2 \mu\text{L de anticuerpo secundario}$$

Ecuación 7 Preparación anticuerpo secundario para Estabilidad a corto plazo

- **Procedimiento revelado**

Se preparó la solución de revelado con el *Kit* de sustrato HRP quimiofluorescente mejorado *QuantaRed™*, el cual es un sustrato que permite la detección fluorescente sensible y de alto rendimiento de la actividad de la peroxidasa en el formato ELISA. Para ello se mezclaron 300 μL de *QuantaRed Enhancer Solution* con 300 μL de *QuantaRed Stable Peroxide* y 60 μL parte de *QuantaRed Concentrado ADHP*. Esta solución se debía usar dentro de los 30 minutos siguientes a su preparación. Ya preparada la solución se agregó 100 μL de la solución de revelado en la microplaca ELISA y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente como se observa en la Figura 19 y 20. Por último, se introdujo la placa para su lectura en el equipo lector de placas VARIOUSKAN LUX el cual se observa en la Figura 21 el cual mide las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de cada pocillo. Los máximos de excitación y emisión para *QuantaRed Substrate* son 570 nm y 585 nm, respectivamente.

Figura 19

Aplicación de los 100 μ L de la solución de revelado. Fuente propia

**Figura 20**

Solución de revelado después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Fuente propia

**Figura 21**

Lector de placas VARIOUSKAN LUX. Fuente propia



Estabilidad a corto plazo

Para la medición de estabilidad a corto plazo se realizaron los mismos procedimientos de homogeneidad, para ello se presenta la organización de la microplaca de ELISA Costar N° 2240096 con el candidato a material de referencia los cuales fueron seleccionados de manera aleatorizada como se observa en la Tabla 8 y 9 y Figura 22.

Tabla 8

Botellas asignadas de forma completamente aleatorizada para estabilidad a corto plazo

Estrato	Numero de botella										Botellas para estabilidad a corto plazo		
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	24	36	28
2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	19	4	2
3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	46	94	3
4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	73	99	92
5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	48	61	9
6	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	54	35	
7	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	50	53	
8	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	29	40	
9	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	75	43	
10	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	77	26	
11	101	102	103	-	-	-	-	-	-	-	69	44	

Tabla 9

Organización aleatorizada en la microplaca ELISA para medición de Estabilidad a corto plazo

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	35	61	92	48	3	24	3	43
2	19	99	2	26	Blanco	73	28	99
3	3	75	69	44	24	54	24	40
4	29	77	29	94	43	40	54	69
5	28	54	Blanco	75	9	61	4	40
6	4	9	19	77	50	92	Blanco	44
7	36	61	29	94	4	94	19	73
8	92	69	9	44	36	73	99	77

9	35	53	36	2	46	75	26	53
10	53	50	46	50	35	48	46	48
11	28	43	26	2				
12								

Figura 22

Botellas asignadas de forma completamente aleatorizadas para homogeneidad. Fuente propia



6. Resultados y discusiones

6.1. Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo del candidato a material de referencia de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2.

6.1.1. Preparación del Material

- **Dilución gravimétrica**

Para la preparación de la proteína *Spike* se determinaron los volúmenes necesarios a utilizar con el formato de diluciones gravimétricas M-03-L24-F-003 para la obtención de la concentración final de solución de proteína de 40 mL como se observa en el anexo 3, los cuales se dispensaron en 103 viales con un contenido de 330 μL .

- **Preparación de muestras de control**

Se realizaron los cálculos para determinar el volumen necesario a utilizar para la preparación de las diluciones de control de 1.5 y 5 ($\mu\text{g/mL}$) como se observan en las Ecuaciones 8 y 9 esto con el fin de ver que los resultados se encuentren dentro de los límites deseables, y no sea necesario hacer ningún otro ajuste, los volúmenes a utilizar se observan en la Tabla 10.

$$9.631 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * V_1 = 330\mu\text{L} * 1,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Ecuación 8 Cálculos para volumen de diluciones de control

$$V_1 = \frac{330\mu\text{L} * 1,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{9.631 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 51,3965\mu\text{L} \approx 51,40\mu\text{L}$$

Ecuación 9 Volumen para dilución de control de 1.5 ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 10

Volumen para dilución de control de 1.5 y 5 (µg/mL)

Buffer 10X		
Volumen ($\frac{\mu g}{mL}$)	V_1 ($\frac{\mu g}{mL}$) <i>Proteína</i>	Volumen restante ($\frac{\mu g}{mL}$) <i>Solución de dilución</i>
1.5	51,40	278,6
5	171,32	158,7

Para la preparación del buffer 1X se procedió a realizar los respectivos cálculos, esto se puede observar en la Ecuación 10 y Tabla 11:

$$V_1 = \frac{1000 \text{ mL} * 1X}{10X} = 100 \text{ mL}$$

Ecuación 10 Volumen para la preparación del buffer 1X

Tabla 11

Preparación del buffer 1X

Buffer 1X		
Volumen (mL)	V_1 (mL)	Volumen restante (mL)
1000	100	900

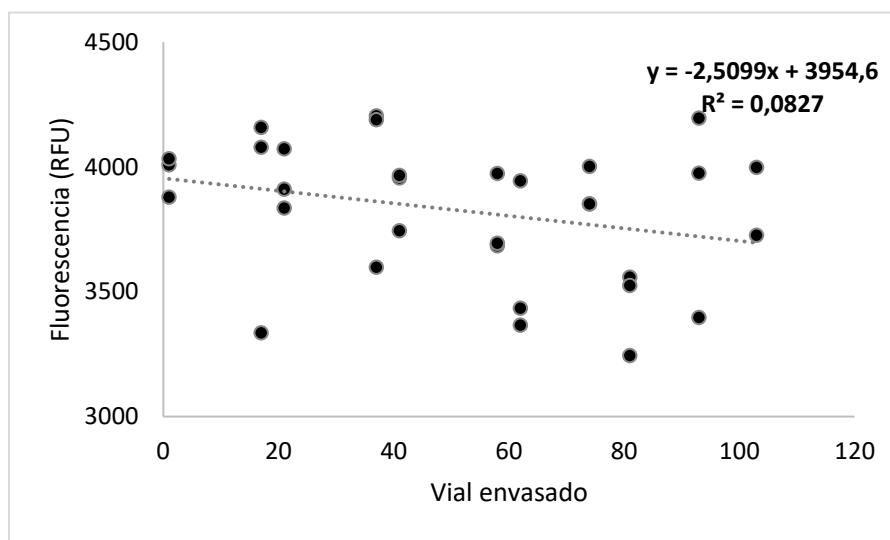
6.1.2. Caracterización del candidato a material de referencia

Evaluación de tendencias

Para evaluar posibles tendencias durante el envasado se realizó un análisis de regresión. En la Figura 23 se muestra los resultados de fluorescencia en función al envasado.

Figura 23

Evaluación de la fluorescencia del Material de referencia en función del envasado. Los círculos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.



La Figura 23 muestra los valores de fluorescencia (RFU) encontrados en los triplicados de las réplicas en estudio. El valor R^2 de la regresión lineal fue de 0.0827, empleando la ecuación $y = mx + b$. El valor anterior, indica que la fluorescencia (cantidad de proteína) del Material de Referencia de estudio no depende del envasado en los viales. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis plateada (ver Tabla 4) y se continuó con la producción del candidato a Material de Referencia.

Estudio de Homogeneidad

En la Tabla 12 se presentan los resultados de la evaluación de homogeneidad, los cuales el coeficiente de variación no fue superior al 25%.

Tabla 12

Resultados de evaluación de Homogeneidad por ELISA indirecto

VIAL	Mediciones de Fluorescencia (RFU)					Coeficiente de variación
	1	2	3	Promedio	Desviación	
1	4008	3878	4032	3972,67	82,86	2%
17	3335	4158	4079	3857,33	454,08	12%
21	3911	4072	3835	3939,33	121,01	3%
37	3598	4204	4189	3997,00	345,63	9%
41	3744	3955	3966	3888,33	125,12	3%
58	3684	3694	3973	3783,67	164,04	4%
62	3433	3944	3366	3581,00	316,15	9%
74	3852	4001	3852	3901,67	86,03	2%
81	3244	3558	3524	3442,00	172,31	5%
93	4195	3974	3396	3855,00	412,58	11%
103	3726	3997	3865	3862,67	135,52	4%
Blanco	3144	3015	3689	3282,67	357,76	11%

En este diseño, la varianza “entre botellas” incluye la heterogeneidad entre envases, mientras que la varianza “dentro botellas” incluye la incertidumbre debida a la medición, la transformación y submuestreo. Para ello se tomaron en cuenta los promedios obtenidos según los resultados de fluorescencia como se observa en la Tabla 12, determinando que los coeficientes de variación de estos se encuentran en los criterios mínimos de aceptación. El error total entre botellas fue de 856935,6 RFU y el error dentro de botellas de 1430684,7 RFU.

La variabilidad entre unidades se determinó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comparar la dispersión de las mediciones en varias unidades del material con la precisión del método de medición determinando así la desviación estándar entre unidades en este caso de fluorescencia. Esta desviación a su vez es empleada para la estimación de la

incertidumbre asociada a la heterogeneidad del material, la incertidumbre de homogeneidad resultante (u_{hom}) con un intervalo de confianza del 95 % fue de 169,01 RFU, en cuanto a la incertidumbre de caracterización final fue de 83 RFU, para finalmente, obtener una incertidumbre relativa del 4,42% el análisis ANOVA se observa en la Tabla 13. Dado que la incertidumbre de caracterización es menor que u_{hom} , se determinó que la falta de homogeneidad del material es insignificante. Según los datos y resultados obtenidos a través del contraste de la hipótesis realizada como se observa en la Tabla 4, se dispone de evidencia suficiente para no rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, se afirma que no hay regresión lineal debido a que F calculado es menor al F tabulado en un intervalo de confianza del 95%, estableciendo que no hay valores atípicos en el conjunto de datos analizados, lo que permitió utilizar el conjunto de datos para el tratamiento estadístico del mismo.

Tabla 13

Análisis de varianza ANOVA

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	856935,6	10	85693,6			
Dentro de grupos	1430684,7	22	65031,1	1,3	0,3	2,3
Total	2287620,2	32	150724,7			

Estudio de Estabilidad a corto plazo

En la Tabla 14 y 15 y figura y 24 y 25 se presentan los resultados de la evaluación Estabilidad a corto plazo a temperaturas de 4 y -20 °C. Teniendo en cuenta resultados obtenidos, durante el periodo de tiempo no se observaron cambios significativos en la heterogeneidad del

tamaño de la proteína con las temperaturas establecidas incluso después de la 4 semana, por lo tanto, se afirma que no hay regresión lineal en la evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de 4 y -20°C debido a que F calculado es menor al F tabulado en un intervalo de confianza del 95% y cumple con los criterios de aceptación según la Tabla 4, estableciendo que no hay valores atípicos en el conjunto de datos analizados, lo que permitió utilizar el conjunto de datos para el tratamiento estadístico del mismo.

Tabla 14

Análisis de regresión para evaluación de estabilidad a corto plazo a temperatura de 4°C

Tabla Anova	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculado	F tabulado	Probabilidad (p)	RESULTADO
Regresión	32127,16059	1	32127,16059	0,16	4,13	0,69	No hay regresión lineal
Error	6947617,5	34	204341,692				
Total	6979744,688	35					

Figura 24

Fluorescencia del candidato a Material de Referencia en función del almacenamiento a corto plazo (4°C). Los rombos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.

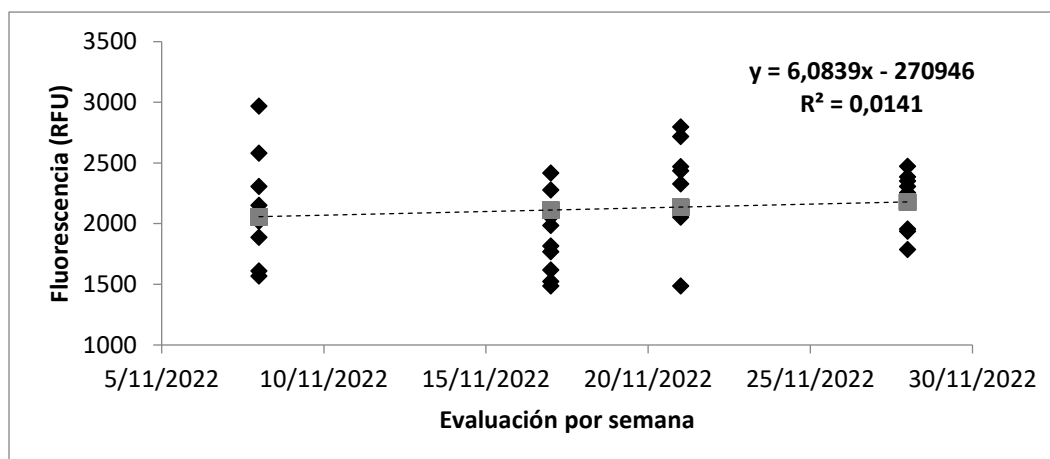


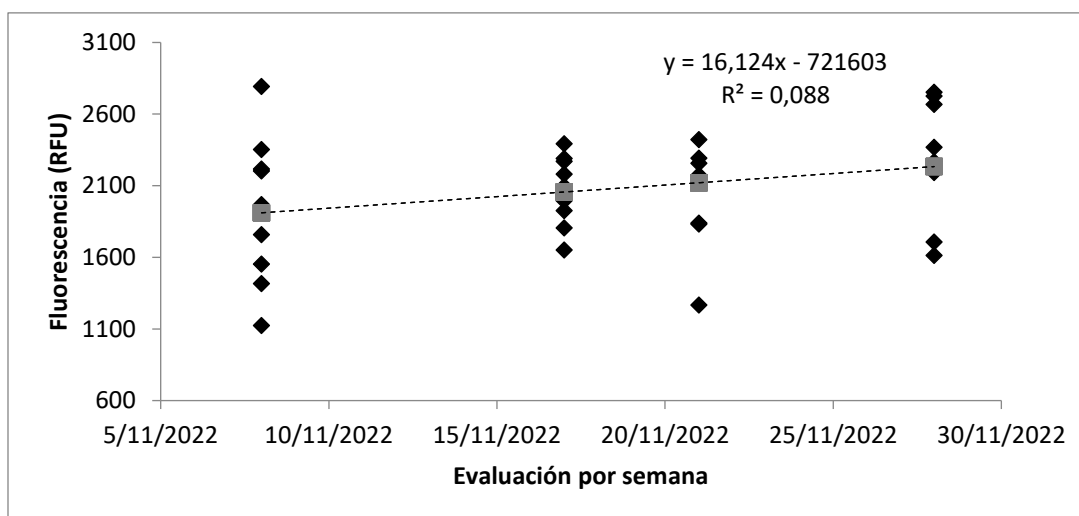
Tabla 15

Análisis de regresión para evaluación de estabilidad a corto plazo a temperatura de -20 °C

Tabla Anova	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculado	F tabulado	Probabilidad (p)	RESULTADO
Regresión	489004,738	1	489004,738	3,28	4,13	0,08	No hay regresión lineal
Error	5069239,6	34	149095,2814				
Total	5558244,306	35					

Figura 25

Fluorescencia del candidato a Material de Referencia en función del almacenamiento a corto plazo (-20°C). Los rombos representan las réplicas por triplicado de los viales evaluados. La línea punteada muestra la tendencia.



Finalmente, para el análisis con la temperatura de referencia de -80°C, se realizó un análisis de un factor con las temperaturas de 4 y -20°C para poder saber si había una diferencia significativa en el estudio, los resultados se observan en la Tabla 16 y 17.

Tabla 16

Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de 4 y -80°C

Temperaturas	Mediciones de Fluorescencia (RFU)						
	Vial	1	2	3	Promedio	Desviación	Coefficiente de variación
(4°C)	24	2307	2152	1888	2115,67	211,85	10%
	19	2970	1568	1611	2049,67	797,32	39%
	43	2581	2019	2092	2230,67	305,59	14%
	73	2418	1486	1817	1907,00	472,47	25%
	48	1619	1525	2057	1733,67	283,93	16%
	54	2277	1984	1770	2010,33	254,52	13%
	50	2329	2797	2114	2413,33	349,22	14%
	29	2470	2437	668,5	1858,50	1030,70	55%
	75	2718	1487	2055	2086,67	616,11	30%
	77	2254	2472	1956	2227,33	259,03	12%
	69	2307	2385	2353	2348,33	39,21	2%
	36	1938	2231	1787	1985,33	225,75	11%
(-80°C)	3	3324	1693	2337	2451,33	821,49	34%
	92	2492	2010	1925	2142,33	305,79	14%
	9	2918	2086	2306	2436,67	431,12	18%
	Blanco	1793	1634	874,3	1433,77	490,99	34%

Tabla 17

Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de -20 y -80°C

Mediciones de Fluorescencia (RFU)							
Temperatura	VIAL	1	2	3	Promedio	Desviación	Coefficiente de variación
(-20°C)	4	2217	2203	1416	1945,33	458,47	24%
	94	2352	1125	1758	1745,00	613,60	35%
	99	2793	1552	1968	2104,33	631,63	30%
	61	2095	1651	1925	1890,33	224,02	12%
	35	2392	2269	1995	2218,67	203,23	9%
	53	2180	2291	1805	2092,00	254,67	12%
	40	1266	2421	1833	1840,00	577,53	31%
	43	2166	2158	2256	2193,33	54,42	2%
	26	2174	2293	1839	2102,00	235,41	11%
	44	2369	1614	2191	2058,00	394,68	19%
	28	2753	2205	2267	2408,33	300,10	12%
	2	2726	1707	2668	2367,00	572,31	24%
(-80°C)	3	3324	1693	2337	2451,33	821,49	34%
	92	2492	2010	1925	2142,33	305,79	14%
	9	2918	2086	2306	2436,67	431,12	18%
	Blanco	1793	1634	874,3	1433,77	490,99	34%

Para verificar la presencia de valores atípicos en la evaluación de estabilidad a corto plazo, se aplicó la prueba Grubbs y los datos identificados como atípicos se eliminaron. Los resultados se observan en la Tabla 18 y 19.

Tabla 18

Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de 4 y -80°C

(Eliminación de valores atípicos)

Mediciones de Fluorescencia (RFU)								
T(°C)	Evaluación por semana	Vial	1	2	3	Promedio	Desviación	Coefficiente de variación
4	Semana 1	24	2307	2152	1888	2115,67	211,85	10%
4	Semana 1	19	-	1568	1611	1589,50	30,41	2%
4	Semana 1	46	2581	2019	2092	2230,67	305,59	14%
4	Semana 2	73	2418	1486	1817	1907,00	472,47	25%
4	Semana 2	48	1619	1525	2057	1733,67	283,93	16%
4	Semana 2	54	2277	1984	1770	2010,33	254,52	13%
4	Semana 3	50	2329	2797	2114	2413,33	349,22	14%
4	Semana 3	29	2470	2437	-	2453,50	23,33	1%
4	Semana 3	75	-	1487	2055	1771,00	401,64	23%
4	Semana 4	77	2254	2472	1956	2227,33	259,03	12%
4	Semana 4	69	2307	2385	2353	2348,33	39,21	2%
4	Semana 4	36	1938	2231	1787	1985,33	225,75	11%
-80	Semana 4	92	2492	2010	1925	2142,33	305,79	14%
-80	Semana 4	9	2918	2086	2306	2436,67	431,12	18%
Blanco			1793	1634	874,3	1433,77	490,99	34%

Tabla 19

Resultados de evaluación de Estabilidad a corto plazo en temperaturas de -20 y -80°C

(Eliminación de valores atípicos)

T(°C)	Evaluación por semana	Vial	1	2	3	Promedio	Desviación	Coefficiente de variación
(-20)	Semana 1	4	2217	2203	-	2210,00	9,90	0,45%
(-20)	Semana 1	94	2352	-	1758	2055,00	420,02	20%
(-20)	Semana 1	99	-	1552	1968	1760,00	294,16	17%
(-20)	Semana 2	61	2095	1651	1925	1890,33	224,02	12%
(-20)	Semana 2	35	2392	2269	1995	2218,67	203,23	9%
(-20)	Semana 2	53	2180	2291	1805	2092,00	254,67	12%
(-20)	Semana 3	40	-	2421	1833	2127,00	415,78	20%
(-20)	Semana 3	43	2166	2158	2256	2193,33	54,42	2%
(-20)	Semana 3	26	2174	2293	1839	2102,00	235,41	11%
(-20)	Semana 4	44	2369	1614	2191	2058,00	394,68	19%
(-20)	Semana 4	28	2753	2205	2267	2408,33	300,10	12%
(-20)	Semana 4	2	2726	1707	2668	2367,00	572,31	24%
(-80)	Semana 4	92	2492	2010	1925	2142,33	305,79	14%
(-80)	Semana 4	9	2918	2086	2306	2436,67	431,12	18%
Blanco			1793	1634	874,3	1433,77	490,99	34%

Estimación de la concentración de proteína

El valor estimado de concentración de la proteína *Spike* en la solución, a partir de la preparación gravimétrica es de 1.91 µg/mL se puede observar en el anexo 3.

6.2.Discusión

Si bien las vacunas han disminuido la propagación asociada con el COVID-19, el diagnóstico de infecciones y la vigilancia viral son importantes en la respuesta global a la pandemia. Los kits de pruebas rápidas, basados tanto en antígenos como en anticuerpos, desempeñan un papel clave en el diagnóstico de infecciones por SARS-CoV-2. Aunque la identificación oportuna de las personas infectadas es un tema crítico para prevenir la propagación de la infección, es igualmente importante determinar la confiabilidad con la que se determina la positividad. De hecho, las asignaciones de falsos positivos son perjudiciales tanto para los sujetos (que puede confiar en una falsa inmunidad) y para la sociedad, ya que siguen siendo vulnerables a la infección y la transmisión. Por lo tanto, la mayor especificidad diagnóstica posible es un requisito urgente tanto para las pruebas serológicas como para la sensibilidad (Cavalera et al., 2021).

Los materiales de referencia en fase de solución suelen ser muy homogéneos, la falta de homogeneidad puede suceder a lo largo del proceso de producción por diferentes razones, es decir, condiciones ambientales cambiantes, interacción entre la muestra y su recipiente y por una posible contaminación. Para ello, es necesario realizar un estudio de homogeneidad de cada lote, ya que es necesario demostrar que cada una de las botellas son suficientemente homogéneas. Como resultado el Material de Referencia piloto de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671), cumplió con los criterios mínimos de aceptación para Homogeneidad con coeficiente de variación no mayor al 25% y no presentaron disminuciones en el valor de la propiedad significativas incluso después de la 4 semana para Estabilidad a corto plazo. Sin embargo, se considera pertinente seguir con los estudios de Estabilidad a largo plazo.

7. Conclusiones

Las subunidades S1 y S2 de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671), sirven como Material de Referencia en temperaturas de 4, -20 y -80°C en un periodo de tiempo de 4 semanas después de su elaboración, esta solución de proteína *Spike* está diseñada para usarse como muestra de control de calidad positiva en las pruebas, así como herramienta de aseguramiento de la validez de resultados en las mediciones de inmunoensayos para detectar la presencia del coronavirus SARS-CoV-2 basadas en antígeno, también conocido como COVID-19, por el método basado en ELISA indirecto.

El Sistema Integrado de Gestión de Calidad del INM para producción de Materiales de Referencias, permitió desarrollar el MR piloto de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671) para el aseguramiento en la validez de resultados y control interno en las mediciones de inmunoensayos para la detección del SARS-CoV-2.

La proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671), es idónea como Material de Referencia debido a las mediciones de Fluorescencia (RFU) en el método de ELISA indirecto con longitud de onda de 570 nm y 585 nm en temperaturas de 4, -20 y -80°C, demostrando ser homogéneo y estable durante un mes.

La prueba de Grubbs permite identificar y eliminar valores atípicos que puedan perjudicar el análisis de regresión.

La homogeneidad de la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2 (Invitrogen RP-87671) no mostró un coeficiente de variación mayor al 25% y su Estabilidad a corto plazo no presentó cambios significativos en la heterogeneidad del tamaño de la proteína incluso después de un mes.

8. Recomendaciones

En caso de requerir un mayor proceso de producción, será necesario tener en cuenta un buen procedimiento de lavado en la microplaca ELISA Costar N° 2240096, ya que es esencial para la obtención de datos analíticos correctos y precisos. De igual forma si se desea realizar la asignación de valor, se requiere la adquisición de un Material de Referencia Certificado que permita hacer la cuantificación por ELISA y del mismo modo la comparación por los dos métodos, es decir, el método primario gravimétrico y ELISA indirecto.

Teniendo en cuenta las características del material solamente puede ser usado con propósitos de evaluación de la precisión de los métodos, dado que no cuenta con un valor certificado, de igual manera se recomienda continuar con el estudio de Estabilidad a largo plazo para seguir evaluando el aseguramiento en la validez de resultados.

El desarrollo y producción del material de referencia piloto a base de proteína *Spike* es una respuesta a la necesidad de tener inmunoensayos para la detección del SARS-CoV-2, teniendo en cuenta las características de la molécula, es necesario trabajar en una buena manipulación de la muestra para realización de la homogenización y no tener inconvenientes en la medición de esta.

9. Referencias bibliográficas

- Adriana Liceth Rodríguez Torres. (2021). *Evaluación de la Homogeneidad y Estabilidad de Materiales de Referencia- INM*.
- Akyurek, S., Demirci, S. N. S., Bayrak, Z., Isleyen, A., & Akgoz, M. (2021). The production and characterization of SARS-CoV-2 RNA reference material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(13), 3411–3419.
<https://doi.org/10.1007/S00216-021-03284-W/TABLES/3>
- Albel Díaz. (2009). *Diseño estadístico de experimentos 2a Ed.* Universidad de Antioquia.https://books.google.com.co/books?id=0x0DW6dNiyAC&pg=PA48&q=analisis+de+varianza+anova&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjK7_bflIH7AhVkVzABHT_2DUQQ6AF6BAgMEA#v=onepage&q=analisis%20de%20varianza%20anova&f=false
- Alberto Tenorio-Abreu, Ana Ruiz-Castillo, Antonio Francisco Guzmán-González, Alejandro Peña-Monje, José María Saavedra-Martín, & Francisco Franco-Álvarez De Luna. (2022, June 20). *Comparison between five PCR techniques for the diagnosis of SARS-CoV-2*. <https://web-p-ebsohost-com.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=85112c9d-5fc6-4958-b64a-c72a35a5fa6b%40redis>
- Bertha, G., & Robledo, V. (2009). Antígenos e inmunógenos. *Rev Fac Med UNAM*, 52(1). <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un091j.pdf>
- Cavalera, S., Colitti, B., Rosati, S., Ferrara, G., Bertolotti, L., Nogarol, C., Guiotto, C., Cagnazzo, C., Denina, M., Fagioli, F., di Nardo, F., Chiarello, M., Baggiani, C., & Anfossi, L. (2021). A multi-target lateral flow immunoassay enabling the

specific and sensitive detection of total antibodies to SARS COV-2. *Talanta*, 223.

<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121737>

Colwill, K., Galipeau, Y., Stuible, M., Gervais, C., Arnold, C., Rathod, B., Abe, K. T.,

Wang, J. H., Pasculescu, A., Maltseva, M., Rocheleau, L., Pelchat, M., Fazel-

Zarandi, M., Iskilova, M., Barrios-Rodiles, M., Bennett, L., Yau, K., Cholette, F.,

Mesa, C., ... Durocher, Y. (2022). A scalable serology solution for profiling

humoral immune responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Clinical*

and Translational Immunology, 11(3). <https://doi.org/10.1002/CTI2.1380>

Daniela Zambrano Solano. (2022). *Diagrama para la producción del MR piloto de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2: Lucidchart.*

[https://lucid.app/lucidchart/16a92ccc-f7be-48d2-a8d2-](https://lucid.app/lucidchart/16a92ccc-f7be-48d2-a8d2-84cbbcb61d36/edit?page=0_0&invitationId=inv_93f4b337-d1b9-4c4f-8dd4-7ab5de43e8d4#)

[84cbbcb61d36/edit?page=0_0&invitationId=inv_93f4b337-d1b9-4c4f-8dd4-7ab5de43e8d4#](https://lucid.app/lucidchart/16a92ccc-f7be-48d2-a8d2-84cbbcb61d36/edit?page=0_0&invitationId=inv_93f4b337-d1b9-4c4f-8dd4-7ab5de43e8d4#)

Jaime Galo Benites Solis. (2020, October 26). *Estructura y composición del SARS-COV-2.* <https://raq.fundacionbenaim.org.ar/estructura-y-composicion-del-sars-cov-2/>

José Eduardo Oliva Marín. (2020, April 30). *Vista de SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis.*

<https://www.lamjol.info/index.php/alerta/article/view/9619/11029>

Lee, S. S., Kim, S., Yoo, H. M., Lee, D. H., & Bae, Y. K. (2022). Development of SARS-CoV-2 packaged RNA reference material for nucleic acid testing.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 414(5), 1773–1785.

<https://doi.org/10.1007/S00216-021-03846-Y/FIGURES/6>

- Leguizamon-Smqb, J., Felipe, L., & Becerra -Ssm, S. (2021). *Ensayo de aptitud: Detección del virus SARS-CoV-2 por RT-qPCR*. <https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2022/03/Resumen-2.pdf>
- Mamiko Onoda, M. J. M. C. (2020, April). *Pruebas diagnósticas de laboratoriode COVID-19*. https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/pruebas_diagnosticas_de_laboratorio_de_covid_vfinal.pdf
- Moctezuma, I. V. (2021). La glucoproteína spike. *Revista Mexicana de Mastología*, 11(1), 18–21. <https://doi.org/10.35366/99276>
- Nascimento, E. D., Fonseca, W. T., de Oliveira, T. R., de Correia, C. R. S. T. B., Faça, V. M., de Moraes, B. P., Silvestrini, V. C., Pott-Junior, H., Teixeira, F. R., & Faria, R. C. (2022). COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 Spike protein detection in saliva using an ultrasensitive magneto-assay based on disposable electrochemical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 353, 131128. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.131128>
- Natividad Montes Barqueros. (2018). *Técnicas de inmunodiagnóstico*. <https://www.sintesis.com/data/indices/9788491711452.pdf>
- OMS. (2021, October 6). *Detección de antígenos en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2*. <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
- Plaza Domínguez Ortiz. (2019). *La solución ELISA como ayuda en el Diagnóstico de COVID-19*. https://www.vircell.com/media/filer_public/8b/0a/8b0ad8f3-58a4-4966-a235-0f8d227f94ae/covid-19_elisa_es_pms100-0620.pdf

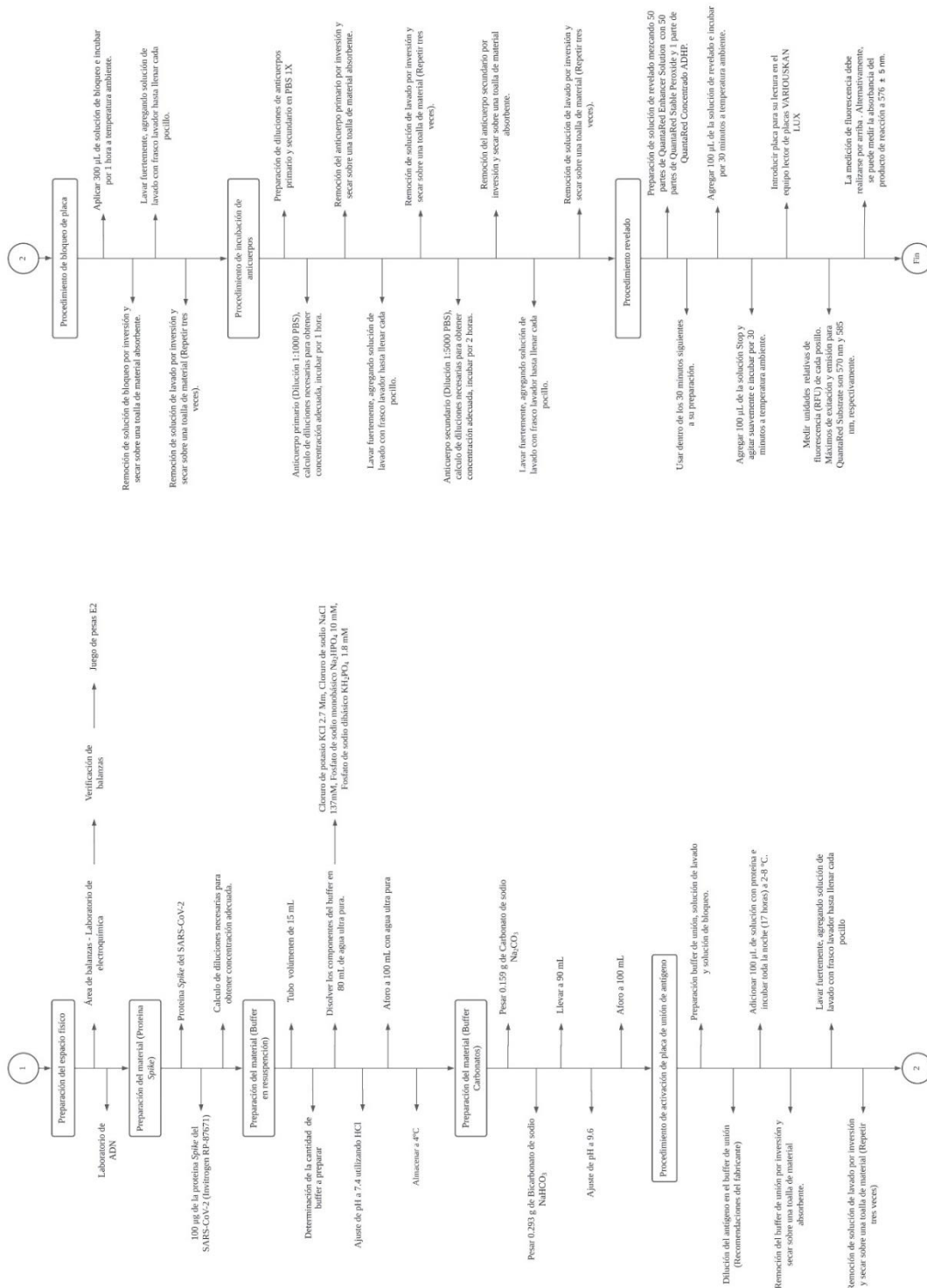
- Robert Hnasko. (2015). *ELISA: Métodos y Protocolos (Métodos en Biología Molecular, 1318)*. Humana Press is a brand of Springer.
- Ropert, C., Zherdev, A. v, Chiereghin, A., Maurizio Zagari, R., Galli, S., Moroni, A., Gabrielli, L., Venturoli, S., Bon, I., Rossini, G., Maria Saracino, I., Pavoni, M., Lafratta, S., Deni, A., Felici, S., Borghi, M., Guerra, L., Raumer, L., Lodi, V., ... St Orsola, I. (2021). Recent Advances in the Evaluation of Serological Assays for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection and COVID-19. *Frontiers in Public Health* | *Www.Frontiersin.Org*, 8, 620222.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.620222>
- Sandra Eugenia Gallegos, José Alejandro Mojica Madera, Mónica Patricia Meza Cárdenas, Cielo Yaneth Ríos Hincapié, Víctor Hugo Álvarez, Marcela Quiroga, Sandra Liliana Fuentes, & Claudia Milena Cuellar Segura. (2020). *Lineamientos para el uso de pruebas Moleculares RT-PCR y pruebas de Antígeno y Serológicas para SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia*.
- Stocks, B. B., Thibeault, M. P., Schrag, J. D., & Melanson, J. E. (2022). Characterization of a SARS-CoV-2 spike protein reference material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(12), 3561–3569.
<https://doi.org/10.1007/S00216-022-04000-Y/TABLES/1>
- Vidal-Anzardo, M., Solis, G., Solari, L., Minaya, G., Ayala-Quintanilla, B., Astete-Cornejo, J., Luque-Aguilar, A., Jorge, A., Rojas, N., Cardenas, F., & Soto, A. (2020). Evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2. *Revista Peruana de*

Medicina Experimental y Salud Pública, 37(2), 203–209.

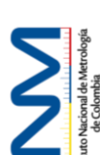
<https://doi.org/10.17843/RPMESP.2020.372.5534>

- Zegers, I., Keller, T., Schreiber, W., Sheldon, J., Albertini, R., Blirup-Jensen, S., Johnson, M., Trapmann, S., Emons, H., Merlini, G., & Schimmel, H. (2010). Characterization of the new serum protein reference material ERM-DA470k/IFCC: Value assignment by immunoassay. *Clinical Chemistry*, 56(12), 1880–1888. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2010.148809>
- Zhao, P., Praissman, J. L., Grant, O. C., Cai, Y., Xiao, T., Rosenbalm, K. E., Aoki, K., Kellman, B. P., Bridger, R., Barouch, D. H., Brindley, M. A., Lewis, N. E., Tiemeyer, M., Chen, B., Woods, R. J., & Wells, L. (2020). Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host and Microbe*, 28(4), 586-601.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.08.004/ATTACHMENT/254C79BE-AD90-420B-82D1-6056AF0793C8/MMC2.XLSX>

ANEXO 2. Diagrama de producción del candidato a material de referencia (Daniela Zambrano Solano, 2022).



ANEXO 3. Preparación gravimétrica (M-03-L24-F-003).

 INM Instituto Nacional de Metrología de Colombia										Preparación diluciones gravimétricas GMB									
										Código: M-03-L24-F-003									
										Versión: 02									
										Página 3 de 4									
No	Fecha	Responsable	Balanza	Código	Ensayo	Material de partida	Concentración material de partida	u estándar material de partida	Masa tubo + buffer	Masa H ₂ O	Masa Buffer (g)	Masa ADN (mg)	Dilución (F1)	u dilución	Concentración dilución (f)	u Conc. dilución	Observaciones		
1	21/11/2022	MMAC	MSA225_2	O-22-1	1	Proteína Spike SARS-CoV-2 2 Invitrogen (RT-57671)	734.3222	5	17,02512	17,1613	10,24702	0,13618	1,312E-02	5,433E-06	9,630942021	0,065698325	Reconstitución de Material de partida para Material de referencia piloto de la proteína Spike de SARS-CoV-2		
1	21/11/2022	MMAC	MSA225_2	O-22-2	1	Proteína Spike SARS-CoV-2 2 Invitrogen (RT-57671)	9,630942021	0,065698325	40,06032	46,81204	27,28821	6,75152	1,984E-01	2,052E-06	1,910392029	0,013031924	Dilución de la proteína para Material de referencia piloto de la proteína Spike de SARS-CoV-2		
1	21/11/2022	MMAC	MSA225_2	O-22-32	1	Proteína Spike SARS-CoV-2 2 Invitrogen (RT-57671)	9,630942021	0,065698325	0,80409	0,86698	0,30198	0,05289	1,498E-01	1,052E-04	1,435400354	0,00984397	Dilución de la proteína para Material de referencia piloto de la proteína Spike de SARS-CoV-2		
1	21/11/2022	MMAC	MSA225_2	O-22-32	1	Proteína Spike SARS-CoV-2 2 Invitrogen (RT-57671)	9,630942021	0,065698325	0,50407	0,83153	0,16659	0,16087	4,913E-01	9,331E-05	4,71335411	0,032287869	Dilución de la proteína para Material de referencia piloto de la proteína Spike de SARS-CoV-2		