



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Características de la respuesta inmune humoral frente a SARS CoV-2

Revisión bibliográfica y aplicación de un ensayo de ELISA en sueros de pacientes infectados en Uruguay.

Y. Franco¹, R. Mango¹, G. Medina¹, C. Méndez¹, T. Méndez¹, A. Salvo¹, O. Pritsch², F. Rammauro²

^[1] *Ciclo de Metodología Científica II 2022-Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

^[2] *Departamento de Inmunobiología-Facultad de Medicina-Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Ciclo de Metodología Científica II-2022 Grupo 12

ÍNDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Marco teórico.....	4
Objetivos.....	11
Metodología.....	12
Resultados.....	15
Discusión.....	23
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	27
Agradecimientos.....	30
Anexos.....	31

RESUMEN

El presente trabajo constituye una revisión bibliográfica actualizada que aborda cuáles son los mecanismos de la respuesta inmune humoral frente a la infección por SARS-CoV-2 en la población. Se plantea como objetivo principal indagar sobre la respuesta inmune humoral, particularmente la cinética de comportamiento de los anticuerpos frente a la infección por SARS-CoV-2.

Varias investigaciones plantean como objetivo de estudio los anticuerpos anti RBD “*receptor binding protein*”, y encuentran que la correlación entre los títulos cuantificados en los pacientes que cursan la enfermedad con distintos niveles de gravedad, pueden estar relacionados con la capacidad de neutralización contra el SARS CoV-2.

La relevancia de estos estudios radica en que el conocimiento del comportamiento de los anticuerpos contra una enfermedad nos permite entender la historia natural de la respuesta inmune contra este patógeno, desde la respuesta inicial frente a una primoinfección, hasta la protección que puede llegar a brindar en caso de una reinfección.

Para realizar la búsqueda bibliográfica, se decidió trabajar en PubMed, Portal Timbó, Google Académico y Mendeley, utilizando una combinación de las siguientes palabras claves: SARS-CoV-2 y anticuerpos anti RBD, SARS-CoV-2 y respuesta inmune humoral, SARS-CoV-2 no vacuna.

El enfoque de la parte experimental de este trabajo, se dirige a cuantificar los anticuerpos en pacientes que hayan cursado la infección por SARS CoV-2 en marzo-abril de 2020 aplicando un test ELISA.

PALABRAS CLAVES: SARS-CoV-2, COVID-19, anticuerpos.

ABSTRACT:

The following work proposes to formulate a bibliographic review of the currently available information, that addresses the mechanisms of the humoral immune response against the infection induced by the recent pathogen SARS-CoV-2 in the human population.

The main objective is to investigate the humoral immune response, particularly the kinetics of the behavior of antibodies against SARS-CoV-2 infection.

Many investigations propose anti-RBD “*receptor binding protein*” antibodies as an objective of study, and find that the correlation between the quantified titers in patients with different levels of severity, could be related to the neutralization capacity against SARS-CoV-2.

The relevance of these studies lies in the fact that the knowledge of the behavior of antibodies against a disease, allows us to understand the natural history of the immune response against a pathogen, from the initial response against a primary infection, to the protection that can be provided in case of reinfection.

To carry out the bibliographic search, we have decided to work with PubMed, Portal Timbó and Mendeley databases; using a combination of the following keywords: SARS-CoV-2 and anti-RBD antibodies, SARS-CoV-2 and humoral immune response, SARS-CoV-2 not vaccine.

The focus of the experimental part of this work, is aimed at quantifying antibodies in patients who had the infection in March-April 2020 applying an ELISA test.

KEY WORDS: SARS-CoV-2, COVID-19, antibodies

INTRODUCCIÓN

La emergencia sanitaria generada por el virus SARS-CoV-2 ha causado desde su inicio daños incalculables a nivel económico, sanitario y social. Desde finales de 2019 ha sido responsable de más de seis millones de muertes en todo el mundo. El hecho de ser una enfermedad emergente ha generado una gran dificultad en la comunidad científica para comprender la evolución natural de la infección y la respuesta del sistema inmune a la misma.

La respuesta inmune del organismo frente a un agente infeccioso se divide en dos grandes ramas; la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, y la articulación entre ambas es muy importante para la resolución exitosa de una infección. Será objetivo particular de este trabajo describir el rol que juega la respuesta inmune humoral como parte de la respuesta adaptativa. Considerando que la acción mediada por anticuerpos no es la misma frente a todos los patógenos y que la cinética de generación de anticuerpos varía no sólo frente a distintas infecciones sino también en distintas poblaciones, conocer el comportamiento de la respuesta humoral frente a la infección por SARS-CoV-2 nos permitirá contar con un parámetro base a partir del cual evaluar la respuesta en distintos grupos poblacionales.

MARCO TEÓRICO

Los Coronavirus son una familia diversa de virus envueltos de ARN simple hebra de polaridad positiva pertenecientes al orden de los Nidovirales. Infectan humanos, mamíferos y algunas especies de aves, causando generalmente enfermedades respiratorias y entéricas. Algunos coronavirus humanos (HCoV), como ser el HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-HKU, son conocidos por circular desde hace tiempo en la población causando infecciones estacionales y usualmente leves, asociadas con los síntomas del resfrío común. El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, abreviado de SARS-CoV-2, pertenece a la familia *Coronaviridae*, género Betacoronavirus, junto con el MERS-CoV y el SARS-CoV, coronavirus emergidos recientemente responsables de causar enfermedades graves en el humano.

Su genoma, de aproximadamente 30 kilobases de longitud, codifica para dieciséis proteínas no estructurales y cuatro proteínas estructurales: la proteína Spike, la proteína de la nucleocápside, la proteína de envoltura (proteína E) y la proteína de membrana (proteína

M). La proteína Spike, que constituye la estructura de espiga distintiva en la superficie del virus, tiene dos subunidades: S1 donde se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD), el cual interactúa con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), que actúa como receptor del virus en las células blanco, y la subunidad S2 que alberga la maquinaria de fusión. Por otra parte, la proteína M es una glicoproteína estructural localizada en la envoltura del virión, que desempeña un rol fundamental en el ensamblaje de nuevas partículas virales en las células del hospedero. La proteína E, que se encuentra en cantidades pequeñas y variables, también facilita el ensamblaje del virus, y cumple un rol fundamental a la hora de infectar a las células. Por último, la proteína N, que forma la nucleocápside del virus, presenta dos dominios necesarios para unirse al ácido ribonucleico, un dominio C-terminal y uno N-terminal.[Figura 1]

Para ingresar a la célula blanco, el SARS-CoV-2 se une, mediante la región RBD de su proteína Spike, a ECA-2. Al unirse, Spike sufre cambios conformacionales, en un proceso mediado por proteólisis, mediante el cual se expone un péptido de fusión que se encuentra en la subunidad S2 de dicha proteína. Este péptido se inserta en la membrana e induce la fusión viral. El virus ingresa a la célula por fusión de su membrana con la membrana celular, en la mayoría de los casos, y en ocasiones por endocitosis. Una vez que el virus ha logrado infectar las células diana del hospedero, comienza su mecanismo de replicación para formar nuevas partículas virales que infectarán nuevas células. [Figura 2] ^(1,2,3,4)

ECA-2 es una enzima cuya función fisiológica es la de hidrolizar la angiotensina II, importante para disminuir la presión arterial sistémica. Se trata de una proteína transmembrana que se expresa en varios órganos, incluidos los pulmones, el corazón, los riñones y el intestino. El reconocimiento del receptor es determinante para la infectividad del virus, así como su patogénesis y la gama de hospederos que será capaz de infectar. ^(5,6)

Resulta interesante que la presencia de la proteína Spike en la membrana de las células infectadas induce a que células vecinas expresen ECA-2, llevando a la fusión entre células y la consiguiente formación de sincitios. Se ha descrito previamente, en otras infecciones causadas por virus de la familia *Coronaviridae*, lesiones a nivel del tejido pulmonar ocasionadas por la formación de estos complejos celulares multinucleados. ⁽²⁾

En años previos, se produjeron otras epidemias causadas por virus pertenecientes a esta misma familia como son el SARS-CoV y el MERS-CoV; conocidas como síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS), registradas en 2002 en

China y en 2012 en Arabia Saudita, respectivamente. Sin embargo, el SARS-CoV-2 los ha superado ampliamente en contagiosidad y en el grado de expansión territorial⁽⁸⁾

Como fue mencionado anteriormente, a fines de 2019 se registraron los primeros casos de neumonía atípica en humanos ocasionada por un agente desconocido en Wuhan, China. A partir de muestras de esputo de estos pacientes se pudo identificar, mediante amplificación por PCR y secuenciación, a un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2 como el agente responsable de estas infecciones, y se llamó a la enfermedad causada por este virus de COVID-19.

Los casos iniciales, tenían el antecedente común de haber estado en un mercado de alimentos en días previos al inicio de los síntomas. Se cree desde entonces, que el SARS-CoV-2 se originó a partir de un coronavirus de murciélagos, aunque aún no está claro si alguna especie intermedia participó en el pasaje del virus al humano.

En los humanos el SARS-CoV-2 se transmite de forma directa por gotitas respiratorias, también conocidas como gotitas de Pflugge. El virus ingresa por el tracto respiratorio del hospedero. Se estima que, una vez adquirido el virus, la incubación de este tiene un promedio de tiempo de 5 días, con una duración total de 14 días. Las personas infectadas por SARS-CoV-2 pueden ser asintomáticas o presentar síntomas, que van de leves a graves. Dentro de las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran cuadros respiratorios leves que producen síntomas tales como: tos, odinofagia, rinorrea, anosmia, ageusia, fiebre, cefalea, artromialgias, astenia, adinamia; hasta cuadros de mayor gravedad como son neumonía con insuficiencia respiratoria, disnea, polipnea mayor a 20 respiraciones por minuto, saturación de oxígeno en sangre menor a 92%, infiltrados pulmonares múltiples en radiografías de tórax, incluso pudiendo conducir a la muerte. También puede originar síntomas gastrointestinales como diarrea, vómitos y dolor abdominal.⁽⁸⁾

Con respecto a los aspectos clínicos, si bien la mayoría de los pacientes cursan la enfermedad de manera leve (80% aproximadamente), una minoría de casos que presentan síntomas de gravedad requerirán ingreso hospitalario, específicamente a unidad de cuidados intensivos (UCI), debido a falla respiratoria, shock séptico y disfunción orgánica múltiple. Se ha establecido que la población de mayor riesgo está comprendida por personas mayores a 65 años, y con múltiples comorbilidades como hipertensión arterial, diabetes mellitus, patologías cardiovasculares, pulmonares, individuos en estado de inmunosupresión natural o inducida, cáncer, entre otras. ⁽⁸⁾

Desde la declaración de la emergencia sanitaria a nivel mundial a principios del 2020, y en consecuencia a la capacidad mutagénica del SARS-CoV-2, surgieron diferentes variantes que generaron inestabilidad en el control sanitario a nivel mundial, ya que distintas cepas fueron responsables de las diversas formas de presentación de la enfermedad. A su vez, se generó una dificultad en el diagnóstico de la enfermedad e incertidumbre con respecto a la eficacia de la vacunación desarrollada hasta el momento. Algunas de las variantes que más generaron estragos fueron la Beta (reportada inicialmente en Sudáfrica a mediados de noviembre 2020, se caracteriza por generar síntomas comunes de la infección pero se transmite con mucha facilidad), la variante Delta (fue reportada inicialmente en India a mediados de junio 2021, su principal característica es que se transmite con mayor rapidez que sus predecesoras, puede escapar parcialmente a la inmunidad tanto natural como provocada por la vacunación), y por último la variante Ómicron (fue reportada inicialmente en Sudáfrica casi al mismo momento que fue encontrada la variante Delta, generó gran preocupación a nivel sanitario ya que presenta una gran facilidad de mutación y mayor tasa de contagios, a un ritmo superior a las de otras variantes). *[Figura 3]*

El 13 de marzo de 2020 en Uruguay, frente al diagnóstico de los primeros casos de COVID-19 en el país, se decidió decretar el estado de emergencia nacional sanitaria como consecuencia de la pandemia generada por el SARS-CoV-2. Desde ese momento, se implementaron distintos protocolos en busca de control de la enfermedad. Según datos formales del Sistema Nacional de Emergencia al 17 de abril de 2022, se contabilizaban 895775 casos de COVID-19, con un total de 7197 fallecimientos por dicha causa. En marzo del año 2021 se comenzó un exitoso plan de vacunación a nivel nacional, que cambió, sin lugar a duda, el curso de esta pandemia. El 5 de abril del año 2022, se decidió poner fin a la emergencia sanitaria.

Al igual que en el resto del mundo, en Uruguay la pandemia tuvo gran mortalidad, generó un considerable impacto socio económico, y resta aún conocer más sobre las consecuencias a largo plazo en la salud de la población recuperada de COVID-19.

Para el diagnóstico de infección activa por SARS-CoV-2 es necesario confirmar la presencia del virus, para lo que se utilizan principalmente dos ensayos de laboratorio; la detección de antígenos virales en secreciones respiratorias del paciente, conocido comúnmente como prueba de antígenos, y la identificación del genoma del virus mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), también en secreciones respiratorias. Ambas muestras pueden ser obtenidas mediante hisopados nasofaríngeos. ⁽⁸⁾

Frente a la amenaza que representa la infección por un patógeno, el cuerpo humano cuenta con diversos mecanismos de defensa denominados en su conjunto inmunidad. La misma puede ser clasificada, según su momento de acción y especificidad, en inmunidad innata o adaptativa.

La inmunidad innata corresponde a los mecanismos primarios de defensa que se activan de manera rápida frente a una amenaza. Esta se encuentra integrada por las barreras epiteliales, que intentan impedir el traspaso de los microorganismos al interior del organismo; y por componentes celulares y solubles. Frente al reconocimiento de un patógeno o ante injuria se pueden activar por un lado el proceso inflamatorio, con el consiguiente reclutamiento de leucocitos (principalmente neutrófilos y monocitos) al sitio de infección, y por otro lado la respuesta antiviral. Las principales citoquinas que propician el estado antiviral son los interferones de tipo I (alfa y beta), induciendo en las células receptoras diversos cambios tendientes a limitar la infección y/o la replicación del virus, como ser: inhibición de transcripción y traducción viral y degradación de proteínas virales. ⁽²⁾

Por otro lado, la inmunidad adaptativa es aquella que se activa de forma más tardía y presenta una especificidad mayor frente a cada patógeno. Los componentes centrales de la inmunidad adaptativa son los anticuerpos, producidos a partir de la diferenciación de los linfocitos B, y los linfocitos T, los cuales se dividen en linfocitos T CD4+ colaboradores y linfocitos T CD8+ citotóxicos.

Esto lleva a que la inmunidad adaptativa, pueda ser dividida en dos ramas:

- La inmunidad adaptativa celular: a cargo de los linfocitos T. Dentro de ésta a su vez existirán subclasificaciones según el tipo de linfocito T activado (CD4+ o CD8+) y sus mecanismos de acción.
- La inmunidad adaptativa humoral: a cargo de los anticuerpos secretados por las células plasmáticas.

Células especializadas que se encuentran en el sitio de infección llamadas de células presentadoras de antígenos (APCs) son capaces de reconocer y procesar microorganismos potencialmente patógenos para presentar sus antígenos en los órganos linfoides secundarios a linfocitos T vírgenes específicos, los cuales se activarán y diferenciarán a células efectoras.

Por otro lado, los microorganismos o sus antígenos pueden llegar de forma directa a los órganos inmunitarios anteriormente nombrados, donde pueden ser reconocidos de forma directa por linfocitos B vírgenes específicos, los que se activarán para diferenciarse a células

plasmáticas, encargadas de la secreción de anticuerpos. Es importante destacar el papel que cumplen los linfocitos Thf para colaborar en este proceso. ⁽²⁾

Existen múltiples ejemplos de infecciones en las cuales la interacción entre el patógeno y la respuesta inmune desencadenada por el mismo es determinante para el curso clínico de la enfermedad, lo cual es particularmente cierto en el caso de COVID-19. El objetivo de este trabajo será indagar sobre la respuesta inmune humoral inducida frente a la infección por SARS-CoV-2.

Los anticuerpos son proteínas compuestas por cuatro cadenas de aminoácidos -dos llamadas de cadenas pesadas, iguales entre sí, y dos cadenas livianas, también idénticas entre sí-. Tanto las cadenas livianas como las pesadas poseen en el extremo amino terminal un dominio variable que en su conjunto conforman el sitio de unión al antígeno, que le otorga especificidad al anticuerpo. Por otro lado las regiones carboxilo terminales están conformadas por dominios constantes. ⁽²⁾

En su conjunto la cadena ligera más los dos dominios proximales al extremo amino terminal de la cadena pesada constituyen la llamada región "Fab" del anticuerpo, encargada de reconocer el antígeno; mientras que el resto de los dominios de la cadena pesada constituyen la región denominada de "Fc", responsable de la interacción del anticuerpo con receptores celulares. ⁽²⁾

Las cadenas pesadas que presentan los anticuerpos permiten clasificar a los mismos en diferentes tipos o clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Todos los anticuerpos pertenecientes a una misma clase poseerán iguales regiones constantes en sus cadenas pesadas y actuarán de la misma forma una vez unidos a sus receptores, siendo la única diferencia las regiones Fab, que serán las que generen la activación a raíz del contacto con un antígeno y no con otro, brindando así especificidad a la respuesta inmune humoral. ⁽²⁾

Una vez que los linfocitos B han reconocido su antígeno, diferenciándose a plasmocitos y secretando anticuerpos específicos, estos tendrán diferentes mecanismos de acción para intentar contener y eliminar la amenaza, de entre los cuales se destacan:

- **Neutralización:** los anticuerpos pueden limitar la infección celular al unirse a antígenos de superficie que el microorganismo utiliza para interactuar e ingresar en las células del hospedero.
- **Opsonización:** los anticuerpos unidos a un patógeno a través de su región variable, pueden ser reconocidos a través de la región Fc por receptores específicos situados en

los fagocitos. lo cual promueve la ingesta y degradación de los microorganismos por macrófagos y neutrófilos.

- **Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos:** ciertos leucocitos (entre ellos se destaca el papel de las células NK) poseen receptores específicos para la regiones Fc de los anticuerpos, el reconocimiento por parte de las células NK de complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de una célula infectada propicia la secreción de proteínas con actividad citotóxica (perforinas y granzimas) sobre la célula infectada .
- **Activación de la vía clásica del complemento:** los anticuerpos de tipo IgG e IgM unidos a los patógenos pueden activar la llamada de vía clásica del complemento, la cual culminará en la formación del llamado “Complejo de ataque a la membrana” en la membrana del patógeno, provocando su lisis.

Respecto de la inmunidad adaptativa contra los virus cobran particular relevancia algunos de estos mecanismos. En una primera instancia, la neutralización mediante anticuerpos impide la entrada del virus a la célula y la replicación viral. Y, por otra parte, la eliminación de células ya infectadas por el virus por parte de linfocitos T CD8 + y mediante el mecanismo de ADCC, es fundamental para eliminar los reservorios virales. ⁽⁹⁾

Dada la relevancia de la respuesta inmune humoral en el curso de las infecciones virales, y en particular de la infección por SARS-CoV-2 se han desarrollado numerosos ensayos a nivel mundial que buscan determinar y/o cuantificar la presencia de anticuerpos específicos contra este. En nuestro país, a partir del trabajo conjunto de la Universidad de la República, el Institut Pasteur de Montevideo y la empresa ATGen, se desarrolló un ensayo de tipo ELISA que permite determinar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia de anticuerpos anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero. El mismo ha sido ampliamente empleado en ensayos nacionales de seroprevalencia y de evaluación de la respuesta inmune humoral a la vacunación contra SARS-CoV-2. [Anexo 1]. En este trabajo nos proponemos utilizar este ensayo para determinar y cuantificar la presencia de anticuerpos específicos en un grupo pequeño de muestras de individuos que cursaron la infección por SARS-CoV-2 e individuos sin diagnóstico previo de infección de nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Indagar sobre la respuesta inmune humoral, particularmente la cinética de comportamiento de los anticuerpos, generado frente a la infección por SARS-CoV-2

Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles de anticuerpos en pacientes que hayan cursado la infección por SARS CoV-2, lo cual tiene como finalidad poder acercarnos al empleo experimental de un ensayo serológico de tipo ELISA, utilizando un kit desarrollado a nivel local y aplicándolo sobre muestras obtenidas en nuestro país.

METODOLOGÍA

1. Revisión Bibliográfica

- 1.1. Estrategia de búsqueda: se utilizaron las siguientes palabras claves: SARS-CoV-2 y anticuerpos anti RBD, SARS-CoV-2 y respuesta inmune humoral, SARS-CoV-2 no vacuna, para realizar la búsqueda de información disponible en bases de datos bibliográficas de acceso público (PubMed, Portal Timbó, Google Scholar).
- 1.2. Filtros: se utilizaron trabajos científicos únicamente en idioma inglés y español y estudios publicados a partir del año 2020.

No se utilizaron revisiones que utilicen animales o plantas para investigar ni artículos no disponibles en su totalidad.

2. Cuantificación de los niveles de anticuerpos específicos contra el dominio RBD de SARS-CoV-2:

2.1. Diseño del estudio y población a evaluar:

El presente trabajo se enmarca en el proyecto titulado “*Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo*” el cual implicó la realización de extracciones seriadas de sangre periférica para determinar la presencia de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 en suero, de acuerdo con el protocolo en adjunto [Anexo 2]. En este trabajo en particular se cuantificaron los niveles de anticuerpos específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 en las muestras provenientes de la primera extracción de sangre realizada en marzo de 2021, que resultaron seropositivas en el análisis cualitativo inicial. De una población de 200 individuos analizados en esta instancia, se obtuvieron 8 sueros que resultaron seropositivos en el ensayo los que constituyeron nuestra población seropositiva a analizar. En cuanto a las muestras utilizadas como controles, se seleccionaron 8 muestras que habían resultado negativas a la presencia de anticuerpos específicos en el análisis previo.

2.2. Muestras biológicas:

Se utilizaron muestras de suero obtenidas a partir de sangre venosa periférica en un muestreo realizado entre el personal del Institut Pasteur de Montevideo en los días 17 y 18 de marzo de 2021 y almacenadas a -20º desde entonces. La participación fue voluntaria y todos los participantes brindaron un consentimiento informado. Las muestras se encuentran codificadas y anonimadas de manera que la identidad de los participantes en el proyecto está protegida.

2.3. Prueba serológica:

Para el análisis serológico se utilizó el kit comercial “COVID-19 IgG QUANT ELISA” desarrollado por la Universidad de la República, el Institut Pasteur de Montevideo y la compañía ATGen. El

mismo ha sido evaluado utilizando plasmas y sueros de distintos orígenes y comparado con otros ensayos comerciales. Según un estudio interno realizado con 200 muestras negativas y 146 muestras positivas, su sensibilidad y especificidad fue de 100% en ambos casos. El mismo fue registrado y aprobado para su uso por el MSP. Esta prueba permite la detección cualitativa o cuantitativa de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra el RBD de la glicoproteína Spike del virus SARS-CoV 2, tanto en muestras de suero como plasma humano. Para realizar la prueba en formato cuantitativo, el kit incluye dentro de sus reactivos un conjunto de estándares secundarios calibrados contra el estándar internacional generado por la OMS, que permite expresar los resultados en unidades de unión de anticuerpos (*Binding Antibody Units*) por mililitro (BAU/mL). Para la realización de la técnica se siguieron las instrucciones provistas en el kit (Anexo).

En forma breve, este kit utiliza microplacas sensibilizadas con el fragmento RBD de la glicoproteína Spike del SARS-CoV-2. Se pre diluyeron las muestras de suero y se incubaron por 30 minutos a 37°C, junto con los controles y calibradores provistos en el kit. Luego se lavó la placa y se incubó con un conjugado enzimático anti-IgG humana por 30 minutos a 37°C. Finalmente, se volvió a lavar la placa y se agregó sustrato durante 20 minutos a temperatura ambiente, la reacción colorimétrica se detuvo mediante el agregado de solución de frenado. Una vez realizado esto se midió la densidad óptica a 450nm con corrección a 620 nm.

A partir de los calibradores provistos en el kit se generó una curva estándar, a partir de esta se interpolaron los valores de densidad óptica de las muestras, obteniendo los niveles de anticuerpos para cada muestra expresados en BAU/ml. En caso de ser necesario se repitió el ensayo empleando una dilución mayor de la muestra de manera que el valor de densidad óptica registrados estuviese dentro del rango lineal de la curva y se corrigió por el factor de dilución.

2.4. Análisis de datos

Se comparó la variable cuantitativa niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD expresada en BAU/ml entre los grupos de individuos positivos para la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 y negativos.

La variable se representó mediante gráfico de dispersión de puntos, las medias y desvíos estándar o las medianas y los rangos intercuartílicos. Se calcularon los intervalos de confianza al 95% para las medias respectivas. Se testeó mediante la prueba estadística t (distribución normal) o Kruskal-Wallis-Mann-Whitney (distribución no normal) con corrección de Bonferroni. Se utilizó el software GraphPad 9 para realizar los análisis estadísticos y para la construcción de gráficos. No se realizó estudio de variables cualitativas.

2.5. Consideraciones éticas

Se solicitó estudio del CEI para autorizar el uso de sueros de pacientes que fueron previamente extraídos luego de la firma de consentimiento informado incluido dentro de un protocolo original ya registrado en el Registro/Autorización de Proyectos de Investigación en Seres Humanos del Ministerio de Salud Pública (MSP), bajo el N° 956220. El mismo ya fue aprobado también por el Comité de Ética Institucional del Institut Pasteur de Montevideo. Las actividades que se realizaron en este proyecto siguen las mismas consideraciones éticas presentadas en el proyecto original. El riesgo para los participantes fue mínimo y estaba relacionado a la extracción de una muestra de sangre venosa periférica. A los efectos de salvaguardar la dignidad, derechos, seguridad y bienestar de todos los participantes actuales y potenciales de la investigación, se mantuvo el anonimato de los datos de los participantes durante todo el estudio. Los responsables del proyecto asignaron a cada participante un número de identificación que se utilizó para etiquetar los cuestionarios y las muestras clínicas. Para asegurar la privacidad de la información recabada, sólo los responsables tienen acceso a la tabla que relaciona el número de identificación con el participante.

RESULTADOS

Respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2

El objetivo de estudiar la generación de anticuerpos frente a la infección por SARS-CoV-2 es conocer la respuesta natural del sistema inmune frente a este patógeno; desde su cinética inicial, mediante la identificación de cuáles inmunoglobulinas aparecen primero y cuánto tiempo permanecen en el hospedero, hasta la protección inmunológica que tendrán los pacientes luego de haber superado la enfermedad.

En relación a la respuesta humoral frente a la infección por SARS-CoV-2 se ha observado que se generan anticuerpos específicos principalmente contra dos antígenos virales: la proteína N, y la glicoproteína Spike. Los anticuerpos anti-Spike han cobrado especial relevancia en tanto pueden tener función neutralizante, impidiendo la interacción del dominio RBD con el receptor ECA-2 en las células del hospedero, imposibilitando por tanto el ingreso del virus a las mismas limitando su capacidad infectiva.

En este sentido, se han identificado múltiples anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción entre la proteína Spike y el receptor, algunos de los cuales han mostrado potencial terapéutico. Los anticuerpos presentan diferencias en avidéz, modo de unión y capacidad de neutralización del virus, a pesar de tener afinidades altas por el RBD de la proteína Spike. Sorprendentemente, mientras que un anticuerpo altamente potente inhibe la formación de sincitios mediada por Spike, otros que son neutralizantes más débiles podrían potenciar esa unión célula-célula. Esto sugeriría que la potencial efectividad de un anticuerpo neutralizante estaría influenciada por un gran número de factores. ⁽²⁾

Características de la respuesta de anticuerpos en la infección por SARS-CoV-2

Un aspecto importante para entender la respuesta inmune humoral frente a la infección por SARS-CoV-2 y la aplicabilidad de los ensayos serológicos es comprender la dinámica de aparición y mantenimiento en el tiempo de anticuerpos específicos. La gran mayoría de los individuos infectados seroconvierten 5-10 días después del comienzo de los síntomas, con aproximadamente un 90% de seroconversión al día 10. Los principales antígenos examinados para determinar seroconversión han sido las proteínas Spike y N. En este sentido, es de destacar que los títulos de IgGs para la proteína N y la proteína Spike presentan una correlación alta entre sí.

La detección de anticuerpos contra la proteína Spike de SARS-CoV-2 es de entre un 91% y un 99% en estudios grandes. Por ejemplo, en el artículo de Secchi et al.⁽¹⁵⁾, se observó que, en líneas generales, múltiples anticuerpos se desarrollaron a las 4 semanas del inicio de los síntomas en el 95% de los pacientes estudiados. Respecto a la presencia de anticuerpos anti RBD en instancias tempranas se observó que, en la primera semana post inicio de síntomas, el 30% de los pacientes tenían anticuerpos de tipo IgA, IgG e IgM, 25% presentaba dos clases de anticuerpos, y el 45% de los pacientes presentaba una sola clase de anticuerpos, mayoritariamente IgM o IgA.

En el trabajo de Secchi et al.⁽¹⁵⁾ también se observó que los niveles de IgM anti-RBD tienen un pico hacia la segunda semana, seguido de un descenso, volviéndose no detectables hacia el tercer mes post comienzo de síntomas, los de IgA aumentarían de la primera a la cuarta semana, mientras que las IgGs contra el RBD tuvieron una tendencia a aumentar hasta el tercer mes de seguimiento del ensayo. Las inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM e IgA dirigidas contra la proteína Spike se desarrollarían de manera prácticamente simultánea en individuos infectados, aunque hay ciertas discrepancias entre los trabajos analizados.

En el artículo de los autores Kurano, Morita et al.⁽¹²⁾; se analizó de manera detallada la evolución del título de distintos tipos de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) contra diferentes proteínas virales.

Respecto a los anticuerpos contra las proteínas S1 y RBD, la presencia de IgA se observó antes que las de IgG e IgM, y los títulos de IgA aumentaron más rápido que los de IgM e IgG hasta el día 10, sin embargo, después de este día los títulos de IgG fueron más altos y se mantuvieron elevados por 6 meses. En cuanto a los anticuerpos contra nucleocápside, los títulos de IgA e IgG aumentaron más rápidamente que los de IgM, hasta el día 34 y los títulos de IgG fueron mayores que los de IgA e IgM en la fase tardía.

Para el caso de la IgM, los títulos aumentaron más rápido contra S1, seguidos de RBD y luego NCP hasta el día 13, donde los títulos contra RBD y S1 fueron similares. Respecto a IgG, casi todo el tiempo los títulos contra S1 eran los más altos, seguidos por los de RBD y NCP. Para las IgA, los títulos más altos eran contra el NCP hasta el día 19, y a partir del día 45, los títulos contra NCP eran más bajos que para RBD y S1. En cuanto a la seroconversión, se vio que la IgM contra NCP es la última en aparecer y ocurre con menos frecuencia, comparándola con la IgM específica de RBD y S1. Además, no se observó diferencia significativa entre el tiempo de

seroconversión entre anticuerpos IgA e IgG contra S1 y RBD. En general, se observaron diferencias significativas en la cinética de aparición de anticuerpos respecto a las proteínas del virus. Los títulos contra S1 y RBD eran más elevados en un período de tiempo más prolongado respecto a los de NCP. La respuesta IgM e IgA a S1 ocurrieron antes que las de IgA a NCP. También se observó que, si bien los títulos de IgA se generaban más rápido, los títulos de anticuerpos IgG eran más mantenidos en el tiempo que los de IgA e IgM.

En el trabajo de Deshpande et al.⁽¹⁴⁾, donde se evaluó la cinética de aparición de los anticuerpos en pacientes que cursaron la enfermedad hasta los 8 meses posteriores, se pudo valorar que las IgG contra RBD aparecieron ligeramente antes y se mantuvieron sustancialmente más persistentes que las IgG anti-N en el curso del estudio, en concordancia con el trabajo mencionado anteriormente. Respecto a los anticuerpos IgG contra estas dos proteínas, se observó que la seropositividad alcanza su máximo en la cuarta semana, pero los títulos relativos de IgG anti-N y anti-RBD continúan aumentando hasta la sexta semana, seguido de una disminución en los títulos relativos durante las semanas séptima y diecisiete, para luego mantenerse constantes.

Cinética de aparición de anticuerpos. Pacientes sintomáticos y asintomáticos

Otro aspecto interesante que explorar, dada la heterogeneidad de manifestaciones clínicas de la COVID-19, es la relación entre la evolución clínica de la infección por SARS-CoV-2 y la respuesta inmune humoral inducida.

En el artículo de Long et al.⁽¹⁶⁾ se estudiaron 37 pacientes diagnosticados por PCR y que no presentaron ningún síntoma clínico en los siguientes días luego de realizado el diagnóstico. La media de días en la que se detectó SARS-CoV-2 mediante PCR en los pacientes asintomáticos fue de 19 días, siendo mayor que en los pacientes sintomáticos. No se detectaron anticuerpos IgG en el 40% de los individuos asintomáticos en la fase temprana de la infección en comparación con los sintomáticos en los cuales este porcentaje fue del 12.9% de los pacientes. En fases más tardías se detectaron IgG específicas en el 81.1% (30/37) del grupo asintomático y 83.3% (31/37) del grupo sintomático, en una ventana de 3 a 4 semanas post exposición al virus. Sin embargo, los valores de IgG específicos fueron significativamente menores en los asintomáticos en la fase aguda. En la etapa convaleciente, 8 semanas después de su alta hospitalaria, los valores de IgG del grupo sintomático se mantuvieron significativamente más elevados en comparación con el grupo asintomático. Esto sugiere que los pacientes que cursan

la infección por SARS-CoV-2 de forma asintomática tienen una respuesta inmune humoral más débil.

Por otro lado, en la publicación de Carsetti et al.⁽¹⁷⁾ fueron medidos los anticuerpos IgG e IgA dirigidos a la subunidad S1 de la proteína Spike, así como también las concentraciones de IgM específicas contra el RBD. Se analizaron los sueros recolectados observándose que tanto los pacientes con COVID-19 sintomática y los pacientes infectados por SARS-CoV-2 asintomáticos presentaron anticuerpos específicos. Sin embargo, los niveles de anticuerpos específicos fueron más altos en los pacientes con enfermedad más severa. Por otro lado, los anticuerpos de tipo IgM fueron detectados en la misma proporción en ambos grupos.

Se concluyó que los pacientes asintomáticos secretan IgA e IgM tempranamente luego del diagnóstico, y aquellos pacientes sin anticuerpos IgA e IgG en la primera semana, los desarrollaron más tardíamente. Tanto los niveles de IgA como de IgG descendieron con el tiempo y en pacientes asintomáticos volvieron a valores comparables con individuos no infectados a las 6-8 semanas post diagnóstico. Por el contrario, en pacientes con enfermedad moderada no descendieron al mismo tiempo. Nuevamente, se observó que los pacientes con enfermedad severa mostraban una respuesta humoral mayor.

En línea con lo anterior, en cuanto a la aparición de anticuerpos y su vinculación con la gravedad de la enfermedad, en distintos artículos, a pesar de que se estudiaron poblaciones diferentes, se ha llegado a la misma observación: los pacientes que se catalogaron como graves desarrollaron mayor cantidad de anticuerpos y en menor tiempo que los catalogados como no graves. Esto correlaciona, a su vez, con que los pacientes graves tenían cargas virales más elevadas, lo que puede contribuir a generar una respuesta humoral más sólida.

En el artículo de Tandhavanant et al.⁽¹⁸⁾ se vio que los pacientes que desarrollaron formas más graves de la infección, como neumonía bilateral, desarrollan antes los anticuerpos IgA que los pacientes que presentaban formas leves de la infección por SARS-CoV-2. Lo mismo sucedió en el trabajo de Lucas et al.⁽¹⁹⁾, allí se vio que los pacientes que no requirieron internación hospitalaria tuvieron menores niveles de anticuerpos que los que sí requirieron hospitalización. Las respuestas de anticuerpos fueron consistentemente más altas entre los sujetos hospitalizados.

En este estudio también se observó la cinética de anticuerpos en pacientes que fallecieron por infección y pacientes que no. El estudio reveló información importante respecto a esto, se encontraron niveles más bajos de anticuerpos antivirales en pacientes fallecidos. Los pacientes

fallecidos alcanzaron niveles más elevados de IgM e IgG anti-Spike que los pacientes dados de alta. Estas diferencias se explican debido a las diferencias en torno a la capacidad que presentan para eliminar el virus; los pacientes dados de alta fueron más eficientes en la eliminación en comparación con los fallecidos. Por lo tanto, la muerte por COVID-19 se correlacionó con un retraso en el desarrollo de la IgG específica del virus y la eliminación de este.

Otro artículo que demuestra lo mismo es el de Wang et al. ⁽³⁾, aquí se estudia la respuesta humoral en pacientes graves y no graves, entendiendo como graves aquellos que presentan dificultad respiratoria con neumonía, con frecuencia respiratoria ≥ 30 respiraciones/min, saturación de oxígeno $\leq 93\%$ en reposo, presión parcial de oxígeno/fracción de oxígeno inspirado ≤ 300 mmHg. Nuevamente se observó que los pacientes que cursaron la forma más grave de la enfermedad tuvieron mayor respuesta humoral que aquellos que presentaron sintomatología más leve.

El artículo de Haddad et al. ⁽²⁰⁾ no solo apoya que los pacientes con enfermedad grave desarrollan mayores niveles de anticuerpos, sino que también tienen una respuesta más precoz que los pacientes que cursan enfermedad leve.

Ensayos de diagnóstico serológico

Durante los años de pandemia, se produjeron por distintos laboratorios a nivel mundial diversos ensayos de diagnóstico serológico, entre los cuales se incluyen: ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), pruebas rápidas que detectan IgM/IgG en soporte inmunocromatográfico, y ensayos automatizados por quimioluminiscencia, entre otros.

Nuestra finalidad es, basándonos en la bibliografía disponible, analizar algunos de estos ensayos; sus diferencias, ventajas y desventajas.

Los ensayos serológicos pueden ser de naturaleza cualitativa (detectando únicamente la presencia o ausencia de anticuerpos específicos) o cuantitativos/semicuantitativos (estimando o determinando la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra). Los ensayos serológicos son útiles además para identificar futuros donantes para terapias con plasma, detectar seroconversión, realizar vigilancia serológica, entre otras aplicaciones. Las pruebas pueden estar diseñadas para detectar anticuerpos específicos contra antígenos virales en general o pueden servir para determinar la presencia de anticuerpos con capacidad neutralizante, estos

últimos pueden ser más útiles si se quiere evaluar la funcionalidad de los anticuerpos, pero la disponibilidad de este tipo de ensayos es menor.

Destacamos el artículo de DomBourian et al.⁽¹¹⁾, en el cual los autores evalúan el rendimiento analítico y comparativo de 2 ensayos serológicos para SARS-CoV-2 basados en ELISAs disponibles comercialmente que se dirigen a antígenos virales diferentes, el antígeno S1-RBD o el antígeno N, en muestras de plasma convaleciente, obtenido a partir de pacientes recuperados de COVID-19 con infección confirmada por PCR y libres de síntomas durante al menos 14 días previos a la donación. Destacamos el rol fundamental de los ensayos ELISA, que son los más utilizados mundialmente.

Los ensayos de ELISA comerciales a comparar fueron, la prueba Epitope Diagnostics Inc (EDI, San Diego, CA) el cual utiliza como antígeno a la proteína N de SARS-CoV-2 recombinante, y el Euroimmun ELISA (Lübeck, Alemania) el cual utiliza como antígeno a la subunidad S1 de la glicoproteína Spike de SARS-CoV-2, incluyendo al RBD.

Por los datos recolectados en el ensayo la especificidad del test EDI fue superior (99%) según el punto de corte definido por el fabricante en comparación con Euroimmun (96,8%). Pese a esto se resalta que el ensayo EDI tiene menor sensibilidad por no detectar respuesta de anticuerpos positivos cuando es baja o en el límite, que si fue posible con Euroimmun. Estos resultados sugieren que el rendimiento del test puede depender del antígeno específico utilizado, por lo que es posible que se requiera una combinación de dos o más antígenos para una mayor sensibilidad conservando la alta especificidad en la detección de anticuerpos.

Por otro lado, en el estudio de Weiss et al.⁽¹⁰⁾ se utiliza un ensayo de unión de anticuerpos de tipo Luminex como alternativa para evaluar la presencia de anticuerpos en sueros de individuos infectados y no infectados por SARS-CoV 2 específicos para dos proteínas recombinantes del mismo. El mismo consiste en un inmunoensayo basado en perlas de tipo multiplex en el cual perlas marcadas con diferentes fluoróforos son recubiertas con la proteína S trimérica o el RBD recombinantes, incubadas con las muestras de suero y plasma, y la presencia de anticuerpos evidenciada mediante un instrumento basado en láser; Luminex Flex Map 3D. Tiene como ventaja que se realiza en aproximadamente 2,5 horas, permite utilizar 20 veces menos antígeno que los ensayos de ELISA, y es particularmente útil para ensayos de testeo masivo.

Después de comprender la importancia de entender la respuesta inmune humoral frente a la infección por SARS-CoV-2, destacamos que a la hora de realizar el diagnóstico de COVID-19 se

dispone de varios métodos. Por un lado, los métodos directos, que buscan estructuras procedentes directamente del virus, como ser la detección de antígenos virales y la detección del genoma viral a través de PCR, que son útiles en el diagnóstico de infección activa. Y, por otro lado, encontramos los métodos de detección indirectos, que buscan elementos generados gracias a la respuesta inmune del hospedero frente a la infección, como pueden ser la detección de anticuerpos por ensayos serológicos o ensayos capaces de evaluar la respuesta inmune celular. En el caso de la infección por SARS-CoV-2 este tipo de ensayos no son útiles para el diagnóstico de infección activa, pero sí para estudiar infección pasada, así como evaluar el grado de protección inmunológica inducido por la infección natural y su duración en el tiempo.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se estudió la presencia de anticuerpos específicos de isotipo IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en el suero de 16 individuos pertenecientes al personal del Institut Pasteur de Montevideo obtenidos a partir de muestras de sangre extraídas el 17-18 de marzo de 2021. Para esto se empleó el kit COVID-19 IgG QUANT ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se describió anteriormente. Para determinar la presencia o no de anticuerpos se empleó la versión cualitativa del ensayo, se calculó el valor de corte o *cutoff*, y se expresaron los resultados en forma de ratio muestra/*cutoff* (Ratio M/CO). Las muestras con valores de Ratio M/CO menores a 0.9 se consideran negativas a la presencia de anticuerpos, mayores a 1.1 se consideran positivas para la presencia de anticuerpos, y entre 0.9 y 1.1 se consideran como indeterminadas.

Como se puede observar en la Tabla 1 [Figura 5], de las 16 muestras analizadas, 7 resultaron positivas para la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2, y 9 negativas, no obteniendo resultados indeterminados. De las muestras positivas 5 pertenecen a individuos que declararon diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 mediante PCR, una pertenece a un individuo que había recibido 15 días antes de la extracción una dosis de la vacuna contra SARS-CoV-2 CoronaVac (Sinovac), y la restante pertenece a un individuo que no declara infección confirmada por el virus. Es interesante el caso de la muestra 119 ya que la misma había sido analizada previamente en marzo del 2020 resultando positivo para la presencia de anticuerpos con una ratio M/CO de 1.7, pero en esta nueva instancia de análisis fue negativa. Es de destacar que esta muestra pertenece a un individuo sin diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2. Este resultado contradictorio puede deberse a un error experimental en

alguna de las dos instancias o a que, debido a que la muestra pasó más de un año almacenada a -20°C previo a este nuevo ensayo, se haya perdido reactividad. Todas las muestras con resultado negativo pertenecen a individuos que no declaran infección confirmada por SARS-CoV-2 ni vacunación.

También se determinaron los niveles de anticuerpos de las muestras empleando la versión cuantitativa del ensayo. Para esto se realizó una curva de calibración de entre 10-400 BAU/ml a partir de los estándares provistos en el kit y calibrados contra el estándar internacional. A partir de los valores de absorbancia obtenidos para las muestras se interpolaron de la curva de calibración los valores en BAU/ml y se multiplicaron por el factor de dilución para obtener los niveles finales de anticuerpos. Como se puede observar en la Figura x para las muestras negativas los niveles de anticuerpos fueron inferiores a 13 BAU/ml, mientras que para las muestras positivas los mismos se encuentran entre 14 y 496 BAU/ml. Si bien se trata de un número pequeño de muestras podemos observar que el ensayo permite determinar los niveles de anticuerpos presentes en el suero de individuos que cursaron la infección por SARS-CoV-2 y que la respuesta de estos es diferente. Si bien la media se ubica en 87 BAU/ml, dos de los individuos con infección confirmada muestran 5 veces más anticuerpos, estas diferencias pueden deberse a varios factores, características personales, el tiempo transcurrido desde la infección y el tipo de enfermedad. Si comparamos los resultados obtenidos cualitativa y cuantitativamente podemos observar que hay en general una buena correlación, las muestras con ratios M/CO más altos tienen niveles mayores de anticuerpos.

DISCUSIÓN

Luego de realizada una exhaustiva revisión bibliográfica, se pudo observar en lo que respecta a los resultados, que los mismos han sido parcialmente concluyentes. Debido a la amplia información que hay respecto a la pandemia, se desprendieron datos que en algunas oportunidades podrían resultar contradictorios. Esto también puede estar relacionado con que a pesar de que se ha generado mucha información sobre la respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2 de manera rápida, la emergencia del virus y la epidemia generada por el mismo no dejan de ser eventos relativamente recientes.

Los artículos analizados en este trabajo fueron internacionales, debido a la escasa información proveniente de Uruguay, por lo que no se puede asegurar que los resultados puedan ser totalmente extrapolados a nuestro medio (dada las diferencias en el sistema de salud, abordaje de la pandemia, así como la inmunidad de la población).

Respecto a la respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2, no cabe dudas del importante rol de la formación de anticuerpos contra la glicoproteína Spike y su función neutralizante.

En los distintos artículos citados y leídos, coincidían en que dicha proteína es en gran parte responsable del desarrollo de la infección, ya que mediante el dominio RBD es capaz de unirse al receptor ECA-2 presente en algunos órganos (donde el pulmón cobra relevancia por motivos considerables de morbimortalidad en los pacientes). Se observó que, el reconocimiento por parte del receptor es un determinante clave para lograr la infectividad, ingreso del virus al huésped, y la severidad de su patogenia.

Por lo descrito anteriormente, se cree que un punto clave donde se debería intervenir para evitar el desarrollo, o en su defecto; la severidad de la enfermedad es en el bloqueo de interacción entre la proteína Spike y el receptor, receptor, sobre todo en etapas tempranas de la infección. En este sentido, cobran relevancia el uso de anticuerpos monoclonales específicos, por ejemplo.

Respecto a la cinética de aparición de los distintos tipos de anticuerpos, la información obtenida no es del todo concluyente hasta el momento. Si bien en los artículos leídos se observaron discretas diferencias entre individuos respecto a los días de aparición de estos, se podría concluir que la respuesta de IgG contra Spike y RBD es más potente y duradera, que la de IgA e IgM.

Consideramos que, en general, se coincide en que: los anticuerpos IgA e IgM son los primeros

en aparecer, pero a su vez son los primeros en bajar sus títulos, cobrando un rol especial los anticuerpos IgG, en donde la seroconversión es más tardía, pero mantenida en el tiempo (incluso 6 meses post infección).

Cuando analizamos los títulos de anticuerpos presentes en pacientes sintomáticos y asintomáticos para la infección, se describe que, en el primer grupo de pacientes, los títulos de IgG que generaron fueron mayores. En general, los pacientes asintomáticos presentaron títulos de anticuerpos, de distintos isotipos y diferentes especificidades, menores que los pacientes sintomáticos, donde la respuesta inmune humoral luego de la infección sería mayor.

En cuanto a la relación entre la gravedad de la enfermedad y la respuesta de anticuerpos los distintos artículos citados parecen coincidir; los pacientes que estuvieron hospitalizados y desarrollaron formas graves de la enfermedad, tuvieron una respuesta inmune humoral mayor, llegando a títulos de anticuerpos más altos que los encontrados los grupos catalogados como de formas no graves.

Información relevante se desprendió del artículo de Lucas et al.⁽¹⁹⁾, ya que decidieron estudiar qué ocurría con los anticuerpos de pacientes fallecidos comparado con pacientes que requirieron internación pero fueron dados de alta. Los pacientes fallecidos, mostraron niveles más bajos de anticuerpos; algo que podría resultar controversial ya que, como se mencionó antes los pacientes de mayor gravedad parecen alcanzar títulos más elevados.

Sin embargo, a la conclusión que se llegó en dicho artículo, fue que la muerte por COVID-19 se correlacionó con un retraso en el desarrollo de la IgG específica del virus y la eliminación del mismo.

DISCUSIÓN EXPERIMENTAL

De las distintas muestras analizadas en el Institut Pasteur, se desprendieron datos interesantes. Dentro de los 16 sueros analizados, 7 resultaron positivos para la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD, y 9 negativos. La particularidad de la muestra 119 (que en el año 2020 había dado positivo y ahora negativa), nos hace plantearnos si este cambio en la seroconversión es debido a cuestiones técnicas u experimentales.

En torno a los datos cuantitativos aportados, consideramos que hubo una buena relación entre lo cualitativo con este último parámetro. Las muestras consideradas como negativas tenían valores de anticuerpos inferiores a 13 BAU/ml, y las muestras consideradas positivas eran

superiores a dicho valor. Mención especial tienen dos muestras de individuos que tienen 5 veces más anticuerpos que la media. Creemos que podría relacionarse con factores tanto personales o experimentales. Dentro de los personales, si bien no contamos con datos de los individuos en torno a: su edad, la presencia de comorbilidades, el transcurso de la enfermedad (síntomas presentados, días de evolución, si requirió hospitalización); consideramos que hubiera sido informativo para poder correlacionar si esos niveles elevados de anticuerpos se debieron a un curso de la enfermedad de manera más grave que el resto del grupo, pudiendo haber formado una respuesta inmune humoral mayor.

CONCLUSIONES

En base a la bibliografía consultada y los datos disponibles hasta el momento, podemos concluir que la respuesta inmune humoral tiene una importancia relevante en el transcurso de la infección, la severidad del cuadro clínico y el desenlace de la enfermedad.

El momento de aparición de los anticuerpos (principalmente IgGs y sus niveles), presentan un papel fundamental en el control de la infección, y por lo tanto, en el pronóstico de la enfermedad por SARS-CoV-2.

Además, considerando que, gran parte de la información es obtenida en base a estudios internacionales, creemos que podría ser útil a nivel país realizar investigaciones con una muestra representativa que permita un mejor desarrollo en cuanto a políticas sanitarias.

En torno al objetivo experimental planteado, si bien somos conscientes que se trata de una muestra selectiva de personas de nuestro país, por lo cual no es posible extrapolar estos resultados a nivel poblacional; debemos destacar que las muestras analizadas tuvieron una buena correlación tanto cualitativa como cuantitativamente; de las pruebas analizadas 7 resultaron positivas (de las cuales 5 informaban diagnóstico previo confirmado) y de las pruebas negativas ninguna tenía diagnóstico previo. Esto nos permite reafirmar, la buena especificidad y sensibilidad del test COVID-19 IgG QUANT ELISA desarrollado por la Universidad de la República, el Institut Pasteur de Montevideo y la compañía ATGen.

Como hemos observado en el transcurso de los últimos años de pandemia, el virus SARS-CoV-2 se caracteriza por su alto poder mutagénico, esto ha planteado un gran desafío para la ciencia y los sistemas sanitarios a la hora de generar protocolos de acción. Si bien hoy en día ha finalizado la emergencia sanitaria como tal, hay que considerar fuertemente que no estamos exentos a nuevas variantes y brotes a futuro. Por lo tanto, la actualización constante de información es un pilar fundamental.

Sin entrar en detalles profundos en torno a la vacunación (ya que consideramos es un tema amplio para ser abarcado en dicha revisión), creemos pertinente y un buen punto para seguir trabajando en un futuro, realizar un estrecho seguimiento de los individuos vacunados y la cinética de anticuerpos, a expensas de poder obtener más información respecto a la inmunidad de memoria que somos capaces de generar a largo plazo respecto a la infección por SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-COV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in Immunology*. 2020;41(12):1100–15. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
2. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or moderate covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(18):1757–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp2009249>
3. Wang H, Yan D, Li Y, Gong Y, Mai Y, Li B, et al. Clinical and antibody characteristics reveal diverse signatures of severe and non-severe SARS-COV-2 patients. *Infectious Diseases of Poverty*. 2022;11(1). <https://doi.org/10.1186/s40249-022-00940-w>
4. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-COV-2. *Nature*. 2020;581(7807):221–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
5. Cao W, Dong C, Kim S, Hou D, Tai W, Du L, et al. Biomechanical characterization of SARS-COV-2 spike RBD and human ACE2 protein-protein interaction. *Biophysical Journal*. 2021;120(6):1011–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.007>
6. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-COV-2. *Nature*. 2020;581(7807):221–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
7. Asarnow D, Wang B, Lee W-H, Hu Y, Huang C-W, Faust B, et al. Structural insight into SARS-COV-2 neutralizing antibodies and modulation of Syncytia. *Cell*. 2021;184(12). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.033>
8. Coronavirus [Internet]. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/coronavirus>
9. Abbas A.K, Lichtman A. H. y Pober J. S. 5o Ed. “Inmunología celular y molecular”. Saunders-Elsevier. (2004).
10. Weiss S, Klingler J, Hioe C, Amanat F, Baine I, Kojic EM, et al. A high through-put assay for circulating antibodies directed against the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2). 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20059501>
11. DomBourian MG, Annen K, Huey L, Andersen G, Merkel PA, Jung S, et al. Analysis of covid-19 convalescent plasma for SARS-COV-2 IGG using two commercial immunoassays. *Journal of Immunological Methods*. 2020;486:112837. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112837>
12. Kurano M, Morita Y, Nakano Y, Yokoyama R, Shimura T, Qian C, et al. Response kinetics of different classes of antibodies to SARS-cov2 infection in the Japanese population: The Iga and IGG titers increased earlier than the IGM titers. *International Immunopharmacology*. 2022;103:108491. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108491>
13. Dinç HÖ, Demirci M, Özdemir YE, Sirekbasan S, Aktaş AN, Karaali R, et al. Anti-SARS-cov-2 IGG and neutralizing antibody levels in patients with past COVID-19 infection: A longitudinal study. *Balkan Medical Journal*. 2022; <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2022.2021-8-131>
14. Deshpande GR, Kaduskar O, Deshpande K, Bhatt V, Yadav P, Gurav Y, et al. Longitudinal Clinico-serological analysis of anti-nucleocapsid and anti-receptor binding domain of spike protein antibodies against SARS-COV-2. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;112:103–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.024>
15. Secchi M, Bazzigaluppi E, Brigatti C, Marzinotto I, Tresoldi C, Rovere-Querini P, et al. Covid-19 survival associates with the immunoglobulin response to the SARS-COV-2 spike receptor binding domain. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(12):6366–78. <https://doi.org/10.1172/JCI142804>
16. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic

- SARS-COV-2 infections. *Nature Medicine*. 2020;26(8):1200–4. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
17. Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, Terreri S, Corrente F, Capponi C, et al. Different innate and adaptive immune responses to SARS-COV-2 infection of asymptomatic, mild, and severe cases. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.610300>
 18. Tandhavanant S, Koosakunirand S, Kaewarpai T, Piyaphanee W, Leungwutiwong P, Luvira V, et al. Longitudinal analysis to characterize classes and subclasses of antibody responses to recombinant receptor-binding protein (RBD) of SARS-COV-2 in COVID-19 patients in Thailand. *PLOS ONE*. 2021;16(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255796>
 19. Lucas C, Klein J, Sundaram M, Liu F, Wong P, Silva J, et al. Kinetics of antibody responses dictate COVID-19 outcome. *medRxiv: The Preprint server for health sciences*. 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.20248331>
 20. Haddad NS, Nguyen DC, Kuruvilla ME, Morrison-Porter A, Anam F, Cashman KS, et al. Elevated SARS-COV-2 antibodies distinguish severe disease in early COVID-19 infection. *bioRxiv : The preprint server for biology*. 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.12.04.410589>
 21. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *StatPearls [Internet]*. 2022; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
 22. Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-COV-2: Basic concepts, origin and treatment advances. *Gaceta de México. Permanyer*; 2021;157(1). <https://doi.org/10.24875/GMM.M21000524>
 23. Dto de Estadística y Epidemiología. *Nature: ¿Las oleadas de covid se están volviendo más predecibles? las nuevas variantes de omicron ofrecen una pista. Dto de Estadística y Epidemiología-HospJR Vidal*; 2022. <https://dtoepidemiologia.wordpress.com/2022/05/11/nature-las-oleadas-de-covid-se-estan-volviendo-mas-predecibles-las-nuevas-variantes-de-omicron-ofrecen-una-pista/>
 24. SNE. *Visualizador de Casos Coronavirus covid-19 en Uruguay [Internet]. Sistema Nacional de Emergencias*. 2022. <https://www.gub.uy/sistema-nacional-emergencias/pagina-embebida/visualizador-casos-coronavirus-covid-19-uruguay>
 25. Castro Dopico X, Muschiol S, Grinberg NF, Aleman S, Sheward DJ, Hanke L, et al. Probabilistic classification of anti-SARS-COV-2 antibody responses improves Seroprevalence estimates. *Clinical & Translational Immunology*. 2022;11(3). <https://doi.org/10.1002/cti2.1379>
 26. Lee B, Ko J-H, Park J, Moon H-W, Baek JY, Jung S, et al. Estimating the neutralizing effect and titer correlation of semi-quantitative anti-SARS-cov-2 antibody immunoassays. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.822599>
 27. Miyakawa K, Kubo S, Stanleyraj Jeremiah S, Go H, Yamaoka Y, Ohtake N, et al. Persistence of robust humoral immune response in coronavirus disease 2019 convalescent individuals over 12 months after infection. *Open Forum Infectious Diseases*. 2021;9(2). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab626>
 28. Pérez-Olmeda M, Saugar JM, Fernández-García A, Pérez-Gómez B, Pollán M, Avellón A, et al. Evolution of antibodies against SARS-COV-2 over seven months: Experience of the nationwide Seroprevalence Ene-COVID study in Spain. *Journal of Clinical Virology*. 2022;149:105130. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105130>
 29. Kazachinskaja E, Chepurnov A, Shcherbakov D, Kononova Y, Saroyan T, Gulyaeva M, et al. IgG Study of Blood Sera of Patients with COVID-19. *Pathogens* . 2021Nov2;10(11). <https://doi.org/10.3390/pathogens10111421>
 30. Longueira Y, Polo ML, Turk G, Laufer N. Dynamics of SARS-CoV-2-specific antibodies among COVID19 biobank donors in Argentina. *Heliyon*. 2021Oct6;7(10). <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2021.e08140>
 31. Murrell I, Forde D, Zelek W, Tyson L, Chichester L, Palmer N, et al. Temporal development and neutralising potential of antibodies against SARS-COV-2 in hospitalised COVID-19 patients: An observational cohort study. *PLOS ONE*.

- 2021;16(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245382>
32. Flehmig B, Schindler M, Ruetalo N, Businger R, Bayer M, Haage A, et al. Persisting neutralizing activity to SARS-COV-2 over months in Sera of COVID-19 patients. *Viruses*. 2020;12(12):1357. <https://doi.org/10.3390/v12121357>
 33. Harrington WE, Trakhimets O, Andrade DV, Dambrauskas N, Raappana A, Jiang Y, et al. Rapid decline of neutralizing antibodies is associated with decay of IGM in adults recovered from mild COVID-19. *Cell Reports Medicine*. 2021;2(4):100253. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100253>
 34. Abayasingam A, Balachandran H, Agapiou D, Hammoud M, Rodrigo C, Keoshkerian E, et al. Long-term persistence of RBD+ memory B cells encoding neutralizing antibodies in SARS-COV-2 infection. *Cell Reports Medicine*. 2021;2(4):100228. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100228>
 35. Bruni M, Cecatiello V, Diaz-Basabe A, Lattanzi G, Mileti E, Monzani S, et al. Persistence of anti-SARS-cov-2 antibodies in non-hospitalized COVID-19 convalescent health care workers. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(10):3188. <https://doi.org/10.3390/jcm9103188>
 36. Scheiblauer H, Nübling CM, Wolf T, Khodamoradi Y, Bellinghausen C, Sonntagbauer M, et al. Antibody response to SARS-COV-2 for more than one year – kinetics and persistence of detection are predominantly determined by avidity progression and test design. *Journal of Clinical Virology*. 2022;146:105052. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105052>
 37. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-COV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
 38. Yaugel-Novoa M, Bourlet T, Paul S. Role of the humoral immune response during COVID-19: Guilty or not guilty? *Mucosal Immunology*. 2022; <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00569-w>
 39. Pallett SJC, Jones R, Abdulaal A, Pallett MA, Rayment M, Patel A, et al. Variability in detection of SARS-COV-2-specific antibody responses following mild infection: A prospective multicentre cross-sectional study, London, United Kingdom, 17 April to 17 July 2020. *Eurosurveillance*. 2022;27(4). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2022.27.4.2002076>

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al Prof. Dr. Otto Pritsch, tutor de la monografía. Por su gran aporte a la comunidad científica y a la Universidad de la República, habiendo desarrollado importantes avances en la lucha contra la enfermedad COVID-19 a nivel nacional.

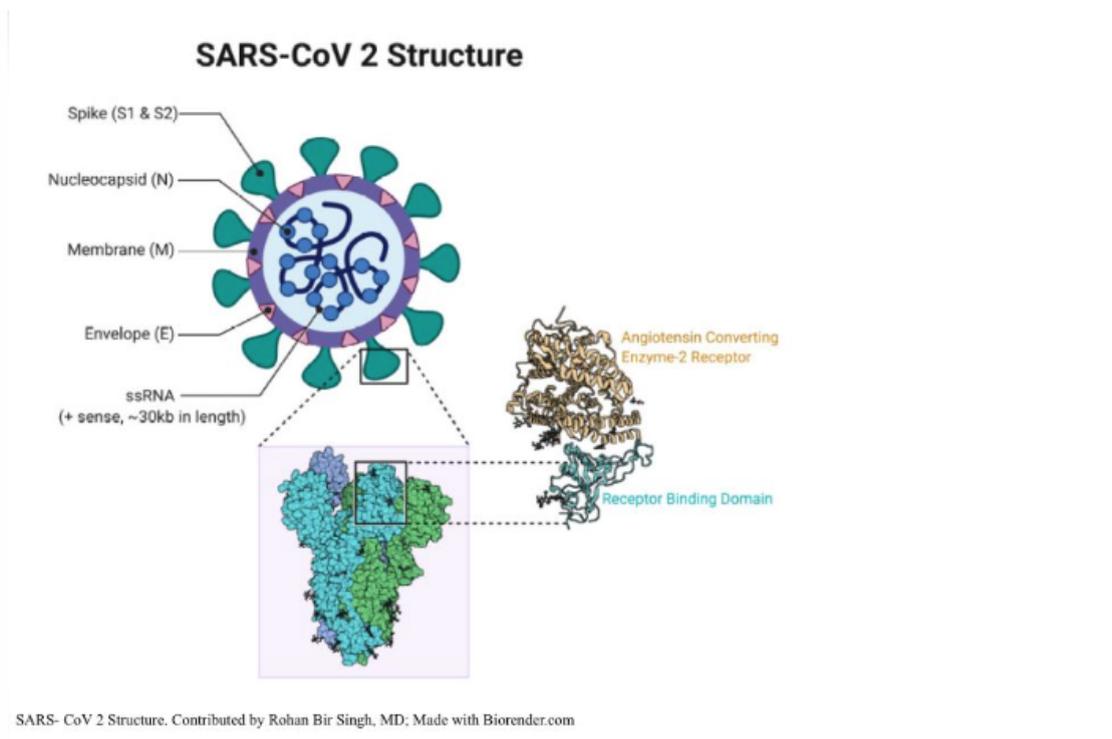


Figura 1. Estructura del virus SARS-CoV 2. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) ⁽²¹⁾

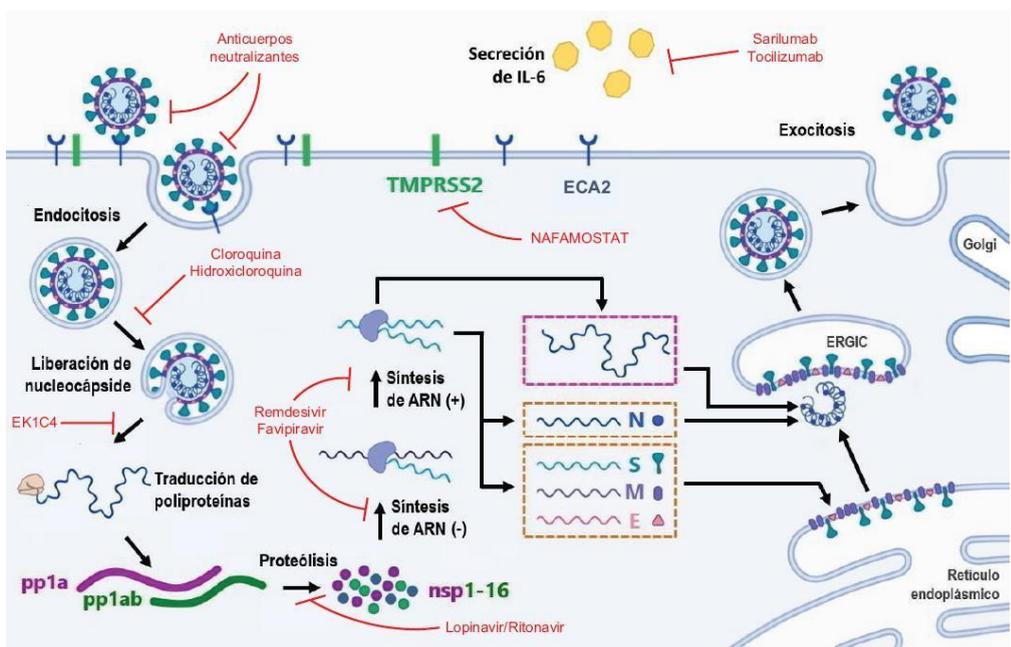
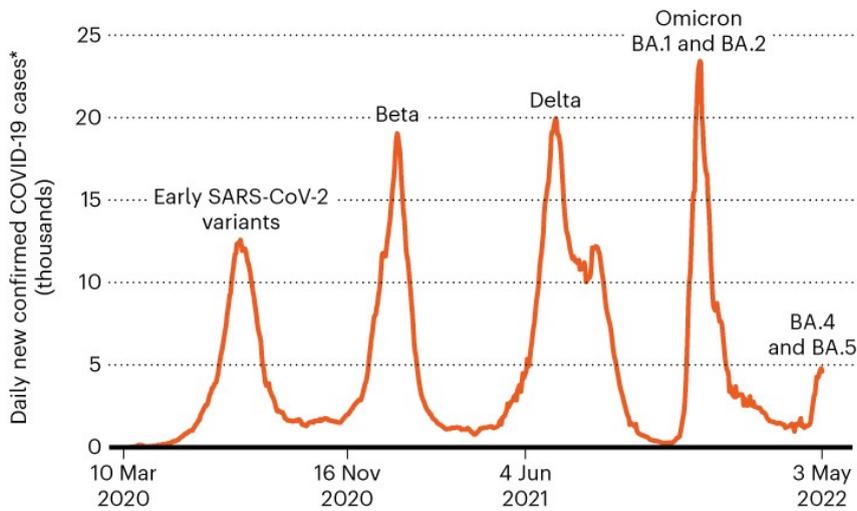


Figura 2. Mecanismo de infección y replicación del SARS-CoV-2 en las células al organismo. Extraída de “SARS-CoV-2: basic concepts, origin and treatment advances”. ⁽²²⁾

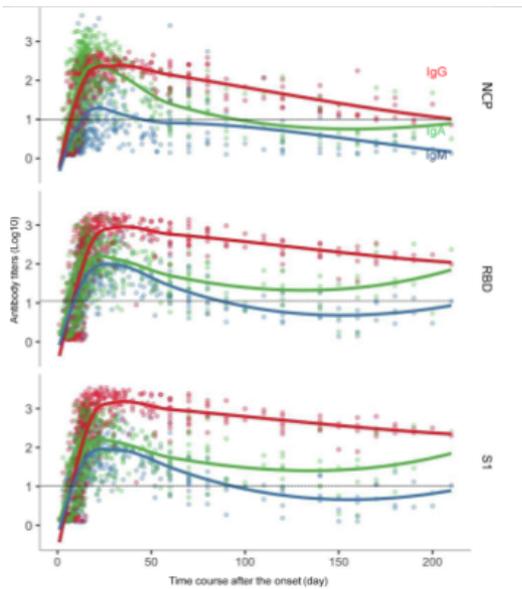
OMICRON'S NEW IDENTITIES

Cases of COVID-19 are rising again in South Africa, after the emergence of Omicron variants called BA.4 and BA.5.



BA.4 and BA.5 spread faster than previous Omicron variants and are accounting for a growing proportion of COVID-19 cases in South Africa.

Figura 3. Esquema ilustrativo de aparición de variantes de SARS-CoV-2 en Sudáfrica, correlacionando el tiempo y la cantidad de individuos infectados. Extraída del Dto. de Epidemiología del Hosp. José Ramón Vidal. Corrientes. ²³



Tomado de: Response kinetics of different classes of antibodies to SARS-CoV2 infection in the Japanese population: The IgA and IgG titers increased earlier than the IgM titers.

Figura 4. Cinética de aparición de anticuerpos IgG, IgM e IgA

Figura 5.(Tabla 1).Características y resultados de las muestras analizadas para la determinación de IgG anti-RBD de la proteína Spike de SARS-CoV-2.

Identificado r	Resultado	Ratio		Antecedentes COVID-19	Vacunación
		M/CO	BAU/ml		
033	Positivo	6,1	82,4	PCR+	No
036	Positivo	9,2	91,9	Sin diagnóstico previo	Si
038	Positivo	1,7	13,9	Sin diagnóstico previo	No
040	Positivo	16,5	454,8	PCR+	No
045	Positivo	7	82,4	PCR+	No
059	Positivo	2	91,9	PCR+	No
119	Negativo	0	13,9	Sin diagnóstico previo	No
134	Positivo	20,1	496,2	PCR+	No
005	Negativo	0,2	0	Sin diagnóstico previo	No
006	Negativo	0	0	Sin diagnóstico previo	No
010	Negativo	0,1	0	Sin diagnóstico previo	No
011	Negativo	0,6	13	Sin diagnóstico previo	No
022	Negativo	0	0	Sin diagnóstico previo	No
028	Negativo	0,1	0	Sin diagnóstico previo	No
039	Negativo	0,2	0	Sin diagnóstico previo	No
050	Negativo	0,2	13	Sin diagnóstico previo	No

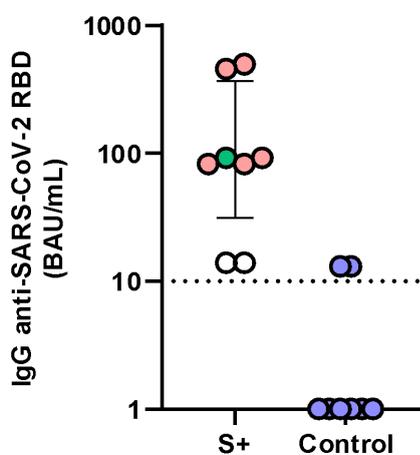


Figura 6. Determinación cuantitativa de la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD de la proteína Spike de SARS-CoV-2 en muestras de suero obtenidas del estudio "Análisis evolutivo de la

seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo” que resultaron positivas en el análisis inicial (S+) o negativas (control). Los resultados se expresan en BAU/ml. Los puntos coloreados en rojo representan muestras de individuos con diagnóstico previo por PCR de infección por SARS-CoV-2, en verde vacunados, en blanco sin diagnóstico previo, y en azul muestras seronegativas sin diagnóstico previo.

[Anexo 1]



Institut Pasteur
de Montevideo



ATGen



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

COVID-19 IgG QUANT ELISA

COVID-19 IgG QUANT ELISA es una prueba de ELISA para la detección cuali y cuantitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra el virus SARS-CoV-2 (2019-nCoV) en muestras de suero o plasma humano.

Para diagnóstico *in vitro*

9545 - COVID-19 IgG QUANT ELISA

I) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico COVID-19 IgG QUANT ELISA, es una prueba para la detección cuali/cuantitativa de anticuerpos dirigidos contra el virus SARS-CoV-2 en muestras clínicas de suero o plasma. Los anticuerpos del tipo IgG contra el virus SARS-CoV-2 son detectables generalmente a partir de los 10 a 20 días luego de la aparición de los síntomas de la infección. Los resultados positivos son indicativos de infección activa o previa con SARS-CoV-2. Los resultados negativos de esta prueba no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

A su vez, la serología puede ser útil para la realización de estudios epidemiológicos, para determinar en forma cuali/cuantitativa la respuesta de anticuerpos tras la vacunación con vacunas basadas en S1/RBD o virus inactivado, así como para la titulación de plasma para su posterior uso en el tratamiento de pacientes con COVID-19.

El kit se puede utilizar para determinar presencia o ausencia de anticuerpos frente a SARS-CoV-2, ensayo cualitativo, o para cuantificar dichos anticuerpos, ensayo cuantitativo.

II) INTRODUCCIÓN

Inicialmente se produjo un brote de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China que fue informado a la OMS el 31 de diciembre de 2019. Las autoridades chinas identificaron un nuevo coronavirus (denominado 2019-nCoV, actualmente SARS-CoV-2) como el agente causal de la enfermedad. La alta tasa de contagio resultó en la rápida expansión del virus y en varios millones de seres humanos con infección confirmada en todo el mundo. Se han reportado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muerte.

El estudio serológico cuantitativo puede ser de utilidad para evaluar la respuesta inmune tanto a la infección viral por SARS-CoV-2 como a la vacunación, así como para la titulación de plasma para su posterior uso en el tratamiento de pacientes con COVID-19.

Todos los usuarios y analistas que utilicen este kit, deben ser capacitados por un asesor técnico competente antes de utilizarlo e interpretar los resultados.

III) PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

El kit de diagnóstico COVID-19 IgG QUANT ELISA, es una prueba para la detección cuali/cuantitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra el virus SARS-CoV-2. Se realiza en placas cuyos pocillos son sensibilizados con el fragmento RBD (Receptor Binding Domain) de la proteína Spike del SARS-CoV-2 del aislado original 2019-nCoV WHU01, expresado en células de *Drosophila*. Si las muestras analizadas contienen anticuerpos específicos, estos formarán un complejo estable con el antígeno que recubre los pocillos. El material unido de forma no específica será eliminado por medio del lavado. Durante la incubación con el conjugado, los anticuerpos marcados con peroxidasa, se unirán al complejo formado. Finalmente, en la etapa de incubación con el sustrato cromogénico, la peroxidasa unida al complejo producirá una coloración, que permitirá detectar las muestras reactivas. La reacción enzimática será detenida por la adición de ácido sulfúrico, midiéndose posteriormente la intensidad de color con un lector colorimétrico para placas de ELISA.

IV) COMPONENTES

MICROPLACA 96 DET: Microplaca de 12 x 6 tiras recubiertas con antígeno, dentro de un embalaje herméticamente cerrado, que contiene un desecante en su interior.

DILUYENTE DE MUESTRAS: Frasco conteniendo el diluyente de muestras. Contiene Tween 20 y aditivos. Color verde. Listo para usar.

CONJUGADO ENZIMÁTICO: Frasco conteniendo una solución de conjugado Anti-IgG (cabra) marcado con peroxidasa en buffer Tris y estabilizantes. Contiene conservante. Listo para usar.

SUSTRATO: Frasco conteniendo una solución de Tetrametilbenzidina (TMB) y Peróxido de Hidrógeno. Es un reactivo muy sensible y no debe ser utilizado si presenta un aspecto turbio o color azul. Listo para usar.

SOLUCIÓN DE FRENADO: Frasco conteniendo una solución de ácido sulfúrico 2N. Listo para usar.

SOLUCIÓN DE LAVADO 25X: Frasco conteniendo una solución tampón fosfato concentrado 25 veces. Contiene Tween 20 y conservante.

CONTROL POSITIVO: Tubo conteniendo una solución de anticuerpos positivos para SARS-CoV-2. Listo para usar.

CONTROL NEGATIVO: Tubo conteniendo una solución de anticuerpos negativos a SARS-CoV-2. Listo para usar.

CALIBRADORES: 5 tubos conteniendo soluciones de anticuerpos positivos para SARS-CoV-2 de título conocido. La concentración de anticuerpos de los calibradores está referida al primer estándar internacional de la OMS de anticuerpos humanos anti-SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/136) y se expresa como BAU/ml (binding antibody units/ml).

BOLSA AUTOSELLANTE: 1 unidad

INSTRUCCIONES DE USO: 1 unidad

IDW83 ver. 2

Página 1

V) MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Micropipetas mono y multicanal
- Funtorios descartables para micropipetas
- Agua destilada o desionizada
- Sistema de lavado automático de microplacas (opcional)
- Lectur de microplacas con filtro para 450 nm y filtro de referencia (620 o 630 nm) (recomendado)
- Estufa con temperatura regulable de 37°C

VI) PRECAUCIONES DE USO Y SEGURIDAD

- Utilizar solamente para diagnóstico "in vitro"
- Los sueros humanos utilizados como controles mostraron resultados negativos para Chagas, SIDA, HIV, HBV y HCV. De todas formas se recomienda manipularlos con las precauciones para muestras potencialmente infecciosas. Ningún método conocido actualmente garantiza la ausencia de agentes infecciosos en derivados sanguíneos.
- Todos los reactivos y componentes deben estar a temperatura ambiente en el momento de ser usados y deben ser refrigerados entre 2 y 8°C inmediatamente después de su uso.
- No abra el sobre que contiene la placa hasta que esta no haya alcanzado la temperatura ambiente. Guarde las liras no utilizadas junto con el desecante, dentro de la bolsa plástica provista para tales efectos. Asegúrese de que la bolsa quede bien cerrada.
- Los recipientes utilizados para la preparación de los reactivos deben estar limpios y libres de detergentes o cloro.
- Use punteros nuevos para cada muestra y reactivo.
- Evite tocar las paredes del pocillo con el puntiero de la micropipeta.
- No pipeteo directamente del frasco original, coloque en otro recipiente el volumen que se va a utilizar.
- No devuelva restos de reactivos no utilizados a los frascos originales.
- No mezcle reactivos provenientes de diferentes liras ya que cada reactivo es ajustado a cada lote.
- Siempre considere que la reproducción de resultados depende de la precisión del pipeteado, de la exactitud de los tiempos y temperaturas de incubación, y del correcto lavado de los pocillos.
- No utilice objetos metálicos que puedan entrar en contacto con las soluciones.
- No utilice muestras o reactivos contaminados porque pueden alterar los resultados.
- Use guantes cuando manipule muestras y reactivos.
- Limpie y desinfecte cualquier derrame de muestras o reactivos utilizando algún desinfectante tal como hipoclorito de sodio al 0.5% o etanol al 70%.
- Evite el contacto de la solución de frenado con piel y mucosas. Si este u otro reactivo entra en contacto con piel o mucosas, lave el área afectada con abundante agua.
- Elimine todo el material contaminado en recipientes adecuados para desechos biológicos. Éstos pueden ser descontaminados en autoclave a 121°C por una hora o tratados con hipoclorito de sodio por dos horas.
- Los restos de muestras, controles y reactivos utilizados deben ser tratados con hipoclorito de sodio al 0.5% por dos horas antes de ser eliminados.
- Durante la preparación de muestras, el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio es esencial para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.

VII) CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

- Para su correcto almacenamiento deben seguirse las indicaciones correspondientes a cada componente del Kit en su respectiva etiqueta, respetando la fecha de caducidad indicada.
- Se recomienda almacenar los componentes entre 2 y 8°C.

- Proteger los componentes de la luz.

VIII) TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- COVID-19 IgG QUANTI ELISA puede ser utilizado con muestras de suero o plasma humano.
- Los anticongulantes presentes en las muestras como EDTA, heparina o citrato, no afectan los resultados del ensayo.
- Las muestras que contienen precipitados o coágulos deben centrifugarse a 2500 rpm por 10 minutos antes del análisis. Advertencia: no utilizar muestras hiperlipémicas con contaminación microbiana o hemolizadas ya que pueden alterar los resultados.
- Las muestras pueden ser conservadas entre 2 y 8°C hasta una semana antes de ser analizadas. Para períodos prolongados congelarlas a 20°C o temperaturas más bajas. No someta las muestras a ciclos repetitivos de congelamiento-descongelamiento, ya que esto afecta su estabilidad y puede alterar los resultados. Advertencia: no congele las muestras en congeladores con deshielo automático. Si utiliza muestras congeladas estas deberán ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

IX) PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo espere que los reactivos alcancen temperatura ambiente.
2. Diluir la solución de lavado que se presenta concentrada 25 veces (25x) con agua destilada. Por ejemplo, para preparar 500 mL, medir 20 mL de solución de lavado y adicionarle 480 mL de agua destilada. Una vez preparada la solución, ésta es estable por una semana a temperatura ambiente.
3. Siembra de muestras. Proceder de acuerdo al tipo de ensayo que desee realizar.

ENSAYO CUALITATIVO

Coloque en el soporte los pocillos correspondientes al número de muestras a analizar. Incluir 2 pocillos para el blanco, 2 pocillos para el control positivo (CP) y 1 para el control negativo (CN).

Los controles se encuentran pre-diluidos y se agregan 100 µl en los pocillos correspondientes, sin el agregado de diluyente de muestras. En los pocillos donde se van a sembrar las muestras y en el blanco, colocar 100 µl de diluyente de muestras y luego sembrar 10 µl de muestra donde corresponda. Mezclar las muestras varias veces con la pipeta al sembrar. Siempre utilice puntas diferentes para cada muestra y controles.

Sembrar de acuerdo al siguiente esquema:

	Muestra	Control Positivo	Control Negativo	Diluyente muestra
Blanco	-	-	-	100 µl
Control	-	100 µl	-	-
Muestra	10 µl	-	100 µl	-

ENSAYO CUANTITATIVO

Pre-diluir las muestras 1/100 en diluyente de muestra (10 µl/1.000 µl), homogeneizar. Sembrar 100 µl de blanco, calibradores y muestras pre-diluidas, según el siguiente esquema. Se recomienda

sembrar los calibradores por duplicado, para obtener mejores resultados.

	Muestra (1/100)	Calibrador	Diluyente muestra
Blanco	-	-	100 µl
Cal 1 (10 BALUM)	-	100 µl	-
Cal 2 (100 BALUM)	-	100 µl	-
Cal 3 (1000 BALUM)	-	100 µl	-
Cal 4 (200 BALUM)	-	100 µl	-
Cal 5 (4000 BALUM)	-	100 µl	-
Muestra	100 µl	-	-

4. Agite la placa durante 5-10 segundos previo a la incubación.
5. Sellar la placa con el sello autoadhesivo proporcionado con el kit para impedir la evaporación de los reactivos. Incubar por 30 minutos a 37°C.
6. Lavar la placa con la solución de lavado diluida (1x) con aproximadamente 350 µl por pocillo. Dejar la solución de lavado aproximadamente 5 seg. cada vez. Eliminar la solución después de cada lavado. Se recomienda lavar 5 veces con equipo de lavado automático o lavado manual.

Protocolo recomendado para lavado automático de liras:

- Realice 5 ciclos de lavado dispensando 350 µl de la solución de lavado diluida. Asegúrese que:
 - la solución de lavado llene el pocillo.
 - la solución de lavado no se derrame del pocillo.
 - no quede líquido remanente en el pocillo al finalizar los lavados.
- Nota: Mantenga siempre el equipamiento limpio enjuagando con abundante agua destilada al final de cada jornada de trabajo. Realice un mantenimiento periódico de acuerdo a las instrucciones del proveedor. SIEMPRE VERIFIQUE QUE EL EQUIPO NO TOQUE EL FONDO DE LOS POCILLOS YA QUE SE PUEDE AFECTAR LA REACCIÓN.

7. Después del último lavado colocar la placa invertida sobre un papel absorbente y golpearla suavemente sobre dicha superficie. No permitir que la placa se seque.
8. Tomar solamente el volumen de conjugado que va a ser utilizado y disponer en un recipiente limpio. Adicionar 100 µl de conjugado enzimático en todos los pocillos.
9. Sellar la placa de la misma forma que en la incubación anterior e incubar durante 30 minutos a 37°C.
10. Lavar la placa con la solución de lavado de la misma manera que en los pasos 7 y 8.
11. Revelado: adicionar 100 µl de sustrato a cada pocillo.
12. Incubar la placa exactamente por 20 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz.
13. Interrumpir la reacción agregando a todos los pocillos 50 µl de solución de frenado.
14. Medir densidad óptica a 450nm o biométrica a 450-620 nm.

X) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Leer la placa en el tiempo más breve posible. Advertencia: lecturas posteriores a los 30 minutos no son confiables. Corregir todos los valores restando el promedio de los blancos de reacción.

CUALITATIVO

Control de Calidad

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Promedio de los blancos: absorbancia menor a 0.1. En caso de que una de las réplicas sea mayor a 0.1, se debe descartar dicha réplica.
2. Control negativo: absorbancia menor que 0.1 luego de restar el blanco.
3. Promedio del Control Positivo: absorbancia igual o mayor que 0.6 luego de restar el blanco.

Resultados

Promediar los valores obtenidos para el Control Positivo y restar el promedio de los Blancos. Calcular el valor umbral o cutoff (CO) de la siguiente manera:

$$CO = (CP \text{ corregida}) \times 0,25$$

Siendo CP corregida: promedio DO Control Positivo - promedio DO Blanco.

El valor umbral o CO es utilizado para interpretar los resultados. Dividir la absorbancia de la muestra (M) por el valor de CO, es decir M/CO. Los resultados se interpretan de acuerdo a la siguiente tabla:

Resultado	Estatus
M/CO ≥ 1,1	Positivo
M/CO < 0,9	Negativo
0,9 ≤ M/CO < 1,1	Indeterminado

- Una reacción positiva indica la presencia de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2.
- Una reacción negativa indica que la muestra no tiene niveles detectables de anticuerpos anti-SARS-CoV-2.
- Si el resultado de la muestra es dudoso, repetir el ensayo por duplicado. Si la lectura persiste en esta zona considere como una muestra positiva.
- Una prueba de anticuerpos (suero de sangre) no permite saber si existe infección con SARS-CoV-2 en curso.

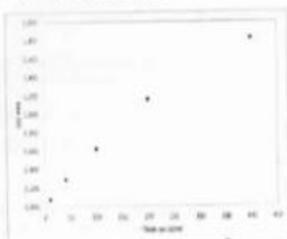
CUANTITATIVO

Leer la placa en el tiempo más breve posible. Advertencia: lecturas posteriores a los 30 minutos no son confiables. Corregir todos los valores restando el correspondiente al blanco.

Graficar los valores obtenidos contra sus respectivas concentraciones (lineal/lineal) y obtener la curva estándar que mejor se ajuste para determinar el título de anticuerpos de cada una de las muestras procesadas por interpolación. Para aquellas muestras que se encuentren por encima del rango dinámico, se recomienda realizar una nueva dilución 1/10 a partir de la dilución 1/100 previa para definir un valor exacto. En dicho caso se debe multiplicar el resultado obtenido por un factor de 10, para obtener el valor de BALUMs. Alternativamente se podrá expresar como valor superior al Calibrador de mayor título suministrado en el presente reactivo.

El límite de cuantificación del ensayo es de 10 BALUMs, los valores que se encuentren por debajo, deben informarse como no cuantificables. En caso que se desee conocer el estatus de las muestras que se encuentran por debajo del límite de cuantificación, se recomienda realizar el estudio cualitativo. La siguiente figura representa un ejemplo de curva estándar. No

utilizar estos datos para calcular la concentración de anticuerpos en muestras.



NOTA. En este ensayo se utiliza una curva estándar titulada según el primer estándar internacional de la OMS de anticuerpos humanos anti-SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/136) y se expresa como BAU/ml (binding antibody units/ml). Se debe tener en consideración que el título de anticuerpos obtenido mediante diferentes métodos puede no ser comparable.

XI) CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

El kit COVID-19 IgG QUANT ELISA, ha sido evaluado utilizando plasmas y sueros de distintos orígenes y ha sido comparado con otros ensayos comerciales.

Estudio interno de Especificidad y Sensibilidad:
Se construyó una curva ROC con un panel de 200 muestras negativas, y un panel de 146 muestras positivas al test de PCR y a un ELISA comercial (FDA-EUA), con 4 semanas o más desde la aparición de los síntomas. Según este estudio, la sensibilidad y especificidad de la técnica fue de 100% en ambos casos.

Límites de detección y cuantificación del ensayo cuantitativo:

Reactivo: COVID-19 IgG QUANT ELISA	
Promedio	1,7 BAU/ml
Desvío Estándar	1,4 BAU/ml
Límite de Detección	6,7 BAU/ml
Límite de Cuantificación	8,7 BAU/ml
Valor Máximo	5,9 BAU/ml
Valor Mínimo	0,0 BAU/ml

Resultados obtenidos con el Panel de muestras positivas: WHO Reference Panel, First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin, NIBSC code: 20/268

First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin, NIBSC code: 20/268		
	Anti RBD IgG (BAU/ml)	COVID-19 IgG QUANT ELISA (BAU/ml)
Low 20/140	45	28
Negative 20/142	Negativo	No Cuantificable
Low S, high N 20/144	66	47
Mid 20/148	205	200
High 20/150	817	>400

Validación del Departamento de Laboratorios del MSP:
Sensibilidad según el periodo luego del inicio de los síntomas:
- 8 a 14 días 96,97%
- Más de 14 días 100%

XII) ESQUEMA DEL ENSAYO

QUALITATIVO

Pasos	Volumen	Incubación
Incubación de muestras	10 µl de muestra + 100 µl de diluyente (cualitativo) 100 µl de controles CP y CN	30 min a 37°C
Lavados	350 µl (x 5 ciclos)	-
Conjugado enzimático	100 µl	30 min a 37°C
Lavados	350 µl (x 5 ciclos)	-
Sustrato	100 µl	20 min a TA.
Frenado	50 µl	-
Lectura DO 450 – 620 nm		

CUANTITATIVO

Pasos	Volumen	Incubación
Incubación de muestras	100 µl de muestra diluida 1/100 100 µl de calibradores	30 min a 37°C
Lavados	350 µl (x 5 ciclos)	-
Conjugado enzimático	100 µl	30 min a 37°C
Lavados	350 µl (x 5 ciclos)	-
Sustrato	100 µl	20 min a TA.
Frenado	50 µl	-
Lectura DO 450 – 620 nm		

XIII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing
Page last reviewed: Mar. 17, 2021. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases.

XIV) SIMBOLOGÍA UTILIZADA EN EL KIT



ATCien S.R.L., Av. Italia 6201, Parque Tecnológico LATU, Edificio Los Tilos, Montevideo Uruguay.
Tel: (+598)26006001 D.T. QF. Andrés Abín

[Anexo 2]

Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo

Introducción

Los coronavirus (CoVs) pertenecen a la familia Coronaviridae, dentro del orden Nidovirales. Infectan varias especies de vertebrados incluyendo humanos, aves, murciélagos, ratones, entre otros. En el último medio siglo han sido descritos 7 coronavirus capaces de infectar al ser humano. Cuatro de ellos son responsables del 15 al 30% de las infecciones respiratorias altas leves. Las otras tres cepas sin embargo, presentan una patogenicidad diferente, lo que conduce

a una mortalidad más elevada. Ellos son: el Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), el Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) y el Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Los CoVs son virus envueltos con un genoma no segmentado de ARN de hebra simple y polaridad positiva, el cual codifica para cuatro proteínas estructurales: la proteína Spike (proteína S o de Superficie), la proteína E (de Envoltura), la proteína M (de Membrana), la proteína N (de Nucleocápside) (Fung, 2018). Los CoVs son capaces de saltar las barreras interespecies (Hulswit, 2016), como habría sucedido en la presente pandemia de COVID-19 (COronaVirus Disease 2019), causada por el SARS-CoV-2 que se sugiere pasó de su huésped natural animal al ser humano, mostrando una alta tasa de diseminación, siendo declarada como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el pasado 11 de marzo. Al día de hoy nos acercamos a los 100 millones de casos a nivel mundial, habiendo sobrepasado las 2 millones de muertes debido a la COVID-19 (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). En nuestro país se registraron los primeros casos de COVID-19 el pasado 13 de marzo. Desde esa fecha y hasta el 17 de enero de 2021 se han realizado 753.084 tests y se han registrado 32.378 casos positivos de Coronavirus en todo el territorio nacional. Los pacientes COVID-19+ presentan una clínica variada que puede llegar a síndromes respiratorios graves con requerimiento de internación en Unidades de Cuidados Intensivos, poniendo a prueba los sistemas de salud a nivel mundial (Yang, 2020). Pero también es importante la proporción de pacientes asintomáticos, capaces de ser difusores del virus. Entre la signo-sintomatología más frecuente de la infección se encuentra: la fiebre, la tos no productiva, la disnea, las mialgias y la fatiga. El período de incubación del SARS-CoV-2 es de aproximadamente cinco días (pudiendo variar desde 1 a 14 días), estimándose un R0 de alrededor de 3 (Jin, 2020). Al día de hoy no existe un tratamiento específico para la infección por SARS CoV-2, siendo las medidas preventivas de salud pública (distanciamiento físico, higiene de manos, uso de tapabocas, etc.) las que han mostrado cierta efectividad en el control de la diseminación del virus. Sumado a estas, una buena capacidad de testeo diagnóstico es otro factor favorecedor de lograr buenos resultados en el manejo de la pandemia. Desde el comienzo, en el Institut Pasteur de Montevideo (IPMon) se implementaron distintas actividades de investigación y desarrollo relacionadas a la infección por SARS-CoV-2, en conjunto con otras instituciones académicas y empresas biotecnológicas. Entre otros logros, se consiguió desarrollar e implementar kits para diagnóstico molecular (por PCR) que contribuyeron a la buena capacidad de testeo, así como el desarrollo de test serológicos (ELISA) que permiten la detección de IgG específicas anti-SARS-CoV-2 en el suero de pacientes previamente infectados. En el caso de estos últimos, diversas instituciones de investigación de nuestro país trabajaron coordinadamente para desarrollar múltiples estrategias metodológicas

para evaluar la presencia de anticuerpos séricos frente a proteínas virales (proteína S, nucleocápside o dominios de ellas). En particular se conformó un Grupo de Trabajo Interinstitucional (GTI) que logró desarrollar un test serológico en formato ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) con alta especificidad y sensibilidad para la identificación de anticuerpos tipo IgG contra la proteína Spike del SARS-CoV-2. Este desarrollo técnico se llevó adelante con la participación de recursos humanos de la Universidad de la República (UdelaR) a través del Hospital de Clínicas, las Facultades de Medicina, Química y Ciencias, el Polo Tecnológico de Pando, así como del Institut Pasteur de Montevideo. Finalmente, un consorcio entre el Institut Pasteur de Montevideo, la Universidad de la República y la empresa ATGen, logró implementar este ensayo en formato kit, como forma de aumentar la disponibilidad y uso del mismo por los prestadores de salud de nuestro país. La utilización de un test serológico que evidencie la presencia de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 con alta sensibilidad y especificidad, es una estrategia de fundamental importancia en infecciones con alta frecuencia de casos asintomáticos. Estos inmunoensayos serológicos permiten realizar estudios epidemiológicos poblacionales al evidenciar la respuesta inmune montada por el hospedero infectado. En particular, la detección y cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 permite:

- i) Evaluar el estado de la respuesta inmune inducida por el virus a lo largo de la infección y una vez superada la etapa de convalecencia. Esto puede contribuir a identificar posibles donantes para la generación de sueros de alto título que puedan ser utilizados con fines terapéuticos (Amanat, 2020), procedimiento aprobado por la Food and Drug Administration.
- ii) Determinar cuándo aparece y de qué tipo e intensidad es la respuesta inmune humoral generada en la población frente al SARS-CoV-2, lo cual incluye a aquellos sujetos asintomáticos que estuvieron expuestos al virus. Esta información es muy valiosa para la vigilancia epidemiológica.
- iii) Identificar sujetos que hayan cursado la infección en forma inadvertida o con un cuadro clínico leve.
- iv) Evaluar la respuesta humoral en individuos luego de la administración de vacunas para prevenir el desarrollo de la COVID-19. De lo expuesto, se desprende que estos ensayos aportan información valiosa para la toma de decisiones a nivel clínico respecto a las conductas que puedan tomar los individuos en medio de la pandemia actual, y aún en caso de que ésta se transforme en una endemia. Pero también tienen una importancia desde un punto de vista epidemiológico, permitiendo la toma de decisiones en el ámbito de la salud pública.

Actualmente, el gobierno uruguayo a través del Ministerio de Salud Pública, está planificando la adquisición de vacunas que se han mostrado efectivas para prevenir el desarrollo de la COVID-19. Aunque aún no se conocen fechas de comienzo de la inmunización, se plantea que la misma se inicie en el primer trimestre del presente año. Aún es incierta la información disponible respecto la proporción e importancia de las infecciones leves y/o asintomáticas que

no requieren atención médica, ni está claro el rol que personas infectadas y asintomáticas tienen en la transmisión del virus. Al momento actual, no habiendo comenzado la etapa de inmunización con vacunas, la presencia de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 en el suero de un individuo implica que la persona ha sido infectada por el virus, haya sido esta infección sintomática o no. Ello, sumado al hecho de acceder en el corto plazo a una vacuna, marca la importancia de analizar la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo, el cual ha estado involucrado desde diferentes aspectos en la lucha contra la pandemia COVID-19. Por otro lado, planteamos que este estudio sea longitudinal de cohorte y se desarrolle durante los próximos dos años, como forma de ver la evolución temporal de la seroprevalencia, tanto en personas vacunadas como no vacunadas. Se analizarán los resultados considerando el comportamiento epidemiológico de la infección a nivel nacional. Para la elaboración de la presente propuesta se ha tomado como material de base el “Protocolo para estudios seroepidemiológicos poblacionales sobre la COVID-19, con estratificación por edades” de la OMS (OMS, 2020).

Objetivos específicos

- Conocer la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV2 en personas de un instituto de investigación (IPMon) que han estado relacionadas a distintas actividades relacionadas a la infección por el SARS-CoV-2 desde el momento de los primeros casos diagnosticados en nuestro país.
- Analizar la respuesta inmune humoral y la persistencia en el tiempo (cinética) de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en suero durante dos años en individuos vacunados o no vacunados en ese mismo grupo de personas.
- Evaluar el desempeño del test serológico desarrollado por el GTI en un grupo específico de individuos no diagnosticados previamente en forma sistemática para COVID-19.

Metodología y procedimientos

Diseño del estudio y población a evaluar. La presente propuesta se trata de un estudio sero-epidemiológico, longitudinal y prospectivo, que implicará la evaluación de una misma muestra de individuos. La participación en este proyecto será estrictamente voluntaria. Se incluirán personas mayores de 18 años, de ambos sexos, que desarrollen actividades en el IPMon en forma estable, independientemente de si han cursado la enfermedad previamente o hayan presentado clínica compatible con la misma. Se excluirán los individuos que no den su consentimiento informado o aquellos en los que esté contraindicada la venopunción, no generándose absolutamente ninguna consecuencia de la no participación en el estudio. Se

estima que la población de participantes en el estudio será de entre 200 y 300 personas. Los voluntarios no recibirán compensación monetaria por aceptar participar en el estudio.

Muestras biológicas. Se plantea la obtención seriada de muestras cada cuatro meses en el primer año del estudio, y cada seis meses en el segundo. Se obtendrán muestras de 5 ml de sangre venosa periférica a cada persona que acceda a participar del presente proyecto mediante venopunción en Vacutainer™ con gel y activador de la coagulación. Las muestras de sangre se extraerán por personal calificado y se procesarán en el IPMon en condiciones de asepsia y bioseguridad para el personal actuante. Una vez obtenida la muestra se dejará coagular y se centrifugará a baja velocidad, obteniéndose el suero que se alicuotará. Se procederá a su inactivación por calor a 56C por 1 h, se alicuotará y almacenarán las muestras a -20 generando “serotecas espejo” para prevenir su pérdida accidental. Al culminar el proyecto, todas las muestras serán eliminadas de acuerdo a los procedimientos de descarte de muestras biológicas instaurados en el Institut Pasteur de Montevideo. Previo a la extracción de las muestras, se le solicitará a la persona participante la firma de un consentimiento informado. Además, se le realizará un cuestionario en el que se solicitará datos demográficos, patronímicos, antecedentes clínicos personales y relacionados a COVID-19 (se adjuntan ambos documentos). Las muestras biológicas obtenidas se codificarán y los datos personales y médicos serán mantenidos en forma confidencial.

Pruebas serológicas. Los kits de ELISA a utilizar serán los desarrollados por la Universidad de la República, el Institut Pasteur de Montevideo y la empresa ATGen (“COVID-19 IgG ELISA UY 2.0”), el cual ha sido validado por el Ministerio de Salud Pública del Uruguay. Las placas de estos kits están sensibilizados con el fragmento Receptor Binding Domain (RBD) de la proteína Spike del SARS-CoV-2, permitiendo evidenciar anticuerpos de tipo IgG específicos contra RBD presentes en las muestras séricas. Mediante controles de la técnica incluidos en el kit, se calcula un valor umbral (cut-off), el cual será utilizado para interpretar los resultados. De esta manera, los resultados posibles son positivo, negativo o indeterminado (en este último caso será necesario repetir el procedimiento por duplicado). (Los ensayos serológicos se llevarán adelante por personal con experiencia en su realización, de acuerdo con la cartilla técnica que acompaña al kit (se adjunta). El listado con el número de muestra y su resultado correspondiente será enviado a los coordinadores del estudio.

Consideraciones éticas. El protocolo se registró en el Registro/Autorización de Proyectos de Investigación en Seres Humanos del Ministerio de Salud Pública (MSP) y se presentará al

comité de ética del Institut Pasteur de Montevideo. El riesgo para los participantes es mínimo y están relacionados a los de la extracción de una muestra de sangre venosa periférica. La mayor complicación posible es el desarrollo de un hematoma en el lugar de punción, situación poco frecuente, de manejo ambulatorio y de conducta expectante. Se mantendrá la confidencialidad de los participantes durante todo el estudio. Los responsables del proyecto, asignarán a cada participante un número de identificación que se utilizará para etiquetar los cuestionarios y las muestras clínicas. Para asegurar la privacidad de la información recabada, solo los responsables tendrán acceso a la tabla que relaciona el número de identificación con el participante. Los responsables comunicarán en forma individual a cada participante el resultado del estudio llevado a cabo, manteniendo la confidencialidad del mismo en todo momento. Como ya fue mencionado, la participación en el presente estudio será totalmente voluntaria, pudiendo los participantes retirarse del mismo cuando lo deseen sin esgrimir ningún tipo de justificación, no pudiendo ser penalizados de ninguna forma por tal decisión. A los participantes se les solicitará la firma de un consentimiento informado. El principal beneficio para los participantes será el conocer su nivel sérico de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2. Además, el presente estudio permitirá conocer la sero-prevalencia en el personal del IPMon previa y posteriormente al inicio del plan de vacunación a desarrollar en nuestro país, así como tener una primera aproximación del mantenimiento en el tiempo de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en un grupo seleccionado de individuos.

Financiación. Los kits de ELISA están disponibles en el IPMon, así como los recursos humanos y materiales para llevarlos adelante. Los recursos humanos y materiales para la extracción de las muestras de sangre venosa periférica serán provistos por el IPMon.

Bibliografía

Amanat, F.; Nguyen, T.; Chromikova, V. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. 2020, medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20037713>.

Fung, T, and Liu, D. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future Virol.* 2018, 13(6): 405-30.

Hulswit, R.; Haan, C. and Bosch, B. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv. Virus Res.* 2016, 96: 29-57.

Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* 2020, 12(4):372

Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

Organización Mundial de la Salud. (2020). Protocolo para estudios seroepidemiológicos poblacionales sobre la COVID-19, con estratificación por edades. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331540>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Yang, Y.; Peng, F.; Wang, R. et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J. Autoimmun.* 2020.