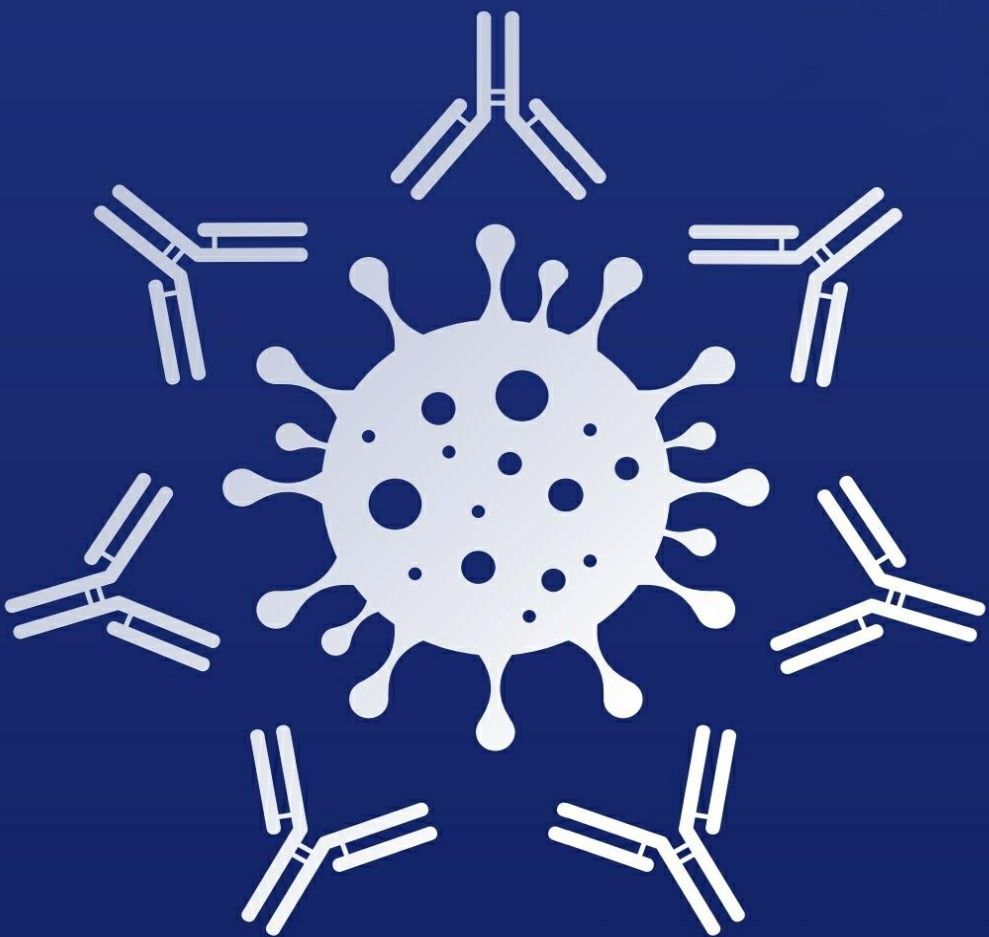




Utilidad de los *anticuerpos neutralizantes* contra el *SARS-CoV-2*

Dr Luis Figueroa Montes
Patólogo Clínico

CMP LIVE MIÉRCOLES 2 DE JUNIO MICROPROGRAMA



DR. LUIS FIGUEROA MONTES

MÉDICO PATÓLOGO CLÍNICO Y FUNDADOR
DE MEDICINA DEL LABORATORIO

**UTILIDAD CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS
NEUTRALIZANTES CONTRA EL SARS-COV-2**

Transmisión en vivo por:

Facebook 05:00 P.M.



CONSEJO NACIONAL
Gestión del Bicentenario

LUIS FIGUEROA MONTES

Antecedentes académicos

- Médico cirujano y especialista en Patología Clínica
- Magister en Gestión de los Servicios de Salud
- Investigador, escritor y conferencista

Membresías

- Asociación Americana de Química Clínica (AACC)
- Asociación Médica Peruana de Patología Clínica

Libros y artículos científicos

- Libro: Diabetes en la Medicina del Laboratorio 2020
- Artículos en revistas indexadas

Sector público (*)

- Patólogo clínico del Hospital III Suarez Angamos – Seguridad Social.
- Presidente del Comité Nacional de Patología Clínica - 2021 en la Seguridad Social.
- Miembro de la Asociación Médica Peruana de Patología Clínica

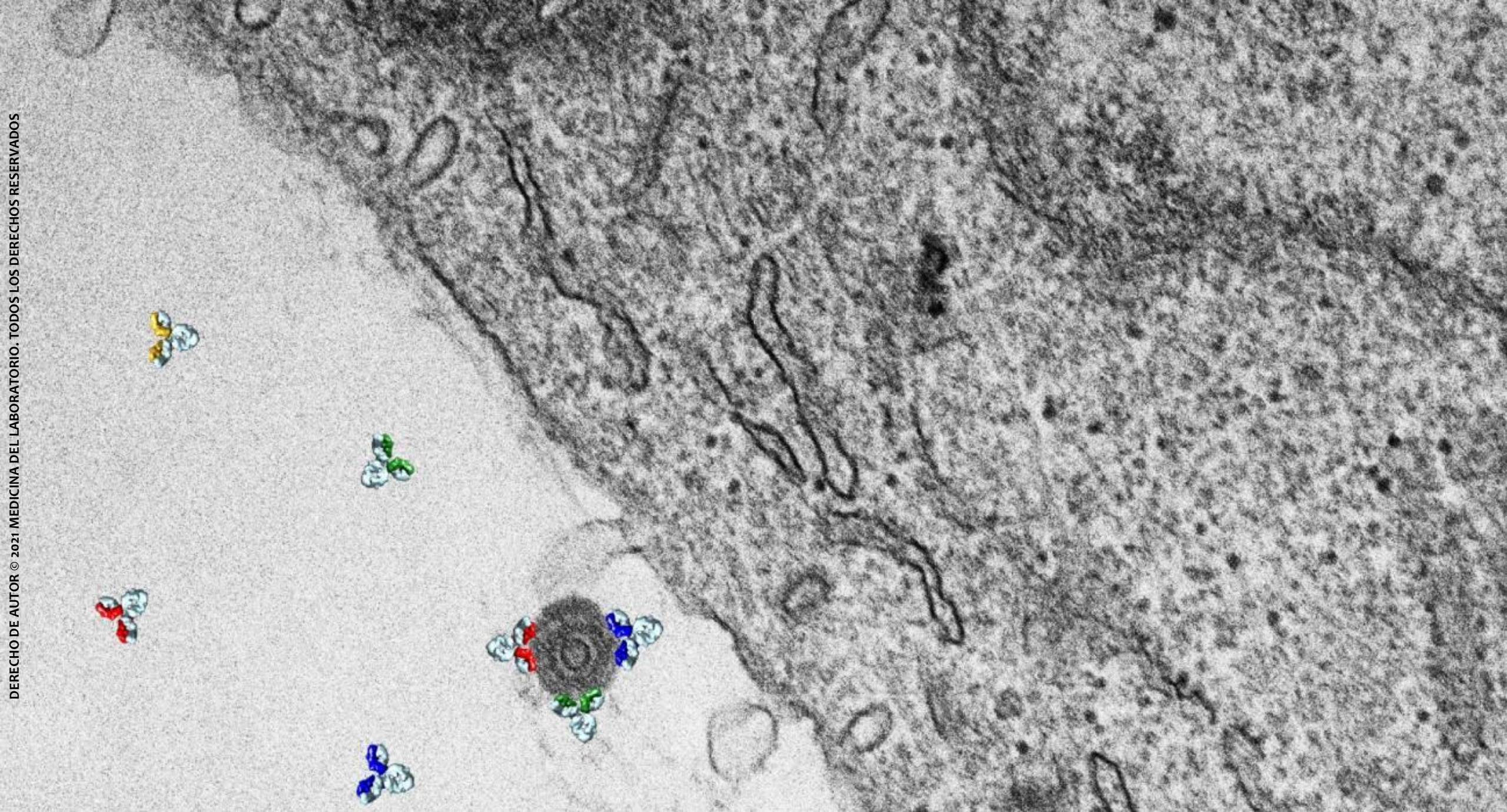
Sector privado (*)

- **Fundador de Medicina del Laboratorio**
- Director del Laboratorio ExperttaLab
- Conferencista y vocero científico en temas de dispositivos in vitro de la Cámara de Comercio de Lima y Roche – Perú.
- Asesor y consultor en temas de Medicina de Laboratorio



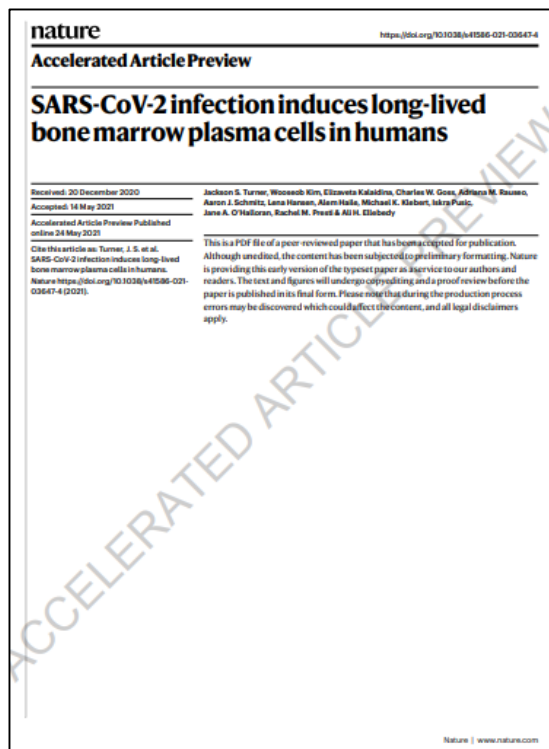
DECLARO NO TENER CONFLICTOS DE INTERÉS

** En la actualidad no tengo vínculo como accionista, proveedor o cliente comercial de dispositivos in vitro, con ninguna de las instituciones previamente citadas*





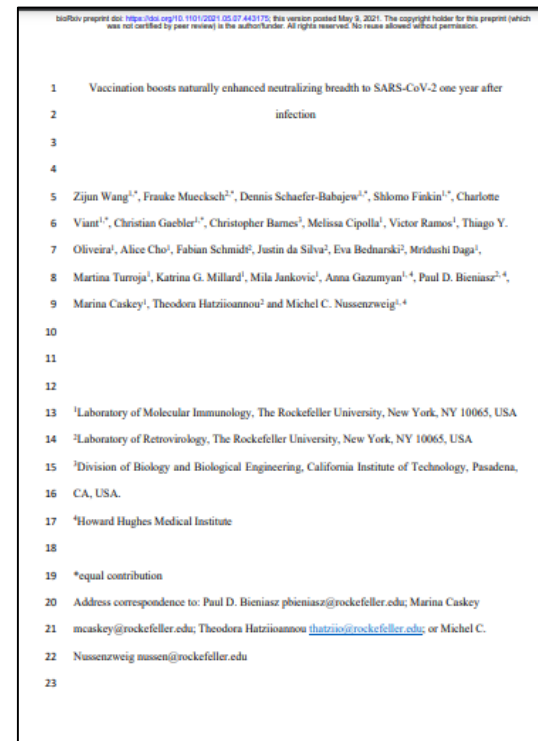
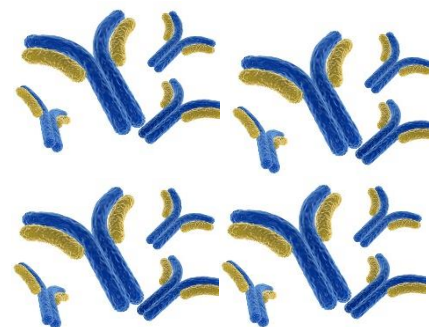
La inmunidad al coronavirus dura al menos un año, probablemente mucho más, y mejora con el tiempo, en especial después de la vacunación.



Turner, J.S., Kim, W., Kalaidina, E. et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. Nature (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03647-4>

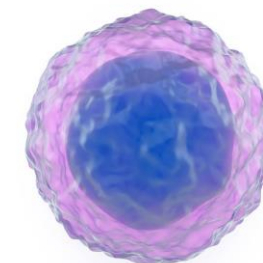
Published: 24 May 2021

Las células que conservan la memoria del virus siguen en la **médula ósea** y pueden producir anticuerpos cuando sea necesario.

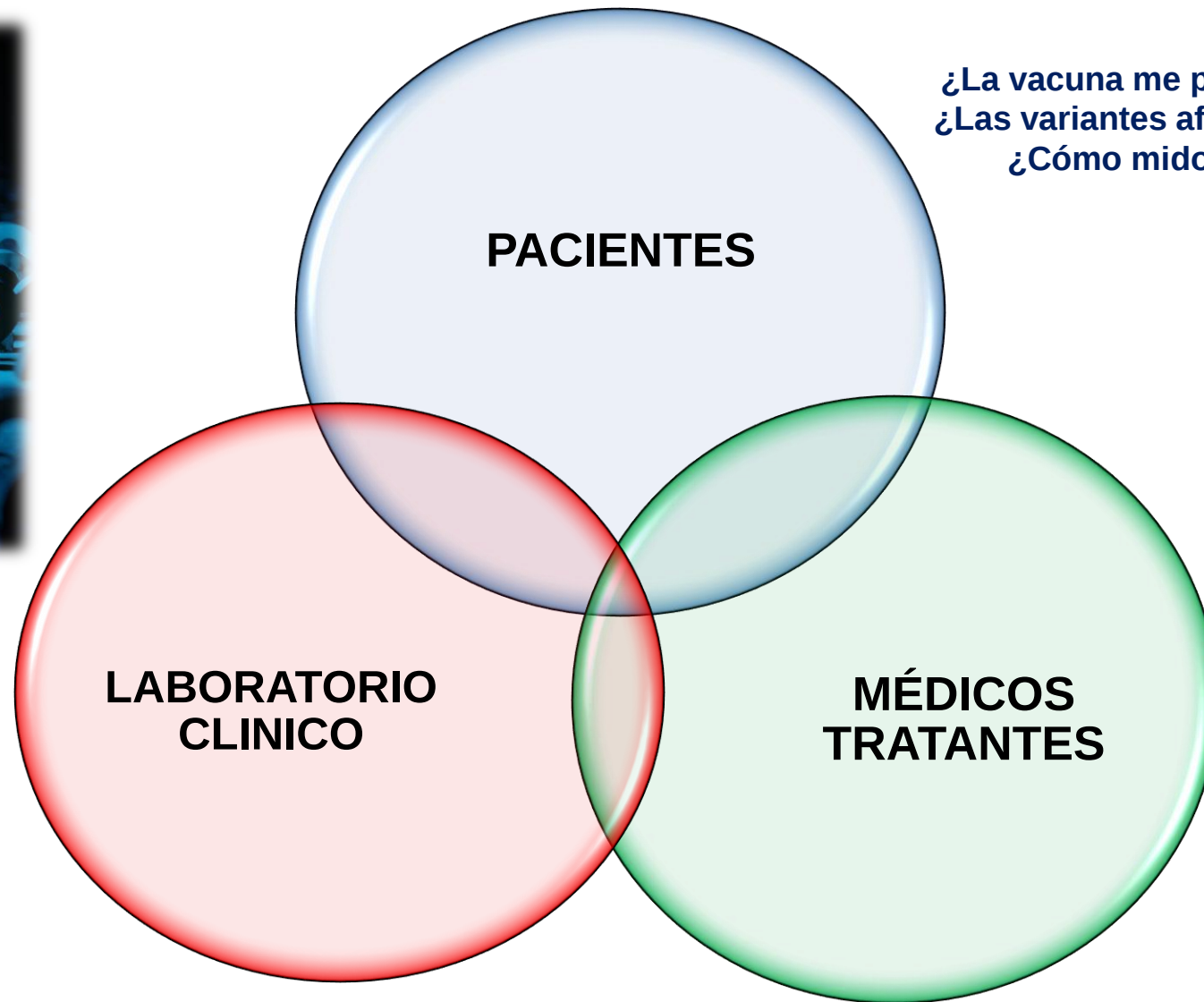


doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.07.443175>

Los linfocitos B de memoria siguen madurando y fortaleciéndose durante al menos **doce meses** después del contagio inicial.



Posted May 09, 2021



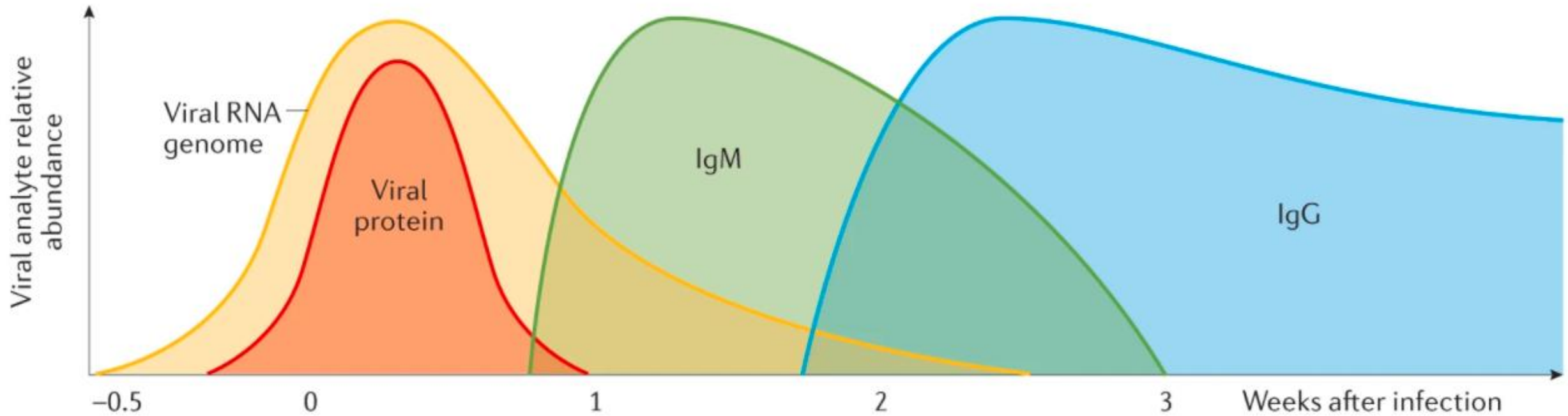
¿La vacuna me protegerá contra el coronavirus?
¿Las variantes afectan la calidad de las vacunas?
¿Cómo mido la eficacia de las vacunas?

¿La verificación analítica saldrá conforme?
¿Tendrá un desempeño clínico correcto?
¿Qué medidas de bioseguridad debo agregar?

¿Las variantes afectan las pruebas de laboratorio?
¿Cual de las pruebas evaluará la eficacia de las vacunas?
¿Qué son los anticuerpos neutralizantes?

Pruebas a gran escala durante la pandemia de COVID-19

a Viral analyte (RNA, protein and antibody) dynamics



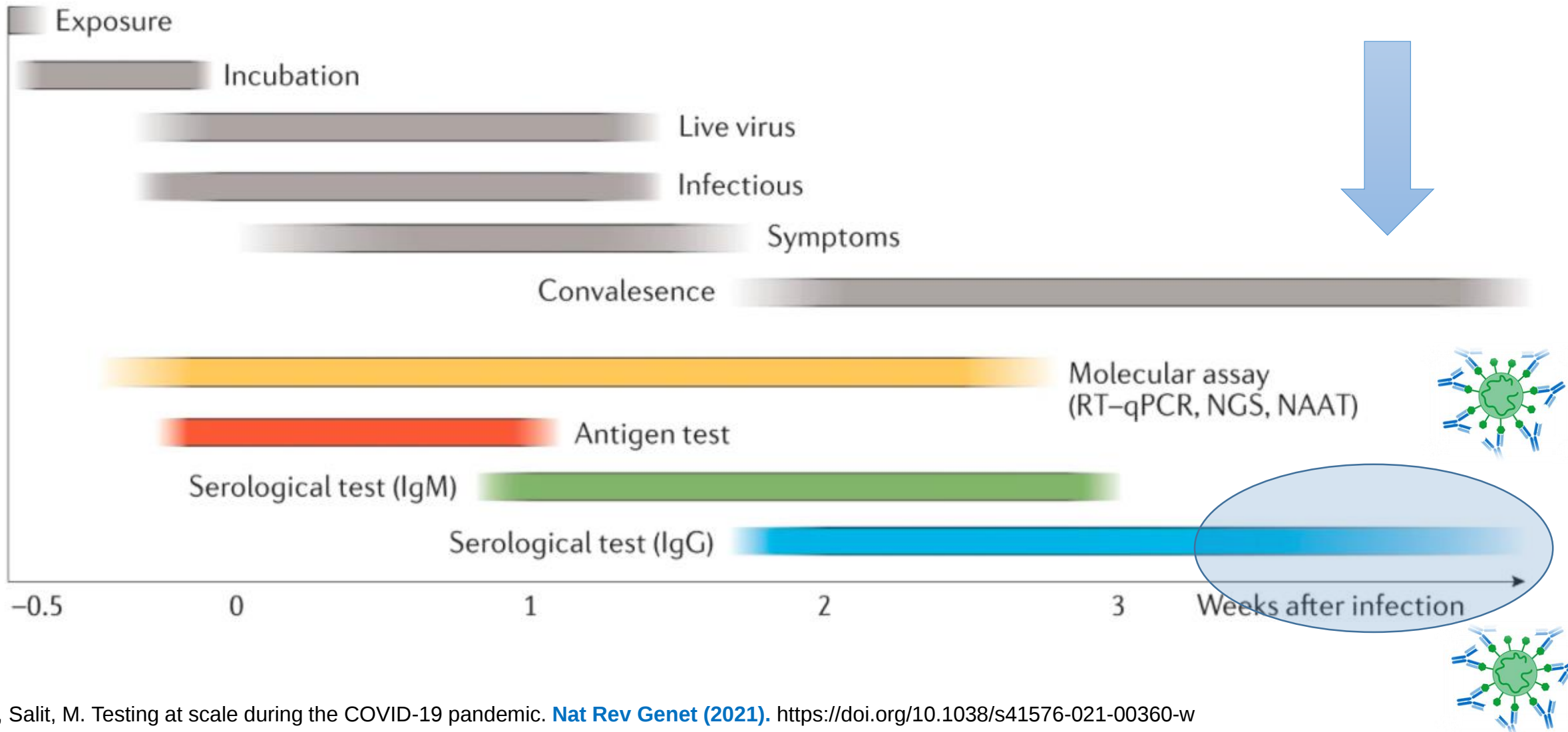
El genoma del SARS-CoV-2 aumenta rápidamente después de la infección y alcanza su punto máximo con la presentación de los síntomas (algunos asintomáticos).

Los niveles de proteínas virales, aumentan rápidamente, aunque dentro de una ventana más estrecha.

En respuesta a la infección, el cuerpo produce anticuerpos IgM e IgG, que persisten durante semanas o meses.

Pruebas a gran escala durante la pandemia de COVID-19

b Infection stage and applicable test modalities





Fecha de publicación: 19 de mayo de 2021

Actualmente, no se recomiendan las pruebas de anticuerpos para evaluar la inmunidad después de la vacunación contra COVID-19: Comunicación de seguridad de la FDA

[f Cuota](#) [Pío](#) [in LinkedIn](#) [Correo electrónico](#) [Impresión](#)

Comunicaciones de seguridad

[Comunicaciones de seguridad
2021](#)

[Comunicaciones de seguridad
2020](#)

Fecha de publicación: 19 de mayo de 2021

La Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) recuerda al público y a los proveedores de atención médica que los resultados de las pruebas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 actualmente autorizadas no deben usarse para evaluar el nivel de inmunidad o protección de una persona contra el COVID-19 en ningún momento, y especialmente después de que la persona recibió la vacuna COVID-19.

Contenido actual a:
19/05/2021

Producto (s) regulado
Dispositivos médicos



Las pruebas de anticuerpos del SARS-CoV-2 autorizadas actualmente no están validadas para evaluar la inmunidad específica o la protección contra la infección del SARS-CoV-2.

EUA de diagnóstico in vitro: serología y otras pruebas de respuesta inmunitaria adaptativa para el SARS-CoV-2

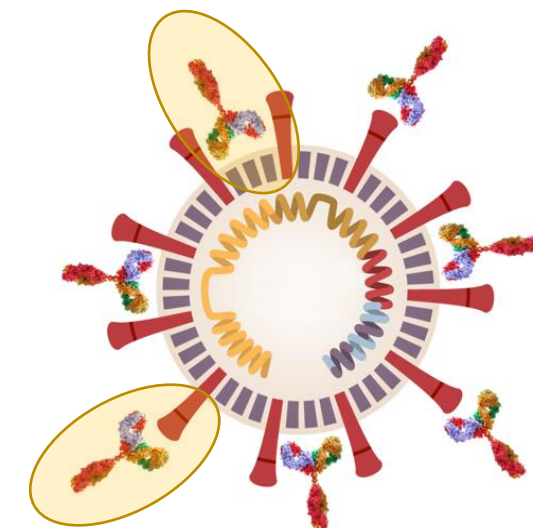
[USQ](#)

+	05/04/2020	EUROIMMUN US Inc.	ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) 05/04/2020	IgG, ELISA	H	HCP , destinatarios , instrucciones de uso
+	30/04/2020	Wadsworth Center, Departamento de Salud del Estado de Nueva York	Inmunoensayo de microesferas SARS-CoV de Nueva York para la detección de anticuerpos 30/04/2020	Anticuerpo total, FMIA	H	HCP , destinatarios , resumen de EUA
+	15/04/2020	Laboratorio Mount Sinai	Prueba de anticuerpos IgG ELISA COVID- 19 15/04/2020	IgG, ELISA	H	HCP , Pacientes , Resumen EUA

Mostrando 76 a 80 de 80 entradas

Anterior 1 2 3 **4** próximo

76





COVID-19



Tu salud

Vacunas

Casos y datos

Trabajo y escuela

Trabajadores de la salud

Departamentos de salud

Ciencias

Más

Fecha de publicación: 17 de marzo de 2021

Directrices provisionales para las pruebas de anticuerpos COVID-19

Directrices provisionales para las pruebas de anticuerpos contra COVID-19 en entornos clínicos y de salud pública

Actualizado el 17 de marzo de 2021

[Impresión](#)

- Las pruebas serológicas pueden variar en sus características de desempeño individuales; pruebas que han recibido [autorización de uso de emergencia \(EUA\)](#) [↗](#) debe utilizarse con fines clínicos y de salud pública.
- ~~Actualmente, no se recomienda la prueba de anticuerpos para evaluar la inmunidad a COVID-19 después de la vacunación contra COVID-19 o para evaluar la necesidad de vacunación en una persona no vacunada. Dado que las vacunas inducen anticuerpos contra dianas proteicas virales específicas, los resultados de las pruebas serológicas posteriores a la vacunación serán negativos en personas sin antecedentes de infección natural previa si la prueba utilizada no detecta los anticuerpos inducidos por la vacuna.~~

76



Pruebas disponibles actualmente para evaluar al SARS-CoV-2

INFECCIÓN

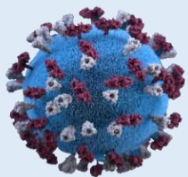
PRUEBAS DIRECTAS

Detección viral



PCR

(Pruebas de detección de ácidos nucleicos)



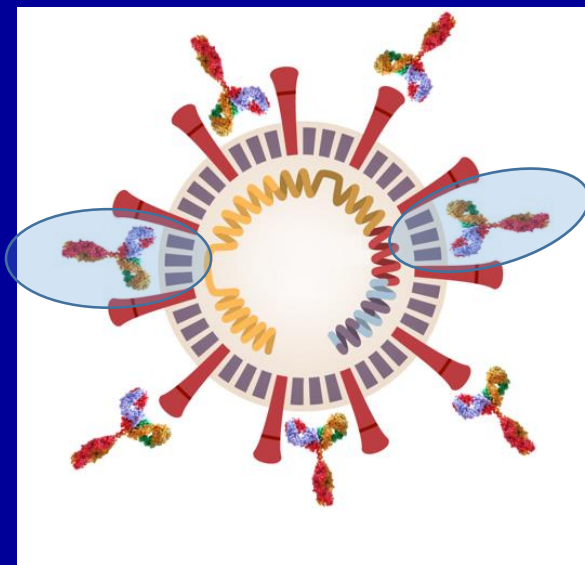
Antigénica

Infección aguda

POST INFECCIÓN

PRUEBAS INDIRECTAS

Anticuerpos de unión

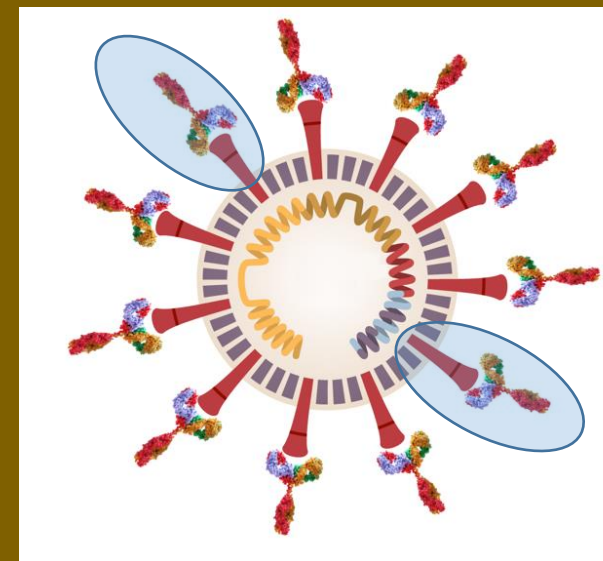


Infección previa



Anticuerpos dirigidos a **CUALQUIER PARTE** DEL VIRUS

Anticuerpos neutralizantes



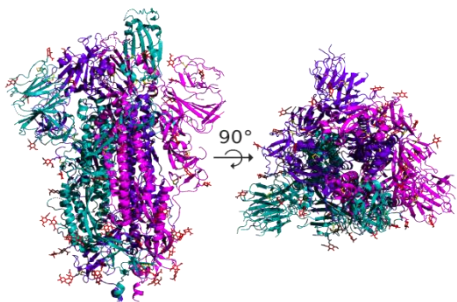
Impacto de las vacunas



Anticuerpos dirigidos **SOLO A LA PROTEÍNA S** DEL VIRUS

1

**Respuesta
inmunitaria
Proteína de la
espiga (S)**



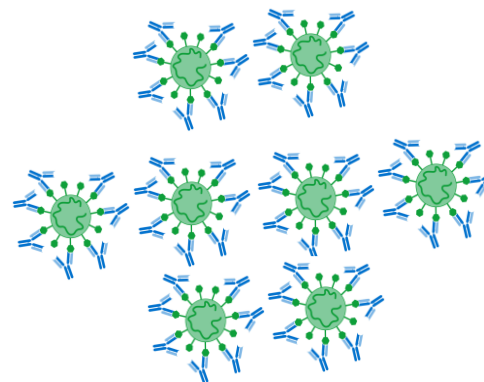
2

**Vacunas
Variantes**



3

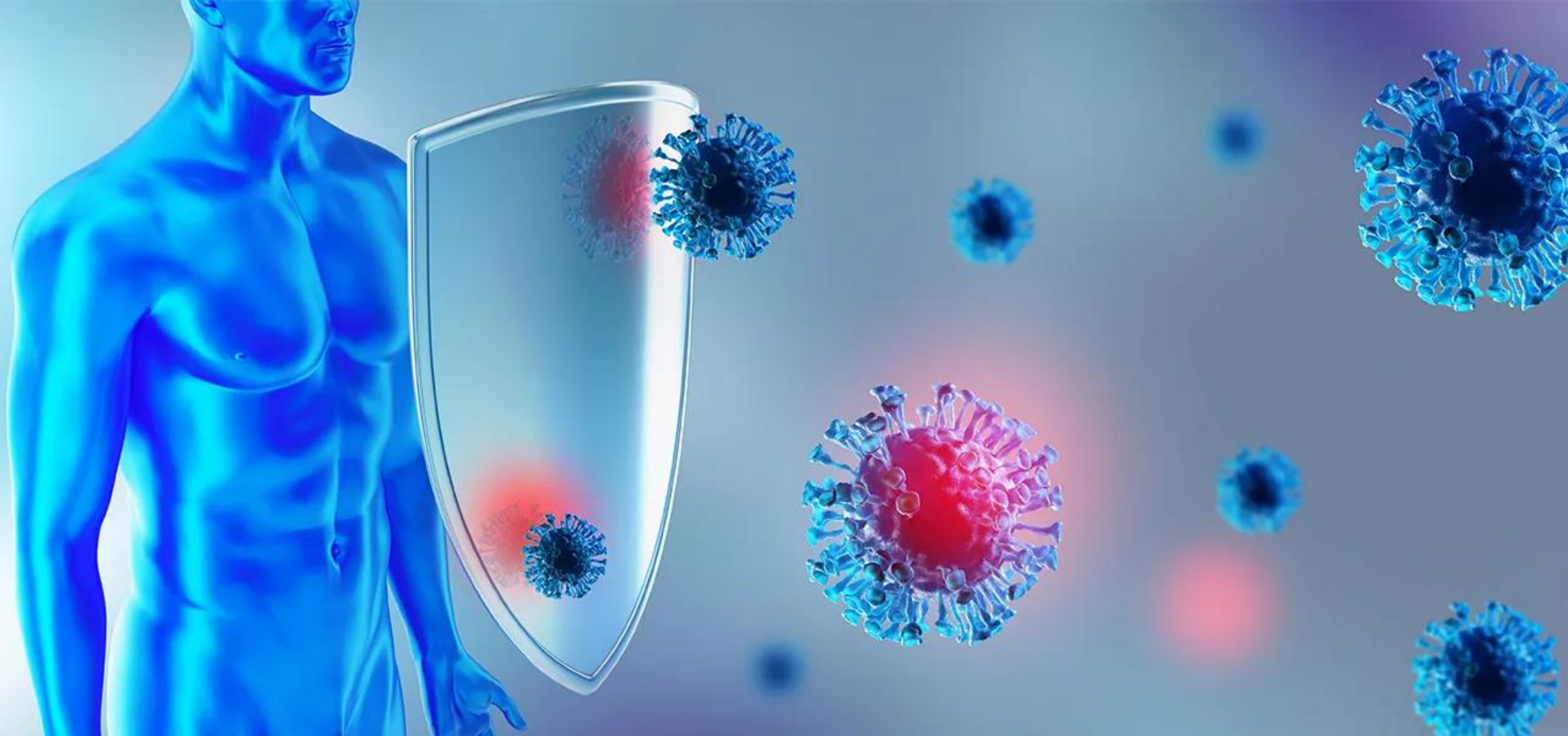
**Pruebas que
determinan
Anticuerpos
neutralizantes**



4

**Correlato
de
inmuno
protección**

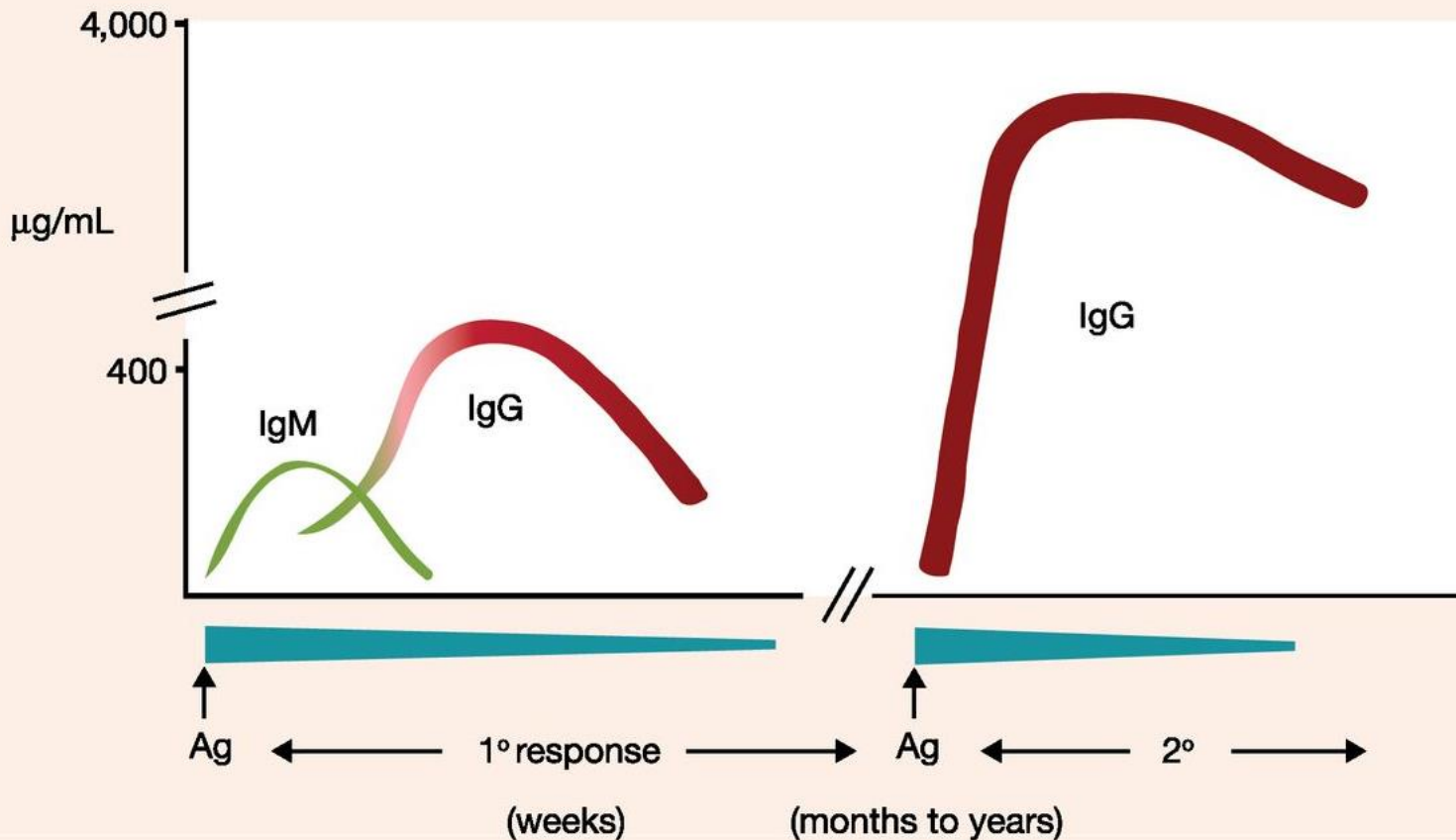




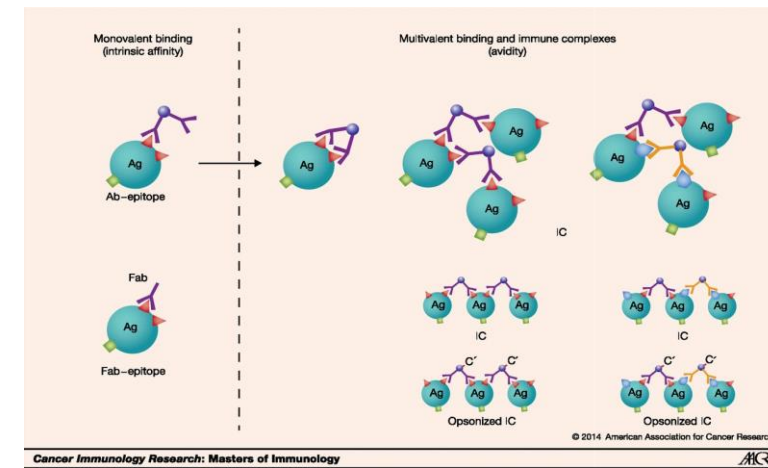
RESPUESTA INMUNITARIA

Cambios con el tiempo en los anticuerpos séricos contra un epítipo

Concentración de anticuerpos en suero después de inmunizar conejos



Afinidades intrínsecas : Verde - afinidades más bajas / Rosa - afinidades intermedias / Rojo - afinidades más altas

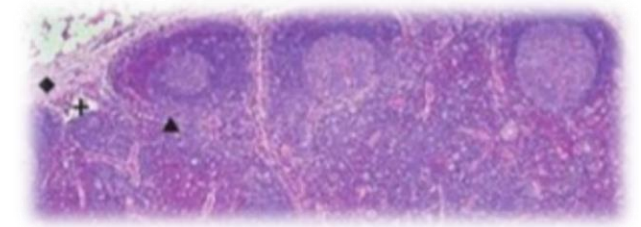


Los abs producidos inicialmente son *IgM de alto peso molecular* con baja afinidad, mientras que los abs producidos después son de *peso molecular más bajos: IgG - IgA* con mayor afinidad

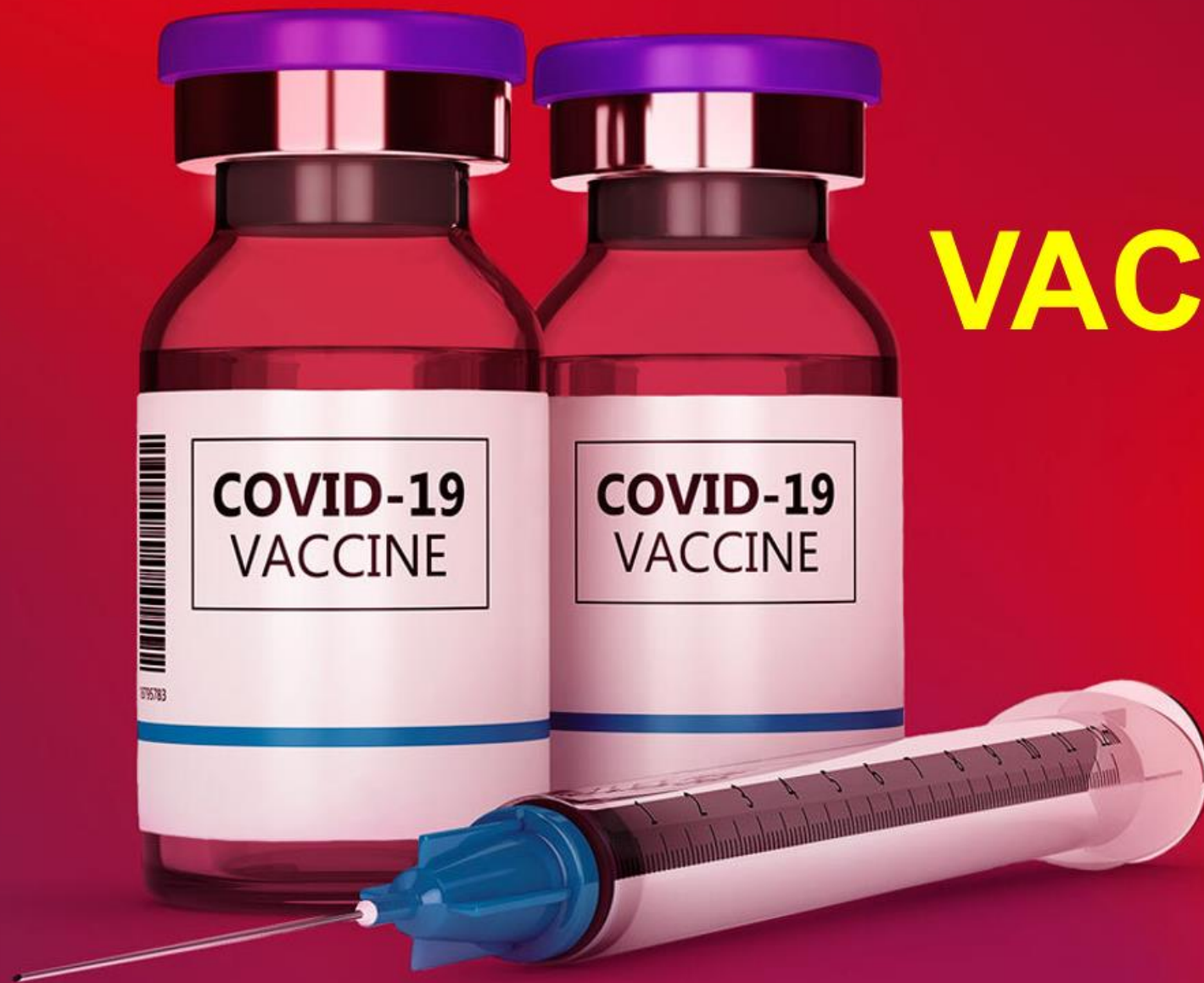
AFINIDAD

Fuerza de la interacción entre un epítipo y el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo

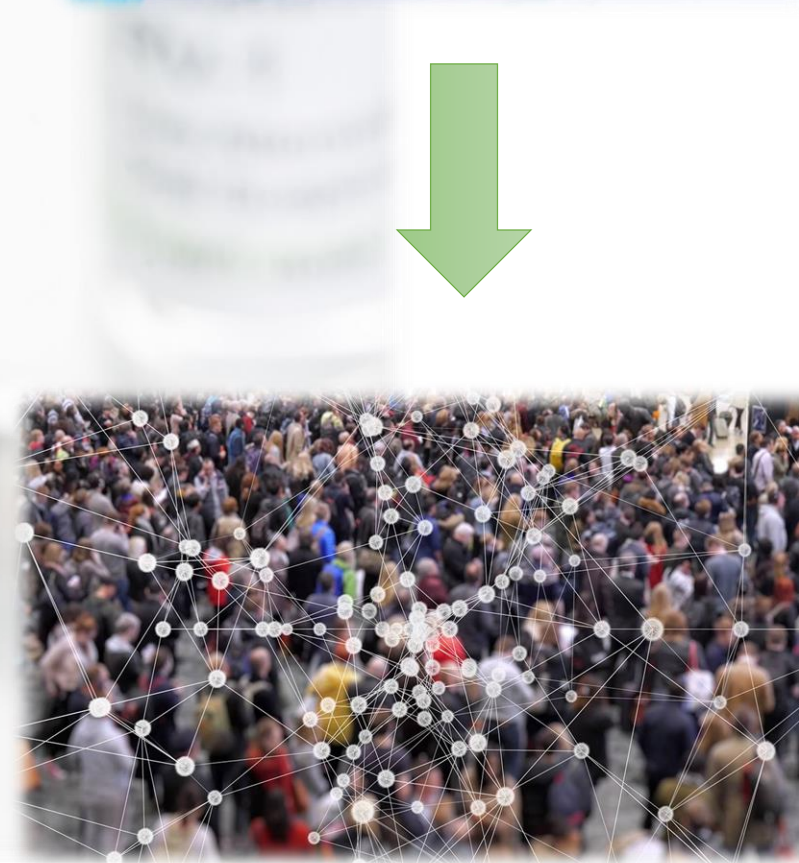
$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

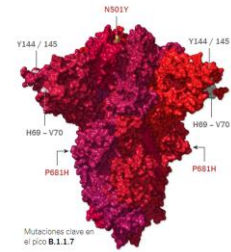
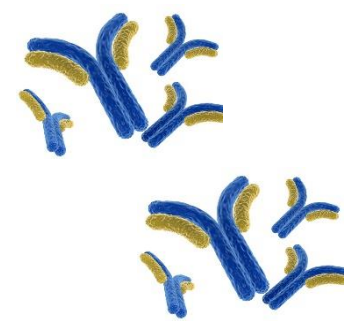
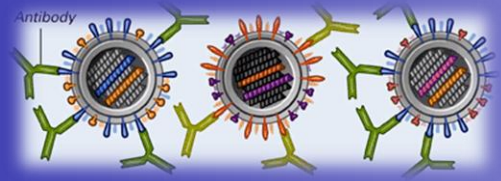
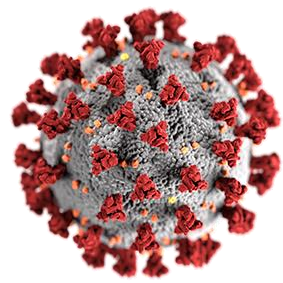
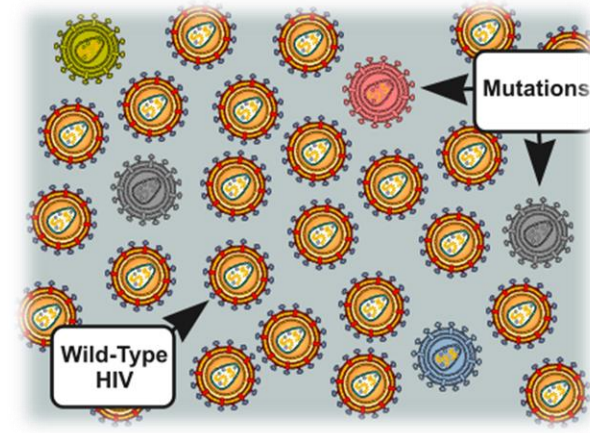
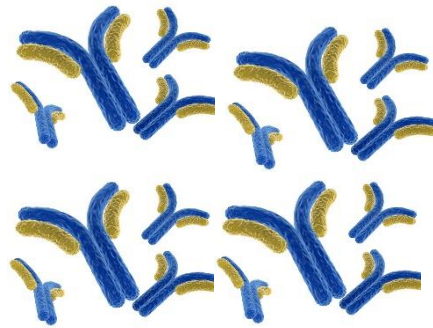


Maduración por afinidad (centros germinales)



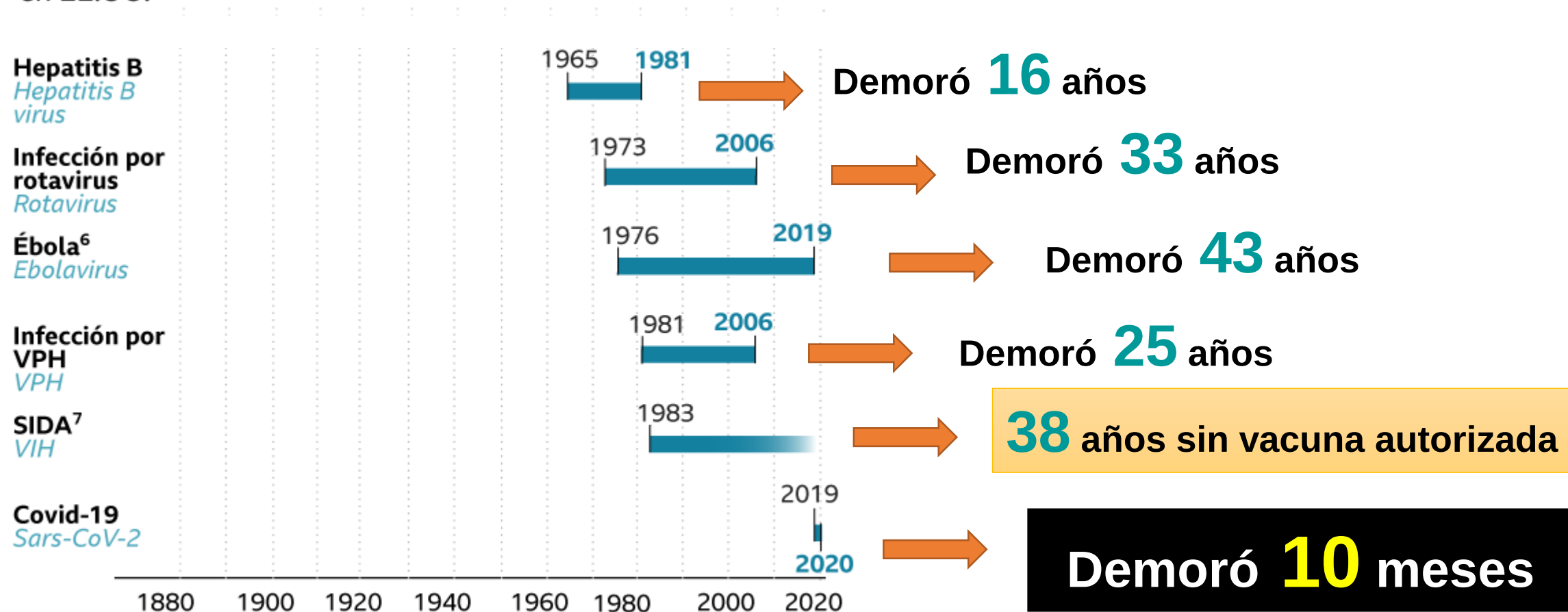
VACUNAS





¿Cuánto tiempo se tardó en aprobar las principales vacunas?

Periodo desde la identificación del agente causal de la enfermedad hasta la validación para el uso de una vacuna en EE.UU.



VIRUS VACCINES

At least seven teams are developing vaccines using the virus itself, in a weakened or inactivated form. Many existing vaccines are made in this way, such as those against measles and polio, but they require extensive safety testing. Sinovac Biotech in Beijing has started to test an inactivated version of SARS-CoV-2 in humans.

Weakened virus

A virus is conventionally weakened for a vaccine by being passed through animal or human cells until it picks up mutations that make it less able to cause disease. Codagenix in Farmingdale, New York, is working with the Serum Institute of India, a vaccine manufacturer in Pune, to weaken SARS-CoV-2 by altering its genetic code so that viral proteins are produced less efficiently.

Inactivated virus

In these vaccines, the virus is rendered uninfected using chemicals, such as formaldehyde, or heat. Making them, however, requires starting with large quantities of infectious virus.

VIRAL-VECTOR VACCINES

Around 25 groups say they are working on viral-vector vaccines. A virus such as measles or adenovirus is genetically engineered so that it can produce coronavirus proteins in the body. These viruses are weakened so they cannot cause disease. There are two types: those that can still replicate within cells and those that cannot because key genes have been disabled.

Replicating viral vector (such as weakened measles)

The newly approved Ebola vaccine is an example of a viral-vector vaccine that replicates within cells. Such vaccines tend to be safe and provoke a strong immune response. Existing immunity to the vector could blunt the vaccine's effectiveness, however.

Non-replicating viral vector (such as adenovirus)

No licensed vaccines use this method, but they have a long history in gene therapy. Booster shots can be needed to induce long-lasting immunity. US-based drug giant Johnson & Johnson is working on this approach.

PROTEIN-BASED VACCINES

Many researchers want to inject coronavirus proteins directly into the body. Fragments of proteins or protein shells that mimic the coronavirus's outer coat can also be used.

Protein subunits

Twenty-eight teams are working on vaccines with viral protein subunits — most of them are focusing on the virus's spike protein or a key part of it called the receptor binding domain. Similar vaccines against the SARS virus protected monkeys against infection but haven't been tested in people. To work, these vaccines might require adjuvants — immune-stimulating molecules delivered alongside the vaccine — as well as multiple doses.

Virus-like particles

Empty virus shells mimic the coronavirus structure, but aren't infectious because they lack genetic material. Five teams are working on 'virus-like particle' (VLP) vaccines, which can trigger a strong immune response, but can be difficult to manufacture.

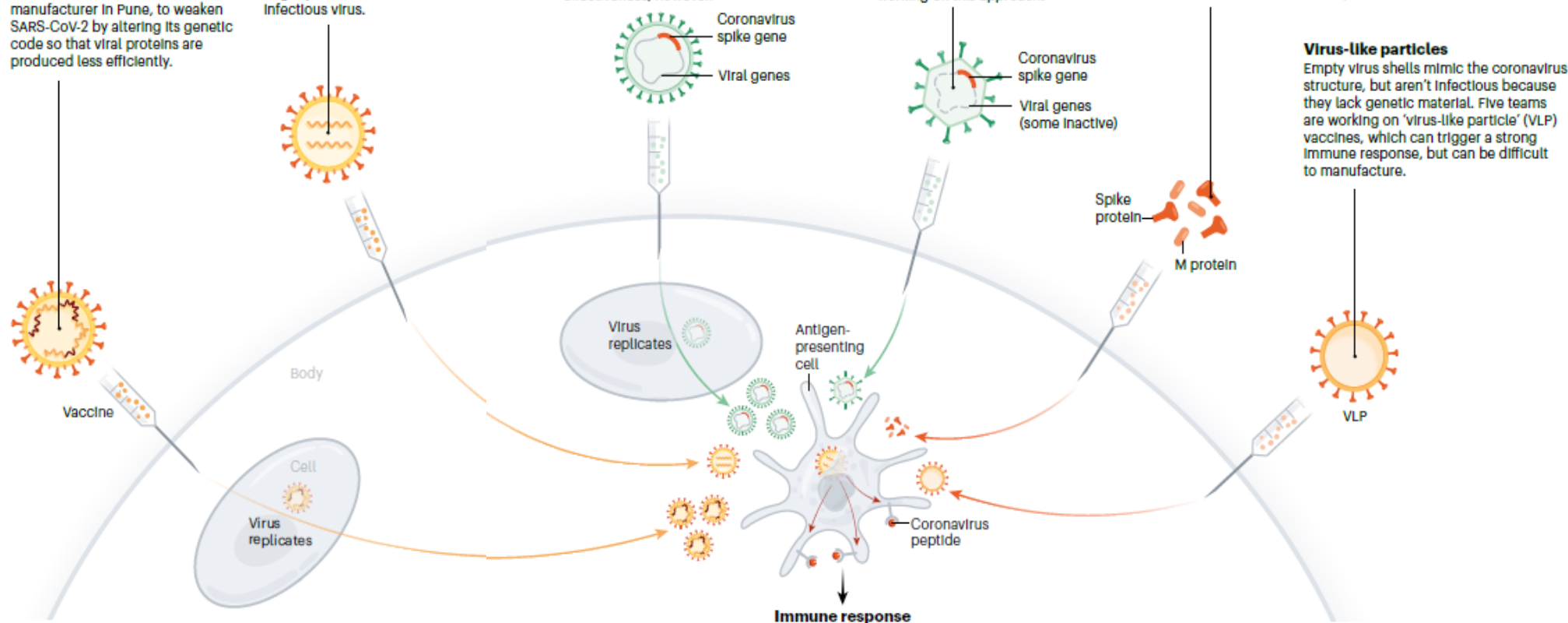
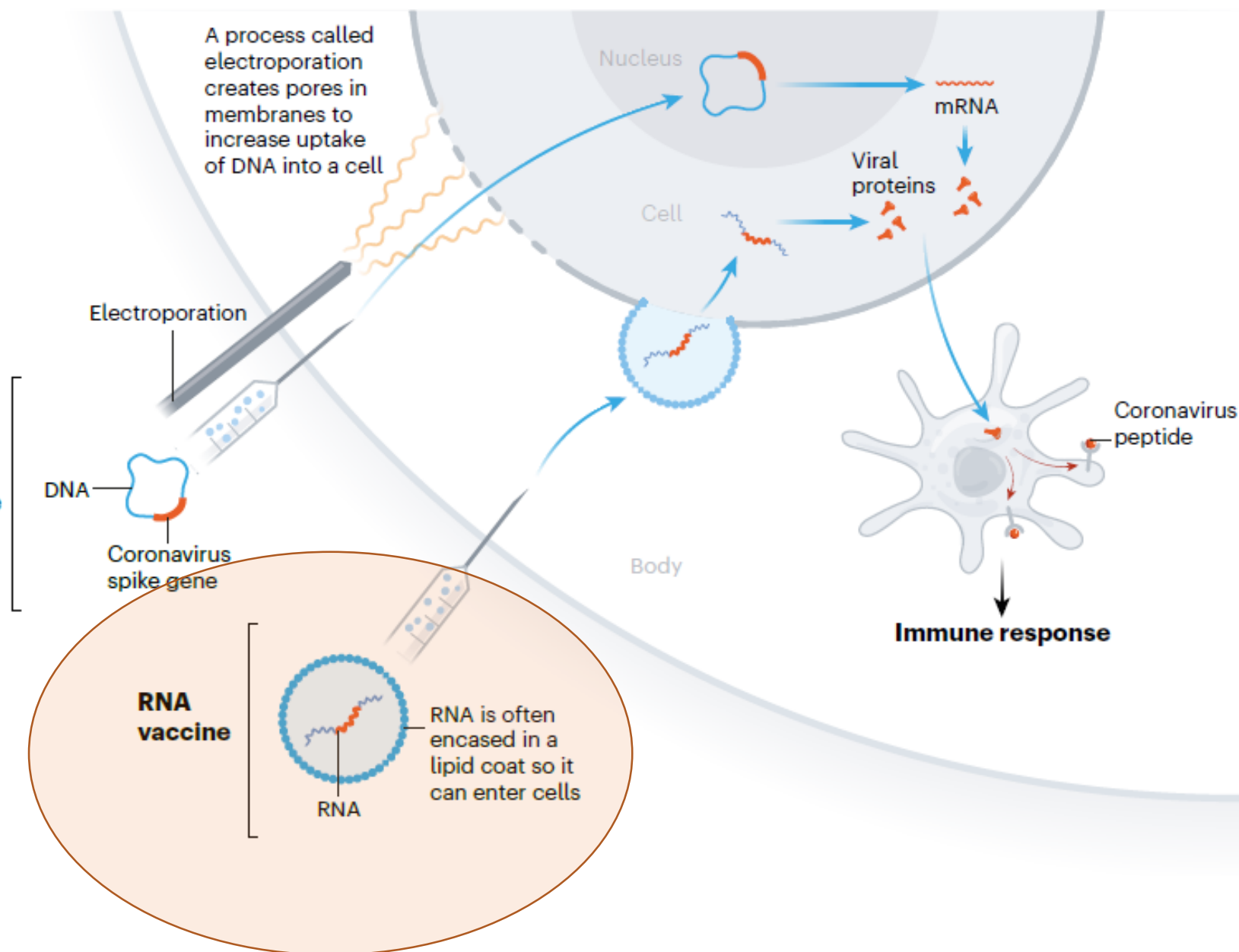
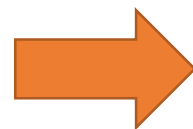


CHART SOURCES: NATURE ANALYSIS BASED ON WHO COVID-19 VACCINE LANDSCAPE; FEMILIN INSTITUTE COVID-19 TREATMENT AND VACCINE RESEARCH; THE NEW YORK TIMES; THE NEW YORK TIMES; THE NEW YORK TIMES (2020); P. ANANDY & F. KRAMER; NATURE 772, 563–569 (2020); N. SHANG ET AL. NATURE VACCINES 5, 38 (2020)

NUCLEIC-ACID VACCINES

At least 20 teams are aiming to use genetic instructions (in the form of DNA or RNA) for a coronavirus protein that prompts an immune response. The nucleic acid is inserted into human cells, which then churn out copies of the virus protein; most of these vaccines encode the virus's spike protein.

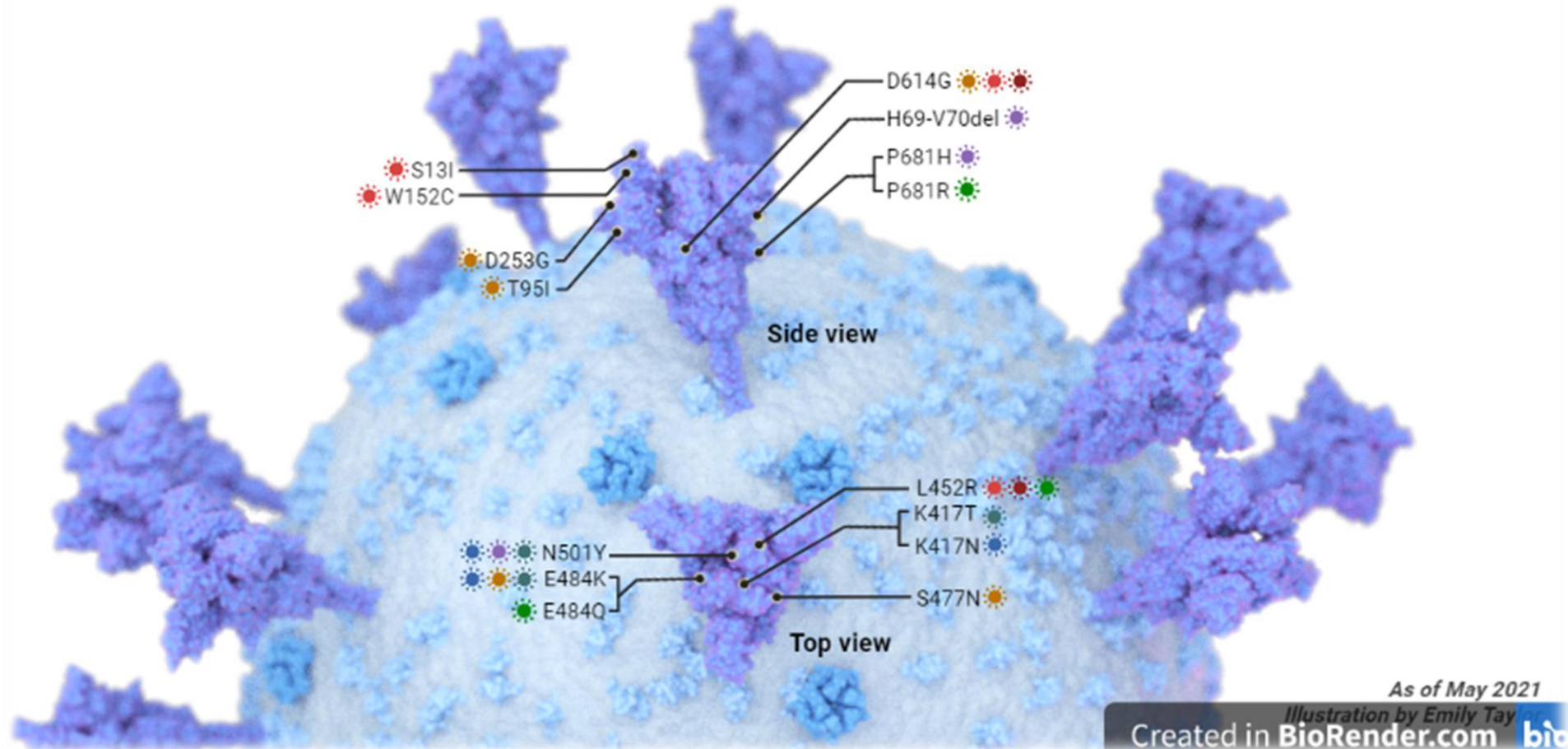
RNA- and DNA-based vaccines are safe and easy to develop: to produce them involves making genetic material only, not the virus. But they are unproven: no licensed vaccines use this technology.

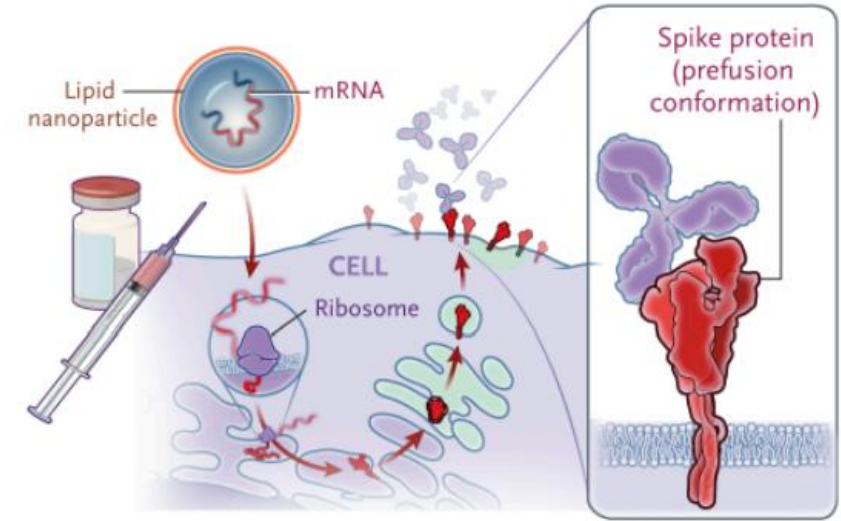


The SARS-CoV-2 Variants of Concern

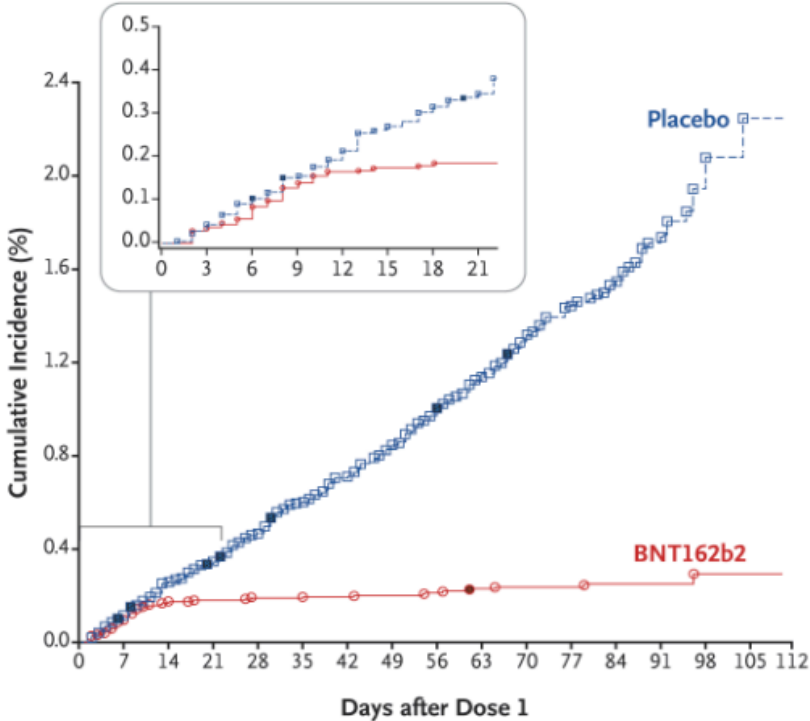
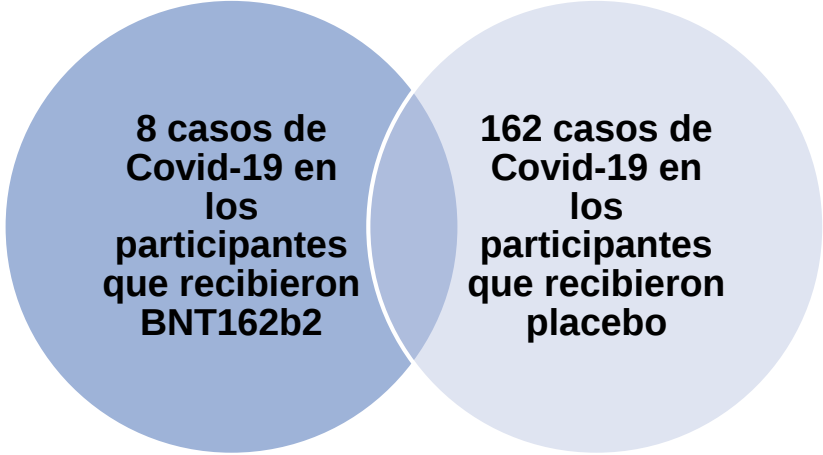
Key mutations in the spike protein are shown, but mutations in other areas of the genome have been identified and are currently under investigation. Mutations occur on all spike protein subunits.

 B.1.1.7	 B.1.351	 P.1	 B.1.526	 B.1.427	 B.1.429	 B.1.617
Discovered: Dec. 14 2020	Discovered: Dec. 18 2020	Discovered: Dec. 4 2020	Discovered: Nov. 2020	Discovered: Dec. 2020	Discovered: Nov. 2020	Discovered: Oct. 2020

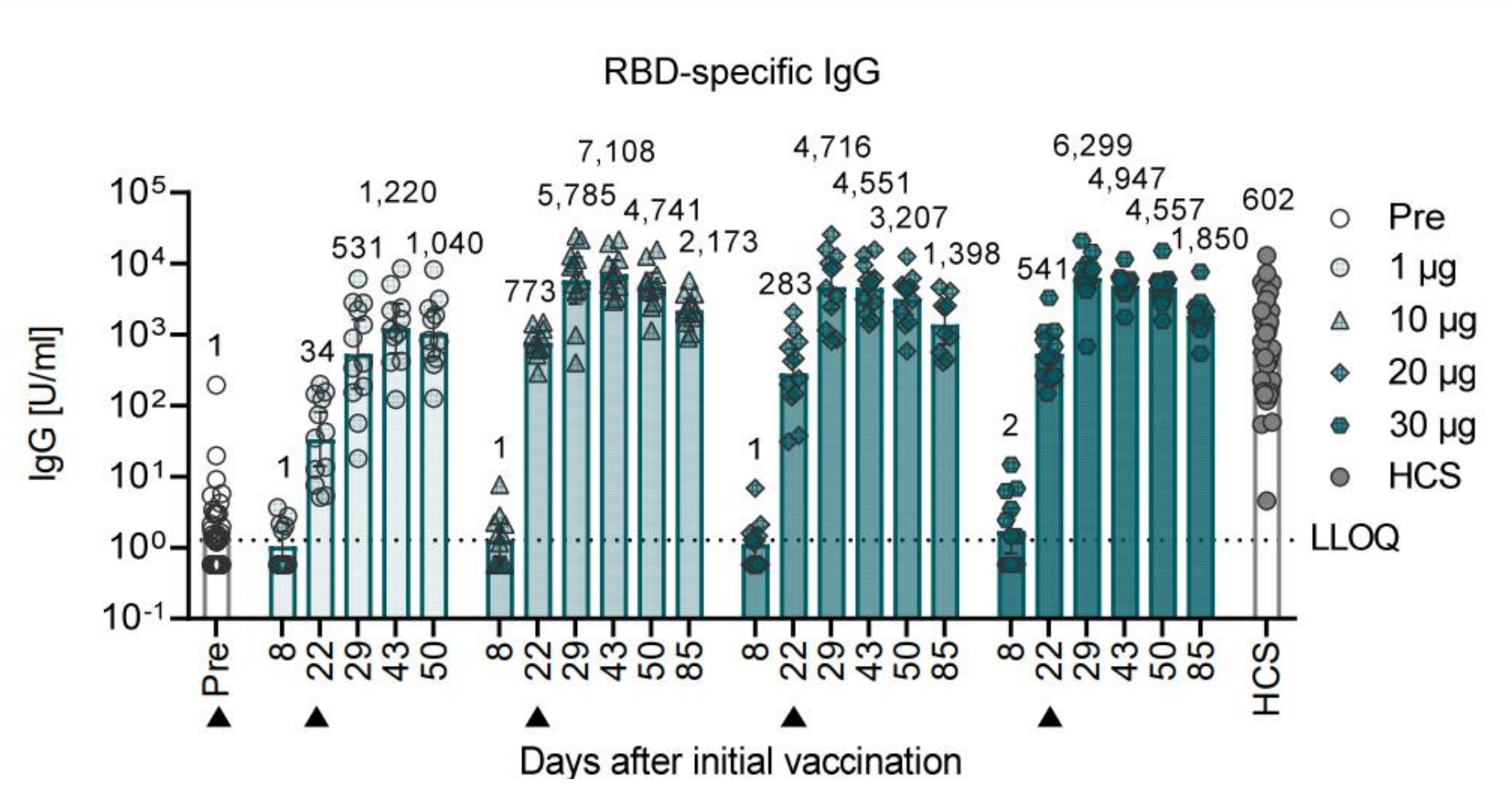




N= 43,548 participantes fueron aleatorizados
n= 21,720 con BNT162b2
n= 21,728 con placebo



95% efectivo en
prevenir Covid-19
(IC al 95%: 90,3-97,6)

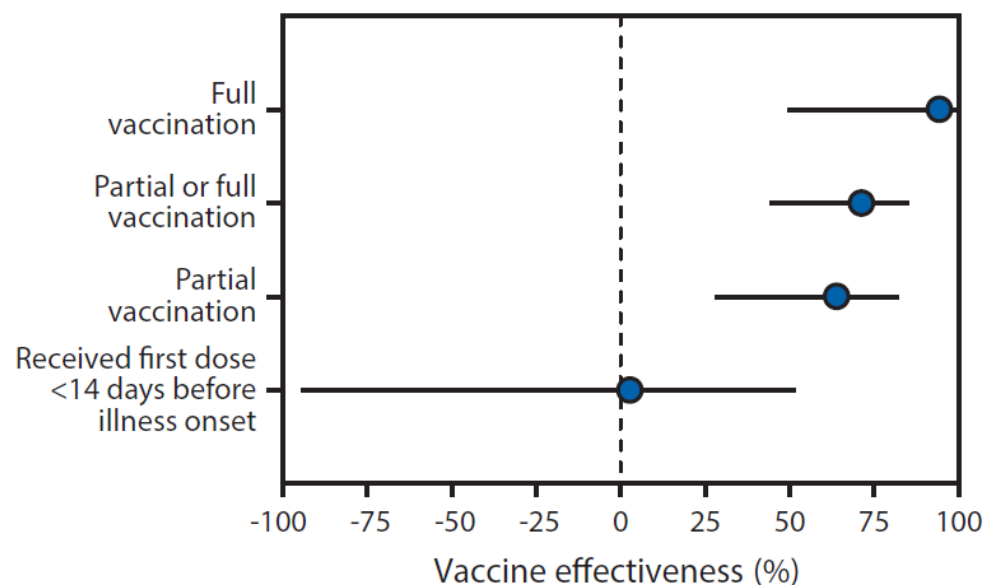


Real-world data show vaccination* **reduced the risk** for COVID-19 hospitalization among adults 65 and older†

Vaccination is a critical tool to **reduce severe COVID-19** in adults 65 and older



FIGURE. Adjusted* vaccine effectiveness (with 95% confidence intervals) against COVID-19 among hospitalized† adults aged ≥ 65 years, by vaccination status^S — 24 medical centers in 14 states,[¶] January–March 2021



Los ensayos clínicos sugieren una alta eficacia de las vacunas COVID-19, pero se necesita una evaluación de la eficacia de la vacuna contra resultados graves en entornos del mundo real y en poblaciones de alto riesgo, incluidos los adultos mayores.

INFORME

En una red multiestatal de hospitales de EE. UU. Durante enero-marzo de 2021, las vacunas Pfizer-BioNTech o Moderna COVID-19 fueron **94% efectiva contra la hospitalización por COVID-19 entre adultos vacunados (2 dosis) y 64% efectiva entre adultos parcialmente vacunados de ≥ 65 años.**

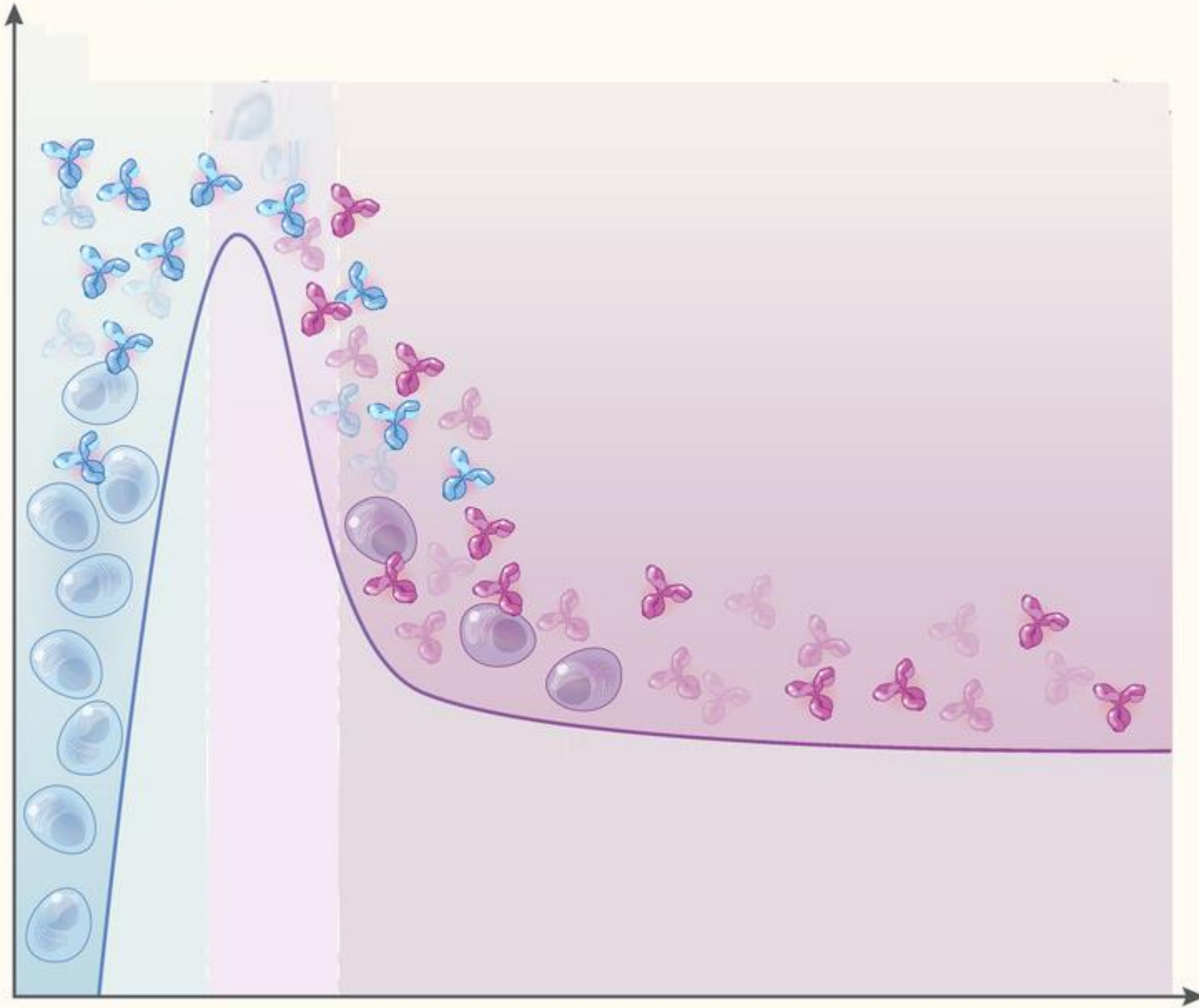
IMPACTO

Las vacunas contra el SARS-CoV-2 **reducen significativamente el riesgo de hospitalización** asociada a COVID-19 en adultos mayores y, a su vez, pueden conducir a reducciones proporcionales en las afecciones y muertes.

Frente a un suministro limitado de vacunas, el Reino Unido , a fines de 2020 retrasó las segundas dosis de vacunas para maximizar el número de personas que estarían parcialmente protegidas de hospitalización y muerte.

Un estudio sugiere que retrasar la 2da dosis del ARNm de Pfizer – BioNTech podría aumentar las respuestas de anticuerpos después de la segunda inoculación **más de tres veces en los mayores de 80 años.**





Los niveles de anticuerpos fueron **3,5 veces más altos** en las personas que esperaron **12** semanas por su vacuna de refuerzo, que en las personas que esperaron solo **3** semanas.



Early effectiveness of covid-19 vaccination BNT162b2 mRNA and ChAdOx1-S adenovirus vector vaccines

Summary



One dose of either vaccine provides 60-70% protection against symptomatic covid-19 and about 80% protection against hospital admission

Study design



Test negative case-control

Included whole population of **over 70s in England** (approx. 7.5 million)

Population



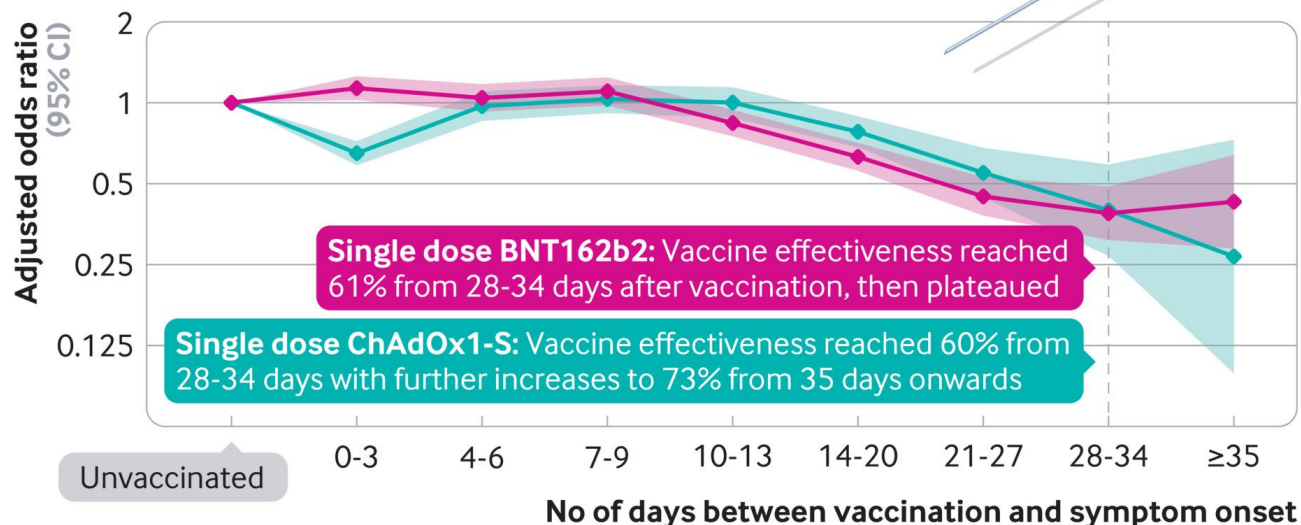
153 441 individuals developed symptoms and were tested through community testing (8 Dec to 19 Feb 2021)

Outcomes

— BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)
— ChAdOx1-S (Oxford-AstraZeneca)

Symptomatic covid-19 disease

Adjusted odds ratio for confirmed case by interval after vaccination dose 1, administered from 4 January 2021



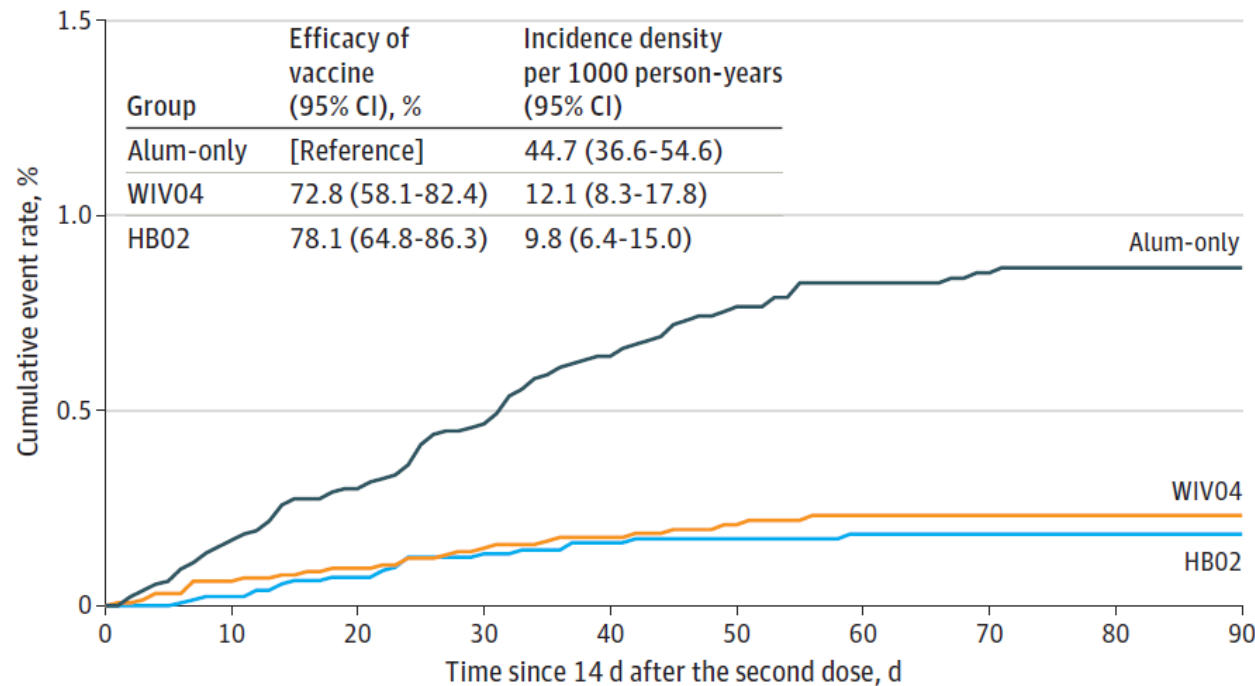
La **vacunación** con una dosis de BNT162b2 o ChAdOx1-S se asoció con una reducción significativa del COVID-19 sintomático en los adultos mayores y con una **mayor protección contra la enfermedad grave.**

Ambas vacunas mostraron efectos similares.

¿Cuál es la eficacia de 2 vacunas con virus inactivado, contra el SARS-CoV-2, para la prevención del COVID-19 sintomático?

Figure 2. Efficacy of 2 Inactivated Vaccines Against Symptomatic COVID-19

A Modified full analysis population-1



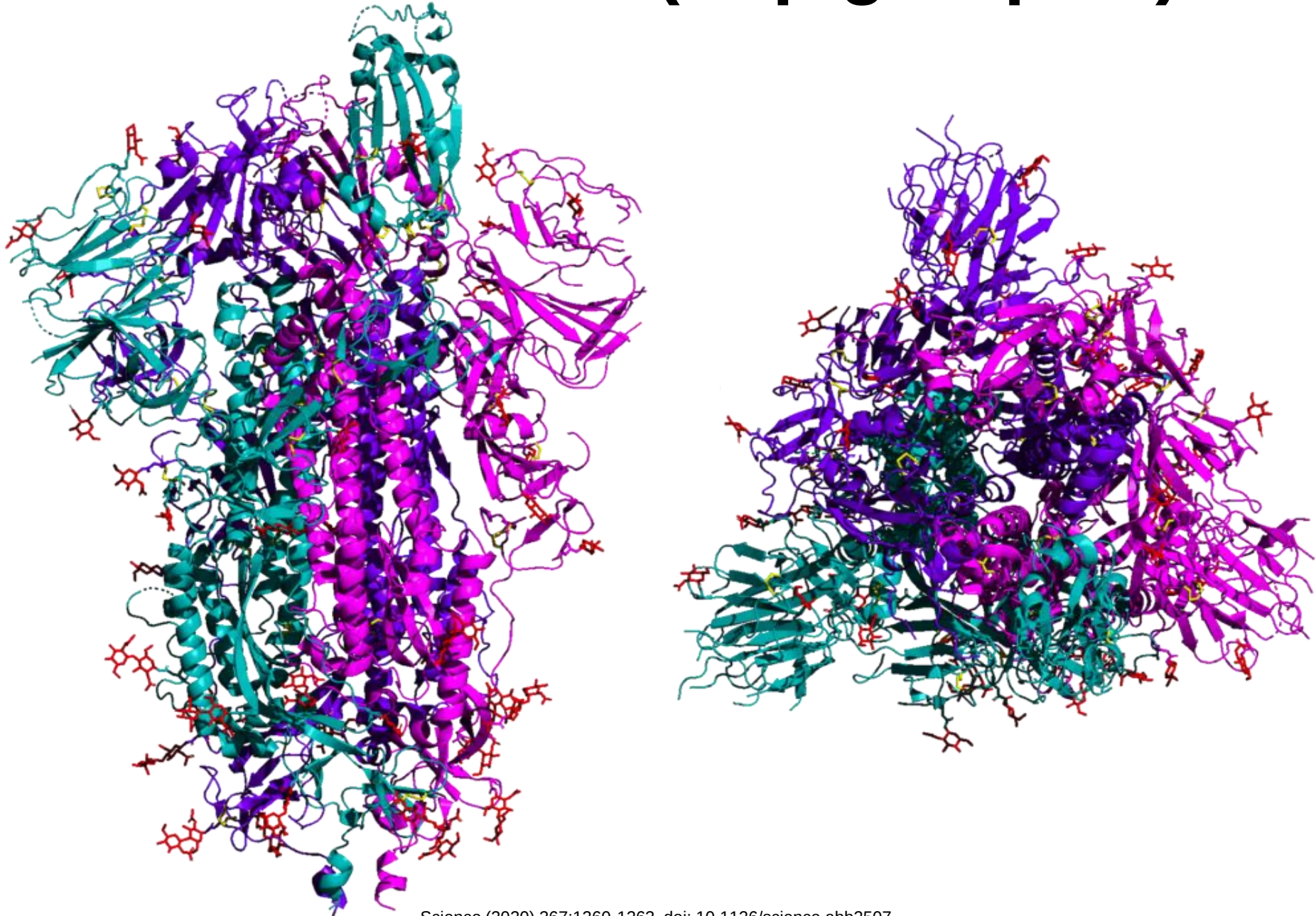
Ensayo clínico que incluyó a 40,382 participantes que recibieron al menos 1 dosis de una serie de vacunas inactivadas de 2 dosis desarrolladas a partir de 2 cepas de SARS-CoV-2 (WIV04 y HB02) de 2 pacientes en Wuhan-China, con desenlace final de incidencia de COVID-19 sintomático al menos 14 días después de la segunda inyección.

La eficacia de las 2 vacunas fue del:

- 72,8% en el WIV04
- 78,1% en el grupo HB02

Se demostró que las 2 vacunas tuvieron una eficacia contra el COVID-19 sintomático en comparación con un control.

PROTEÍNA S (Espiga-Spike)



Science (2020) 367:1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507

The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development

Lanying Du*, Yuxian He*, Yusen Zhou*, Shuwen Liu*, Bo-Jian Zheng[†] and Shibo Jiang*

Abstract | Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerging infectious disease caused by a novel coronavirus, SARS-coronavirus (SARS-CoV). The SARS-CoV spike (S) protein is composed of two subunits; the S1 subunit contains a receptor-binding domain that engages with the host cell receptor angiotensin-converting enzyme 2 and the S2 subunit mediates fusion between the viral and host cell membranes. The S protein plays key parts in the induction of neutralizing-antibody and T-cell responses, as well as protective immunity, during infection with SARS-CoV. In this Review, we highlight recent advances in the development of vaccines and therapeutics based on the S protein.

Severe acute respiratory syndrome (SARS) was the first new infectious disease identified in the twenty-first century. This acute, and often severe, respiratory illness originated in the Guangdong province of China in November 2002 (REF. 1). A global effort coordinated by WHO led to the identification, in April 2003, of a new coronavirus, SARS-coronavirus (SARS-CoV), as the agent that caused the outbreak.

SARS-CoV is an enveloped, single and positive-stranded RNA virus². Its genome RNA encodes a non-structural replicase polypeptide and structural proteins, including spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N) proteins^{3,4}. SARS-CoV, a zoonotic virus, resides in hosts that form its natural reservoir, such as bats, but can also infect intermediate hosts, such as small animals (for example, palm civets), before being transmitted to humans^{5,6}. SARS-CoV can infect and replicate in several cell types in the human body and causes serious pathological changes (BOX 1, FIG. 1). A further understanding of the life cycle and pathogenesis of SARS-CoV will help us to develop vaccines and therapeutics to prevent and treat SARS-CoV and SARS-like coronavirus (SL-CoV) infections in the future.

After its first occurrence, SARS rapidly spread around the world along international air-travel routes, reaching all five continents and 29 countries, resulting in 8,098 cases and 774 deaths by 23 September 2003 (REF. 9). The overall fatality of SARS is about 10% in the general population, but >50% in patients aged 65 years and older (WHO update 49; see Further information). The global

outbreak of SARS was brought under control in July 2003 by effective quarantine, patient-isolation and travel restrictions. Four sporadic SARS cases caused by different SARS-CoV isolates than those that predominated in the 2002–2003 outbreak were reported in late 2003 and early 2004 (REFS 10–12). The most recent epidemic of SARS occurred in Beijing and Anhui in China in April 2004 and originated from laboratory contamination (WHO update 7; see Further information). Since then, no new case of SARS has been reported, possibly because of continued global vigilance and surveillance and laboratory bio-safety practices, as well as the euthanizing or quarantining of animals that may have been exposed to SARS-CoV^{13,14}. Although the outbreaks of SARS seem to be over, SARS is still a safety concern because of the possible reintroduction of a SL-CoV into humans and the risk of an escape of SARS-CoV from laboratories^{15,16}.

Infection with SARS-CoV can trigger a series of humoral and cellular immune responses. Specific antibodies against SARS-CoV (immunoglobulin G (IgG) and IgM) were detectable approximately 2 weeks post-infection, reaching a peak 60 days post-infection and remaining at high levels until 180 days post-infection (REF. 17). High titres of neutralizing antibodies and SARS-CoV-specific cytotoxic T lymphocyte responses were detected in patients who had recovered from SARS^{18,19}, and the levels of the responses correlated well with the disease outcome²⁰. This suggests that both humoral and cellular immune responses are crucial for the clearance of infection by SARS-CoV.

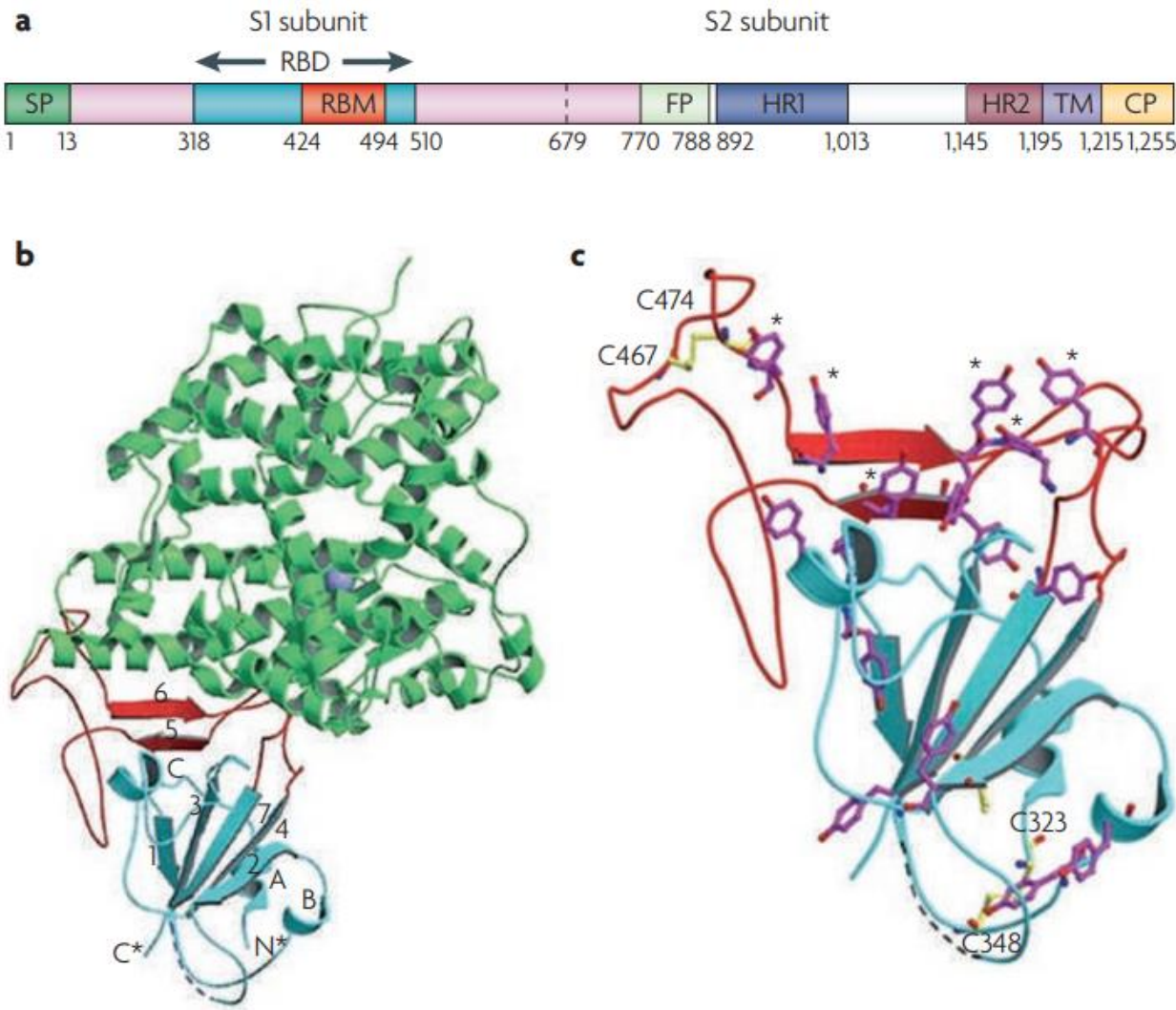
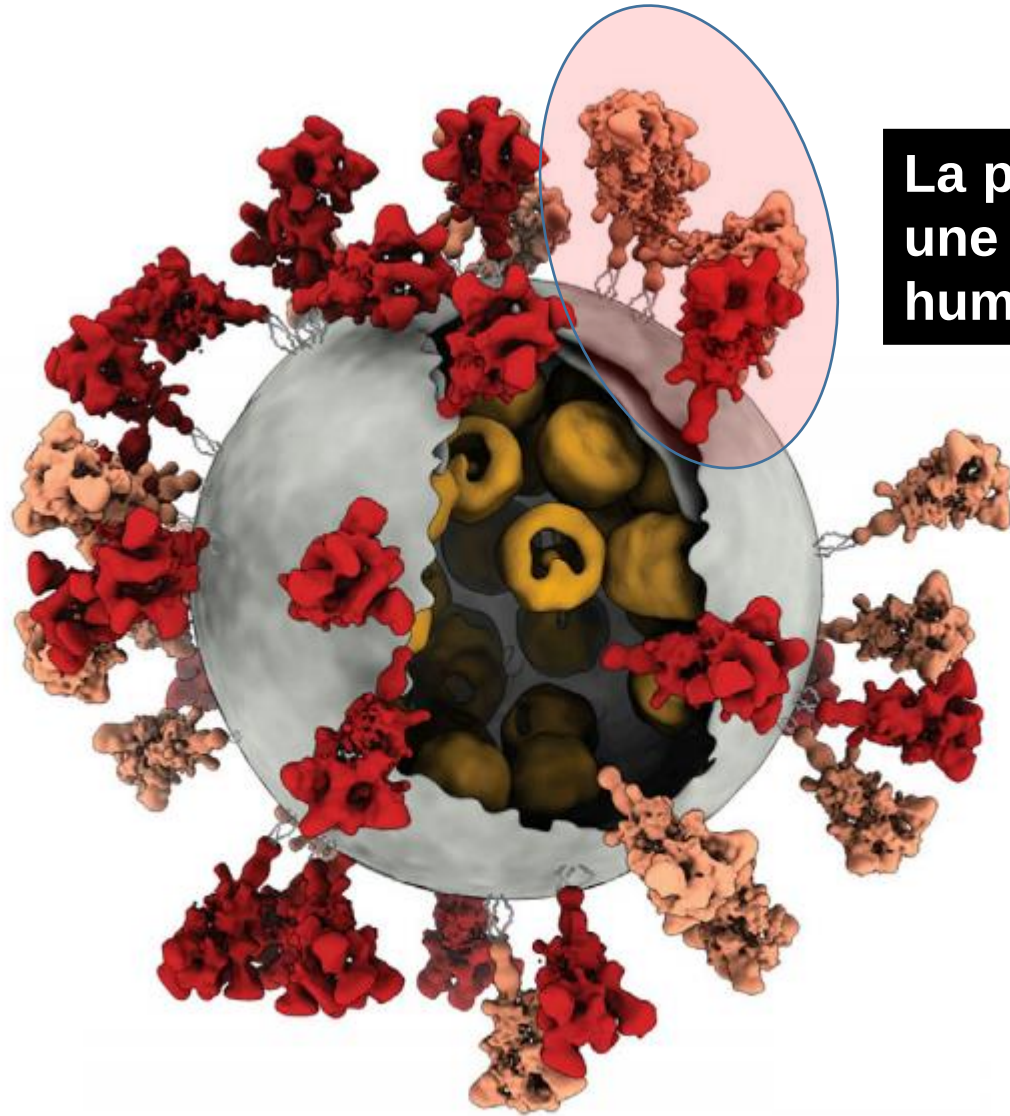


Figure 2 | SARS-CoV S protein structure and its complex with the receptor ACE2.

Zoonotic virus
A virus that normally exists in vertebrate animals, but can also be transmitted to humans and can cause disease in both animals and humans.

*Lindsay F. Kirshall Research Institute, New York Blood Center, 310 East 67th Street, New York, New York 10065, USA.
[†]State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China.
[‡]School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.
[§]Department of Microbiology, University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China.
Correspondence to S.J. e-mail: sjia@hku.hk
DOI: 10.1038/nrmicro2090
Published online 9 February 2009

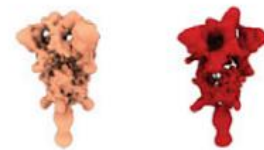
Arquitectura molecular del virus SARS-CoV-2



La proteína S es la que se une a las células humanas

PROTEÍNA DE LA ESPIGA

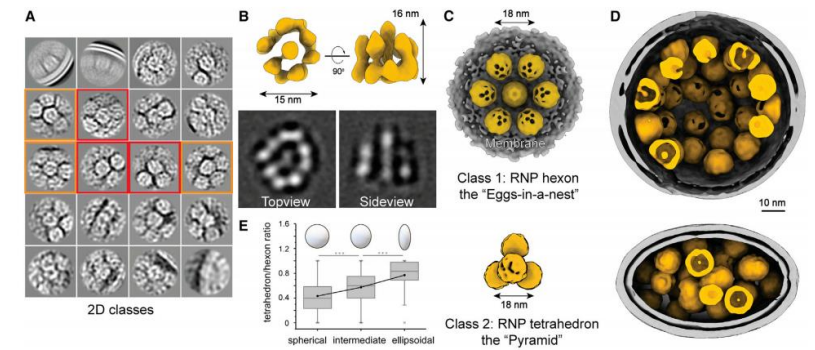
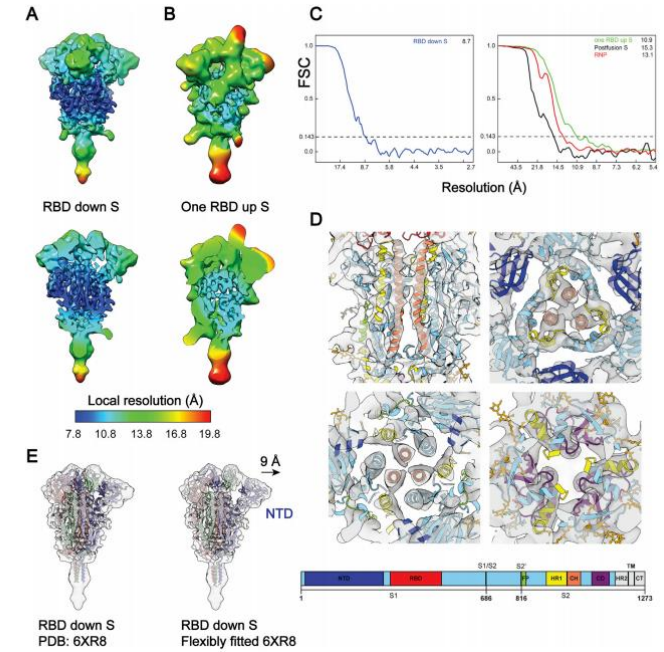
(S=spike)

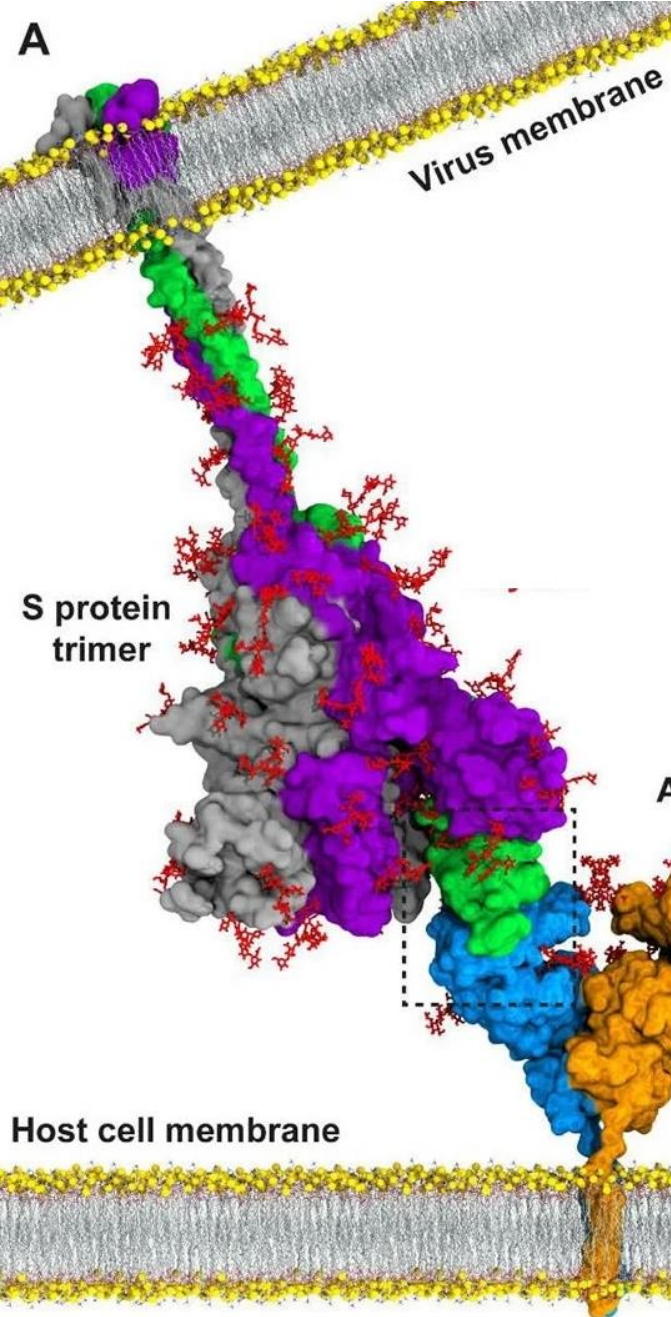


ARN
(ácido ribonucleico)



ENVOLTURA

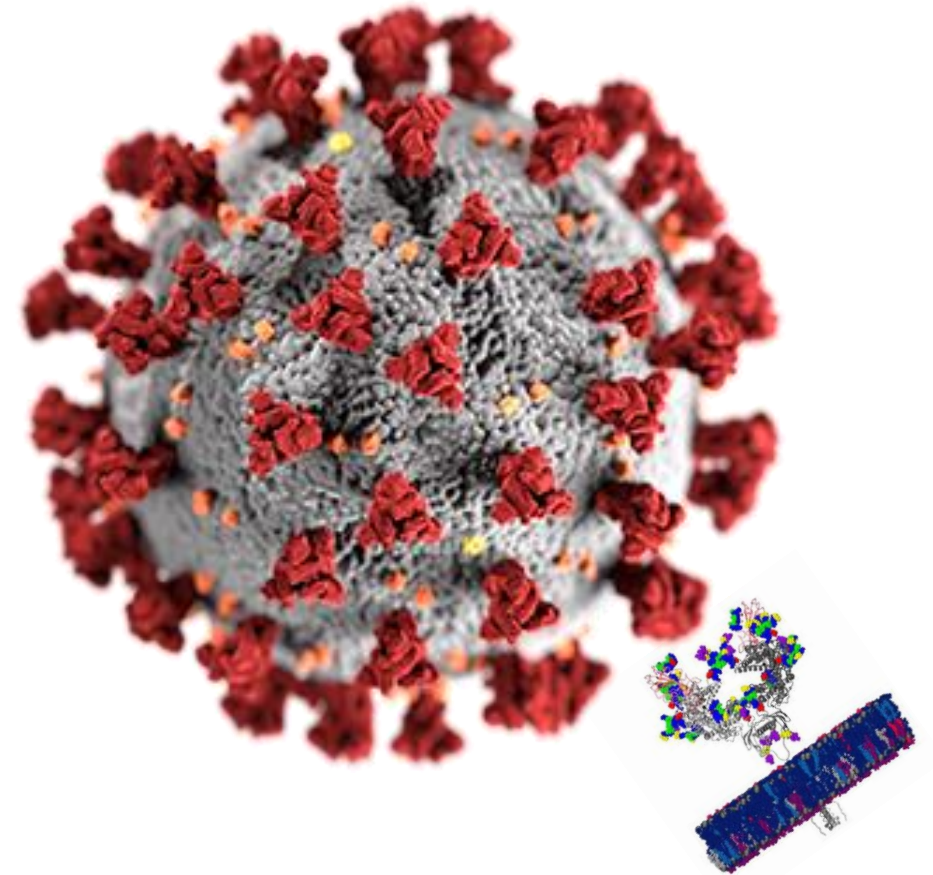




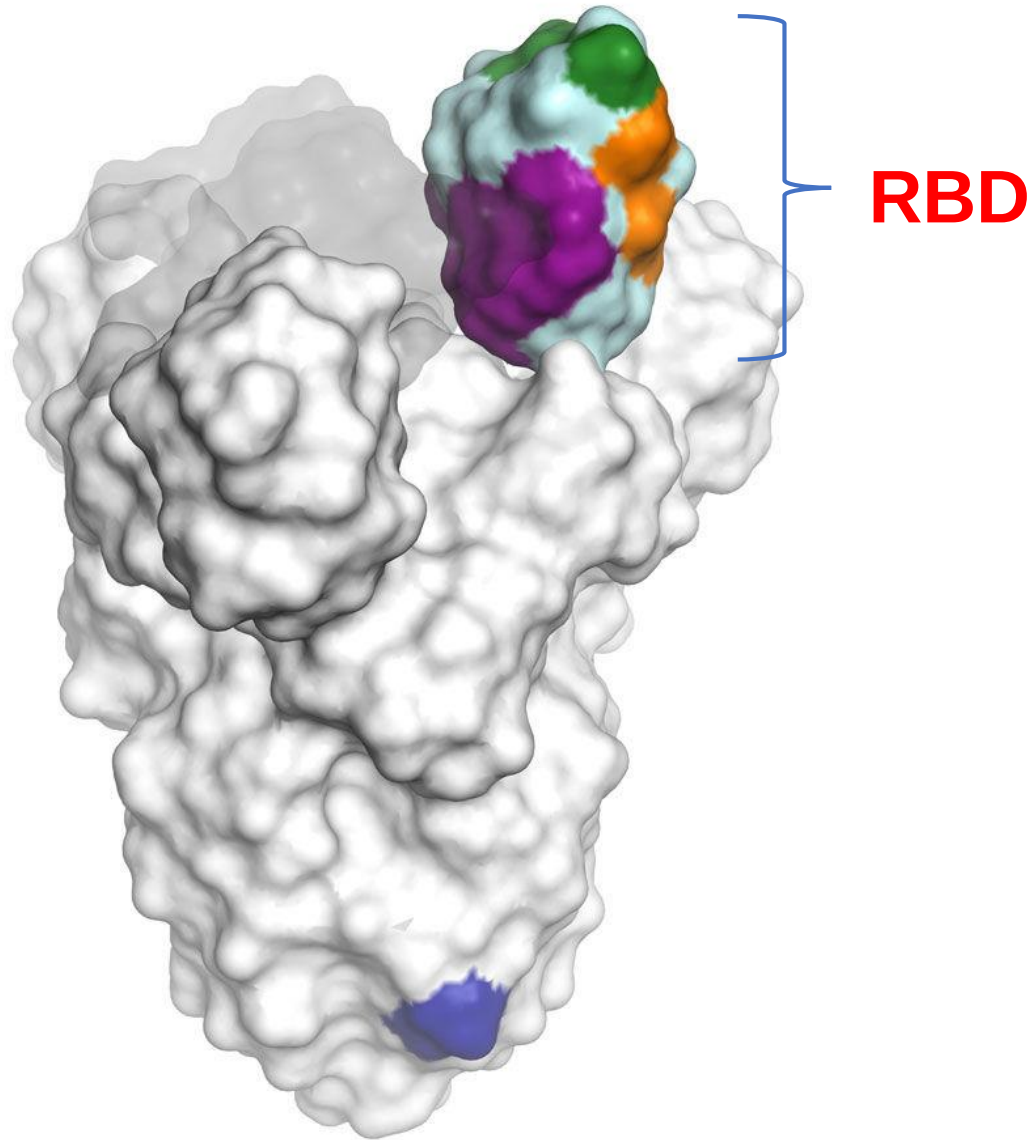
La proteína de la espiga (S) del SARS-CoV-2 tiene 1273 aminoácidos y es el *objetivo principal de las vacunas COVID-19*



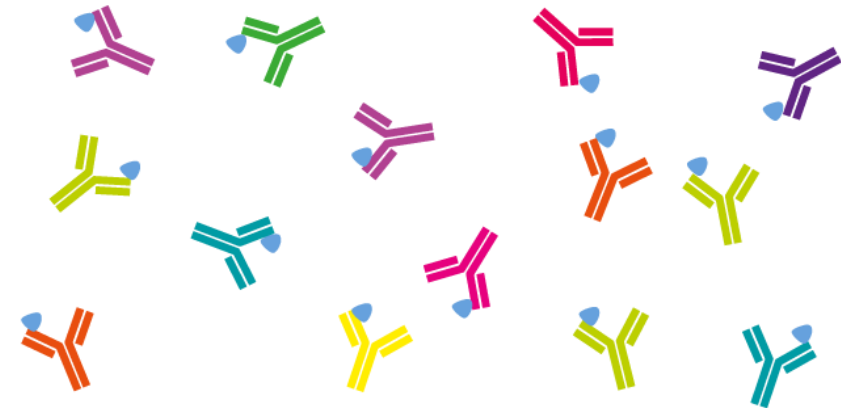
AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



Comienza la carrera por los anticuerpos que detengan el nuevo coronavirus



El dominio de unión al receptor (**RBD**) de la proteína de S puede bloquearse mediante anticuerpos.

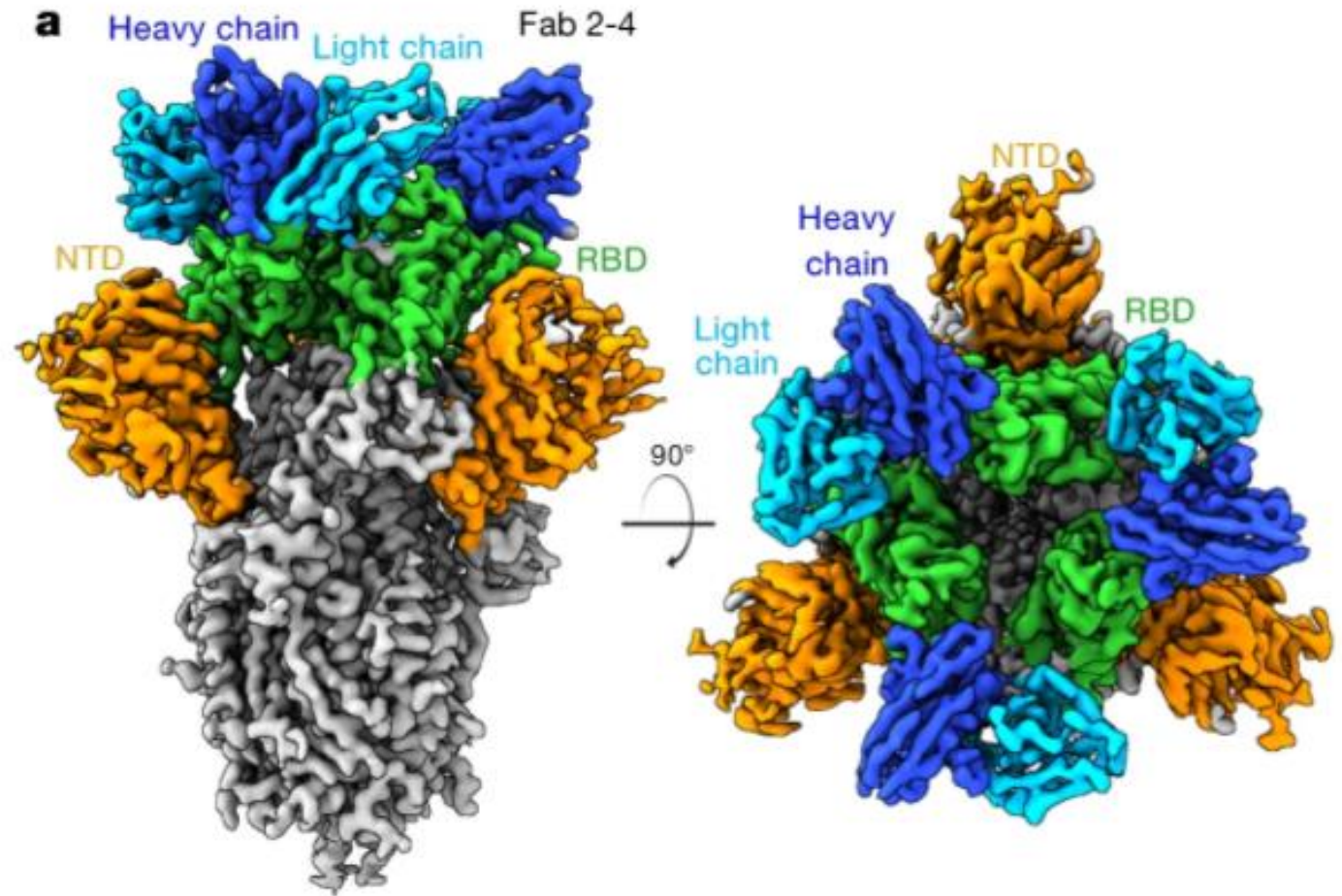


La potencia y diversidad de los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el SARS-CoV-2

61 anticuerpos
Monoclonales neutralizantes
contra el SARS-CoV-2

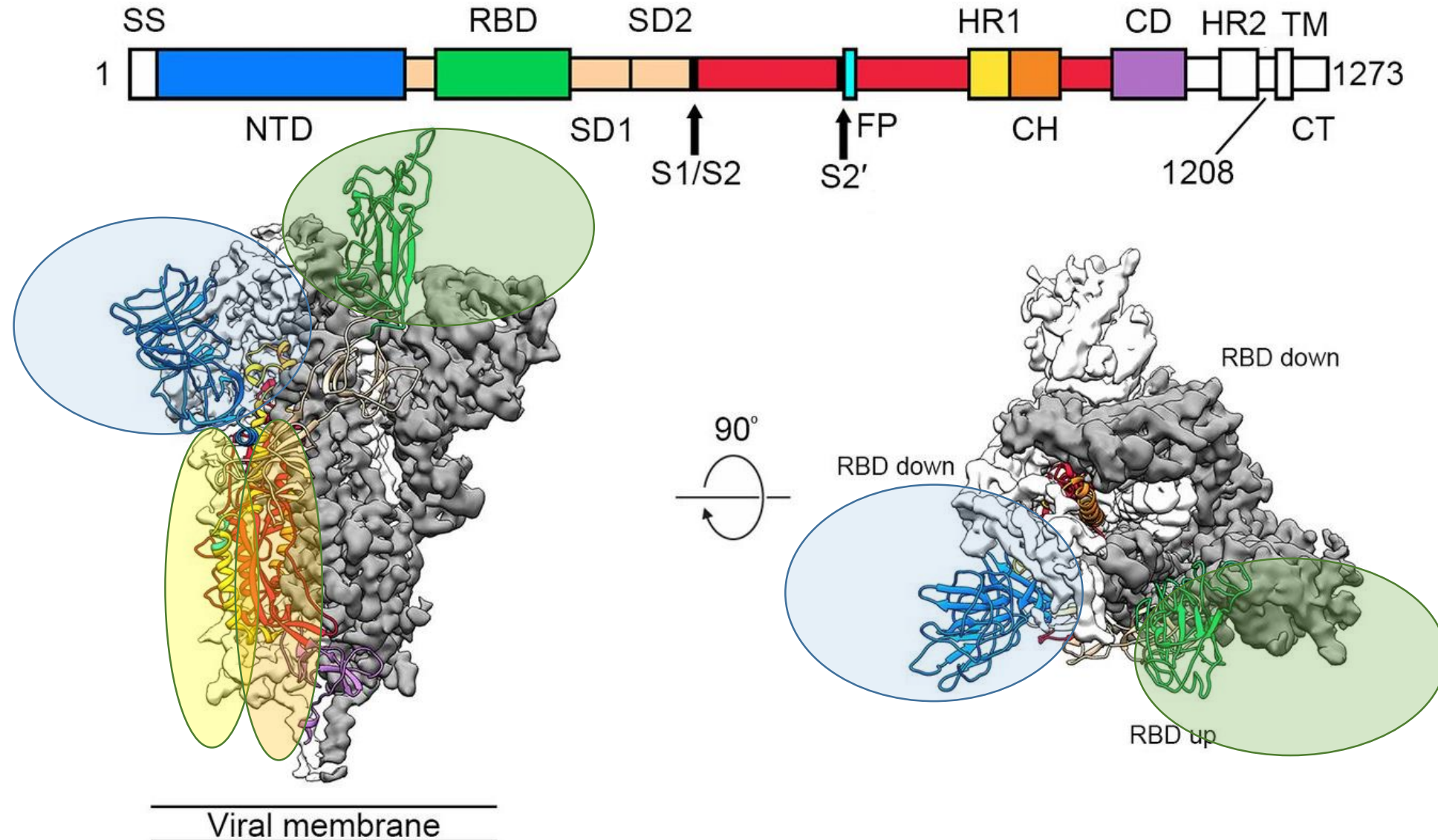
19 anticuerpos neutralizaron
potentemente el SARS-CoV-2
en experimentos in vitro

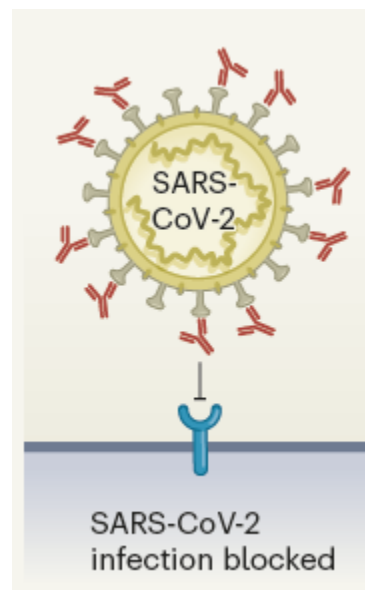
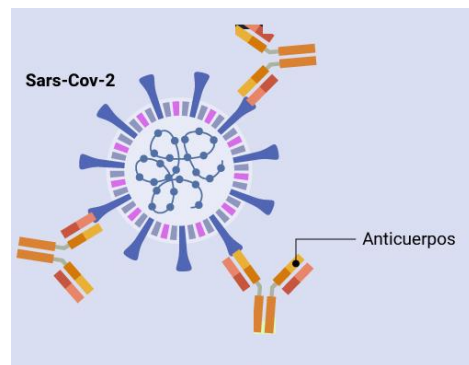
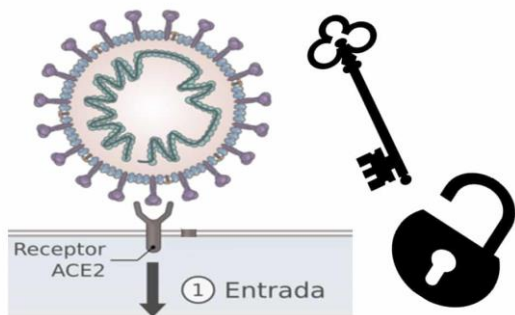
El mapeo de epítopes
evidenció anticuerpos
neutralizantes dirigidos
hacia RBD y otros epítopes
(regiones inmunogénicas)



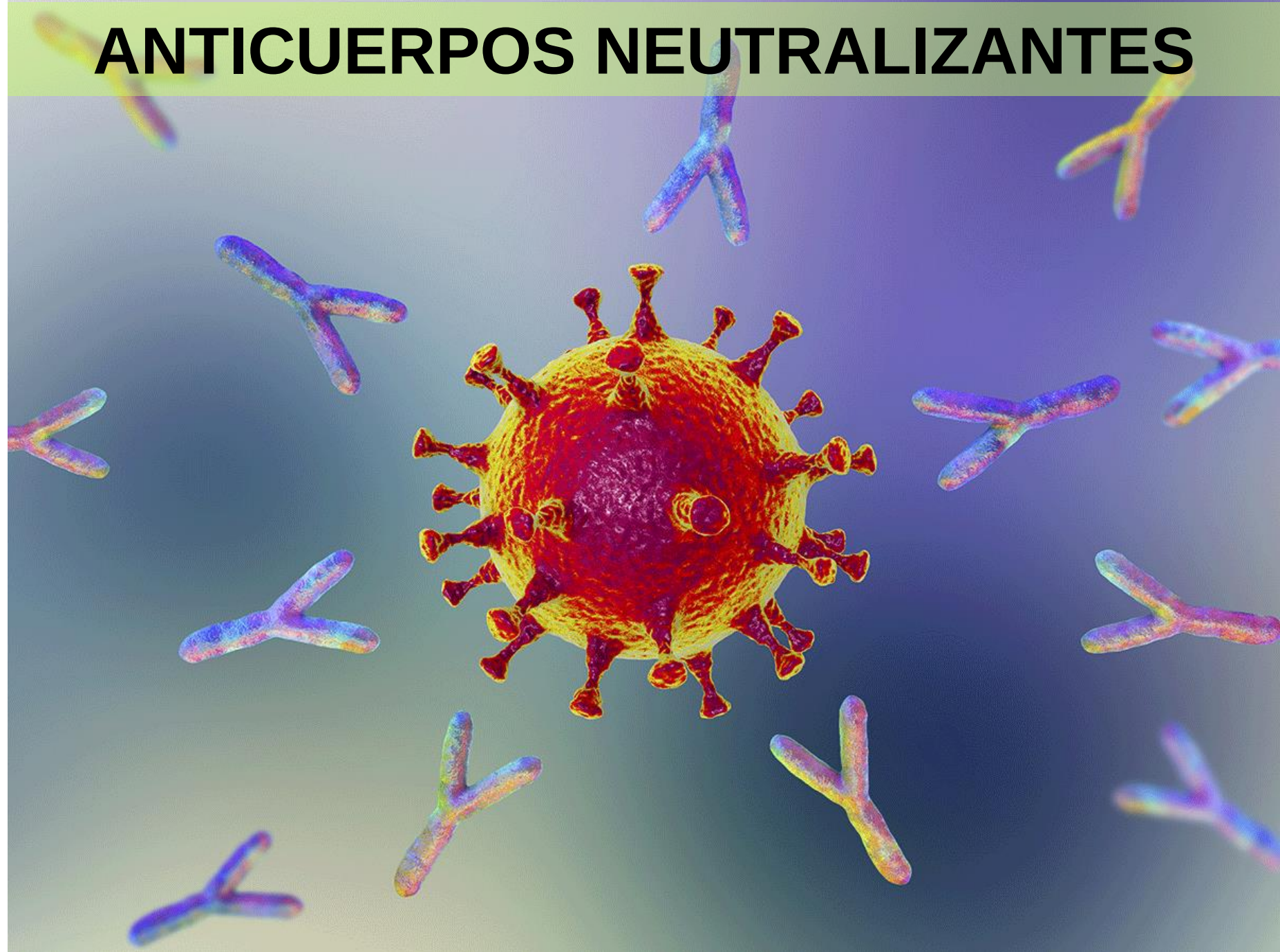
RBD y NTD son, sin duda, muy
inmunogénicas

Potentes anticuerpos neutralizantes contra múltiples epítomos en el la proteína S del SARS-CoV-2





ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES



Ensayos para determinar anticuerpos neutralizantes

Prueba de Neutralización por Reducción de Placa (PRNT)

Prueba de Neutralización por Reducción de Enfoque (FRNT)

Nivel 3 (BSL-3)

Prueba de Reducción de Microneutralización en Placa

Nivel 3 (BSL-3)

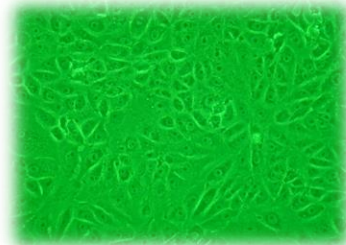
Pruebas con Pseudovirus

Nivel 2 (BSL-2)

INMUNOENSAYOS

**ELISA
CLIA-ECLIA
IMF**

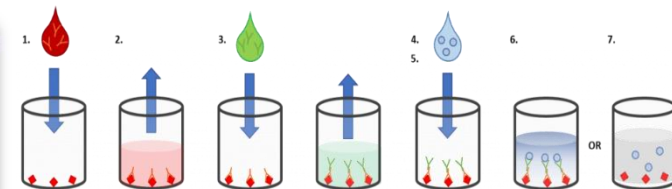
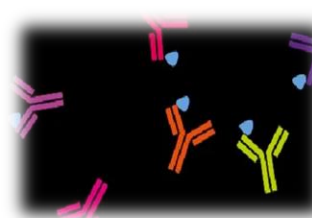
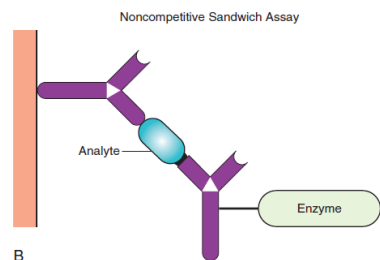
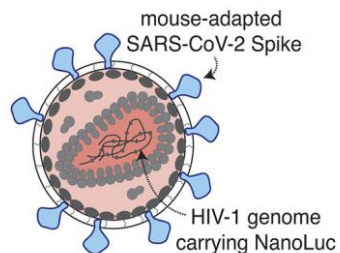
Nivel 2 (BSL-2)



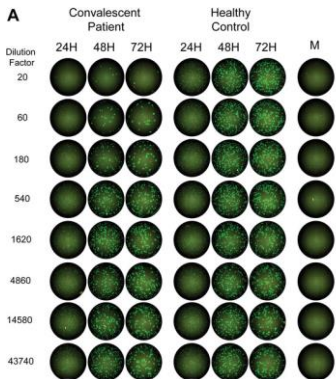
**Células VERO
que expresan
ACE2**



**Virus SARS-CoV-2
o Pseudovirus
vivos**



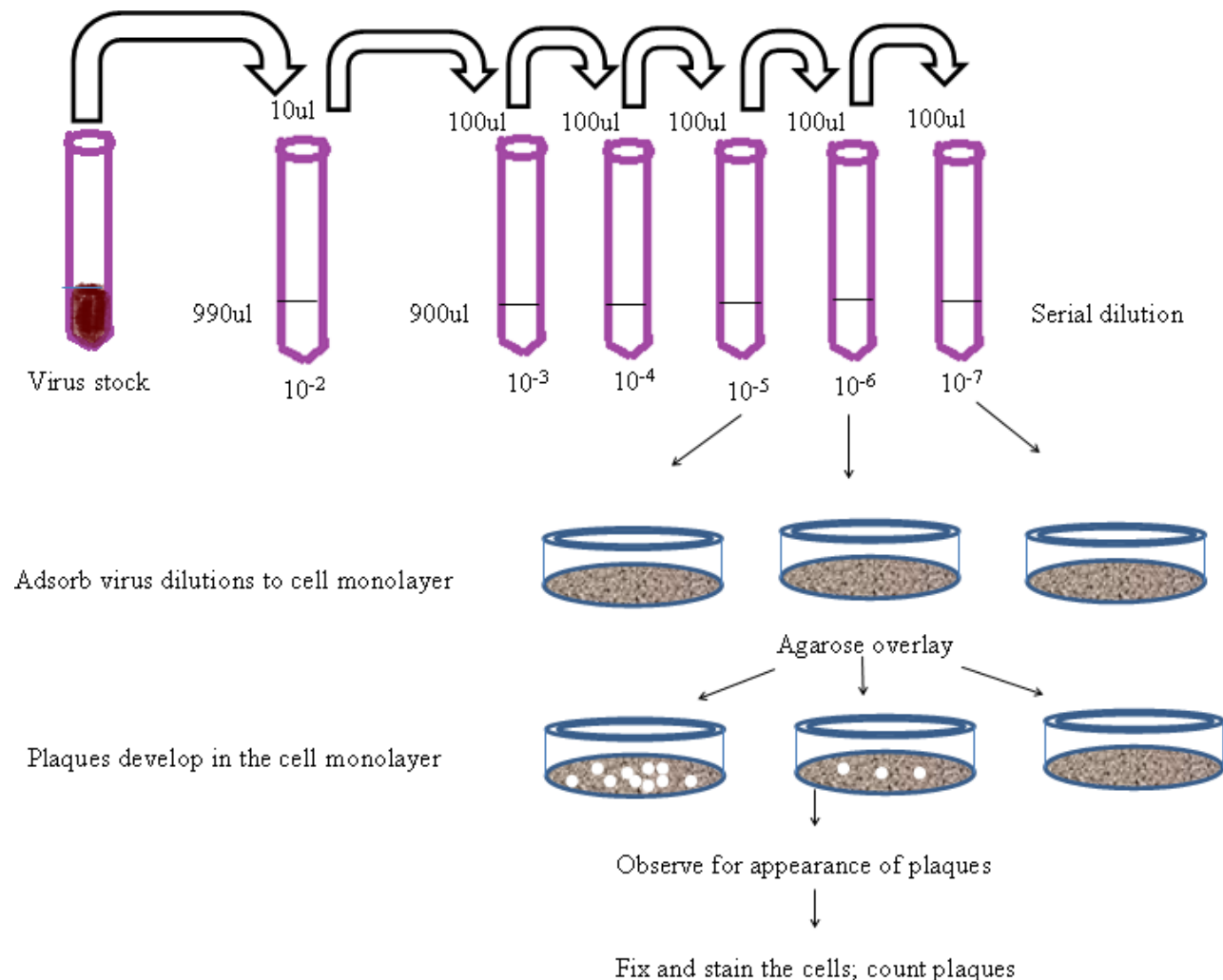
Anticuerpos y antígenos recombinantes





Prueba de Neutralización por Reducción de Placa

(Plaque reduction neutralization tests – PRNT)

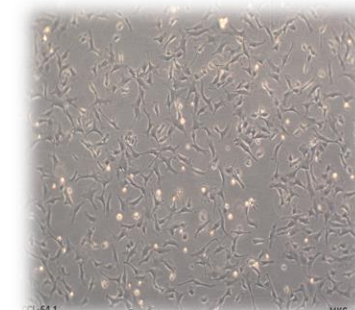


Biosafety level 3 (BSL3)

Líneas celulares que expresan de forma natural niveles elevados de ACE 2



Células del mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*) : Vero E6

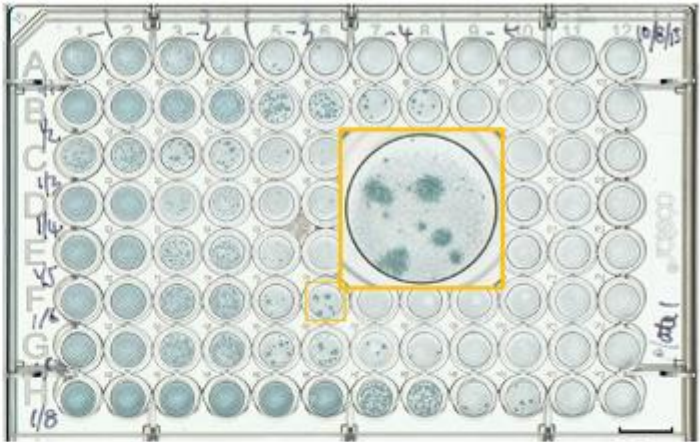


Células epiteliales renales Vero CC - 81

Prueba de Reducción de Microneutralización en Placa

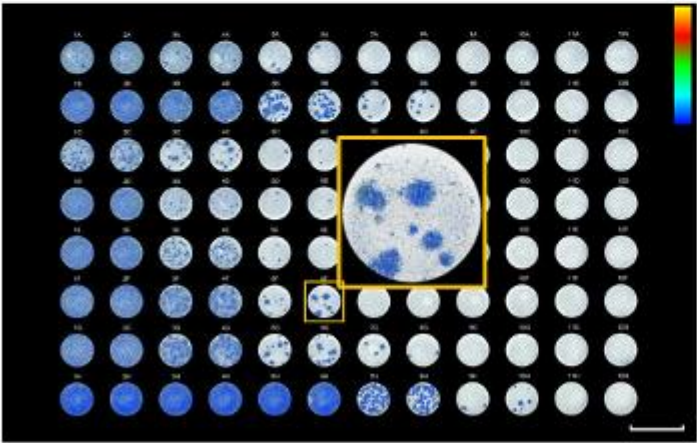
Titration plate setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus Isolation	1.0×10^1	1.0×10^2	1.0×10^3	1.0×10^4	1.0×10^5	1.0×10^6						
A					A/Cameroon/15V-3538/2015							
B					A/Vladivostok/56/2015							
C					A/Moscow/103/2015							
D					A/Toronto/5/2015							
E					A/Moscow/101/2015							
F					A/Moscow/100/2015							
G					A/Moscow/133/2015							
H					A/Iran/437/2015							

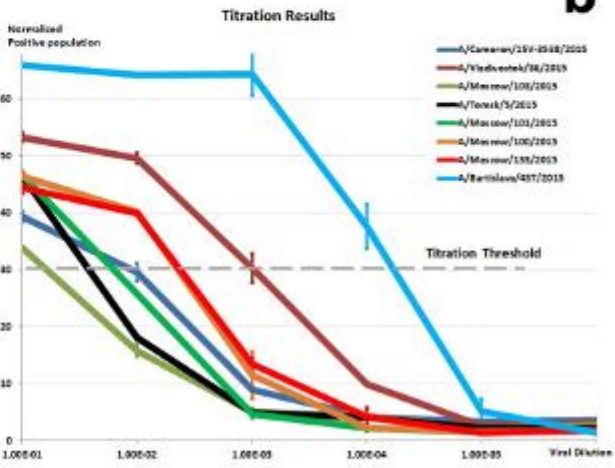


a

b



c



d

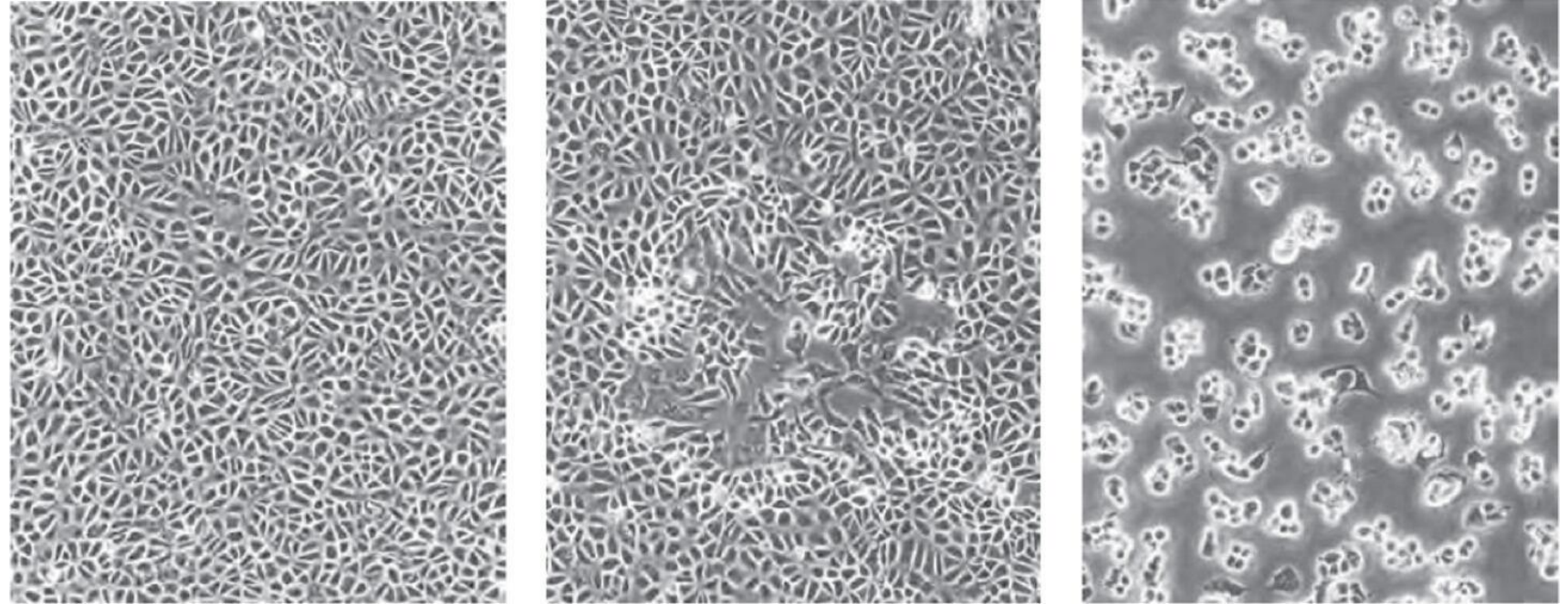
Biosafety level 3 (BSL3)



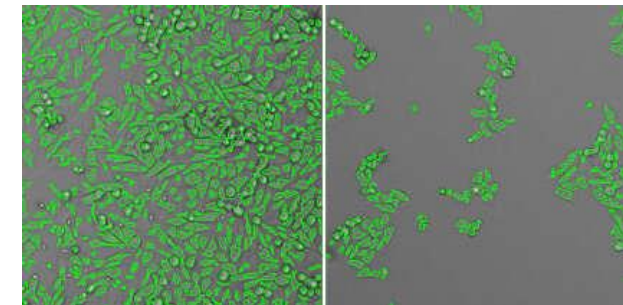
TCID₅₀ . Dosis infecciosa de cultivo de tejidos del 50%

(Median Tissue Culture Infectious Dose – TCID₅₀)

Se utiliza para cuantificar los títulos virales determinando la **concentración a la que el 50% de las células infectadas presentan efecto citopático (EC).**

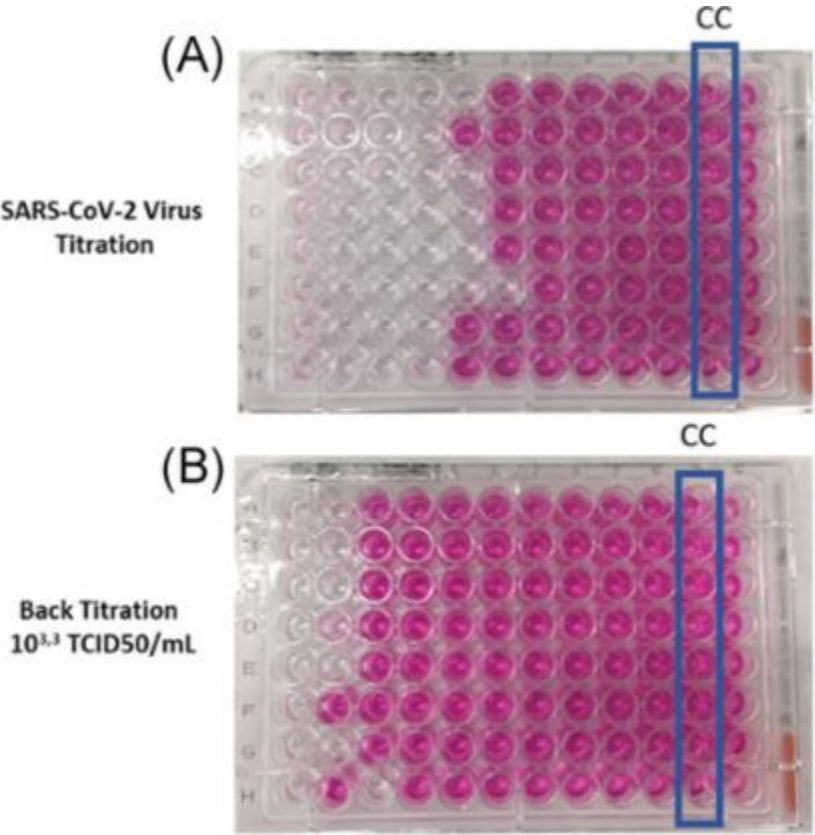


Células sanas (izquierda) y células infectadas (derecha)



La dilución única a la que el 50% de las células presentan el EC, se usa para cuantificar en promedio la cantidad de virus presente en la siembra original.

TCID₅₀
Dosis infecciosa de cultivo de tejidos del 50%
(Median Tissue Culture Infectious Dose)



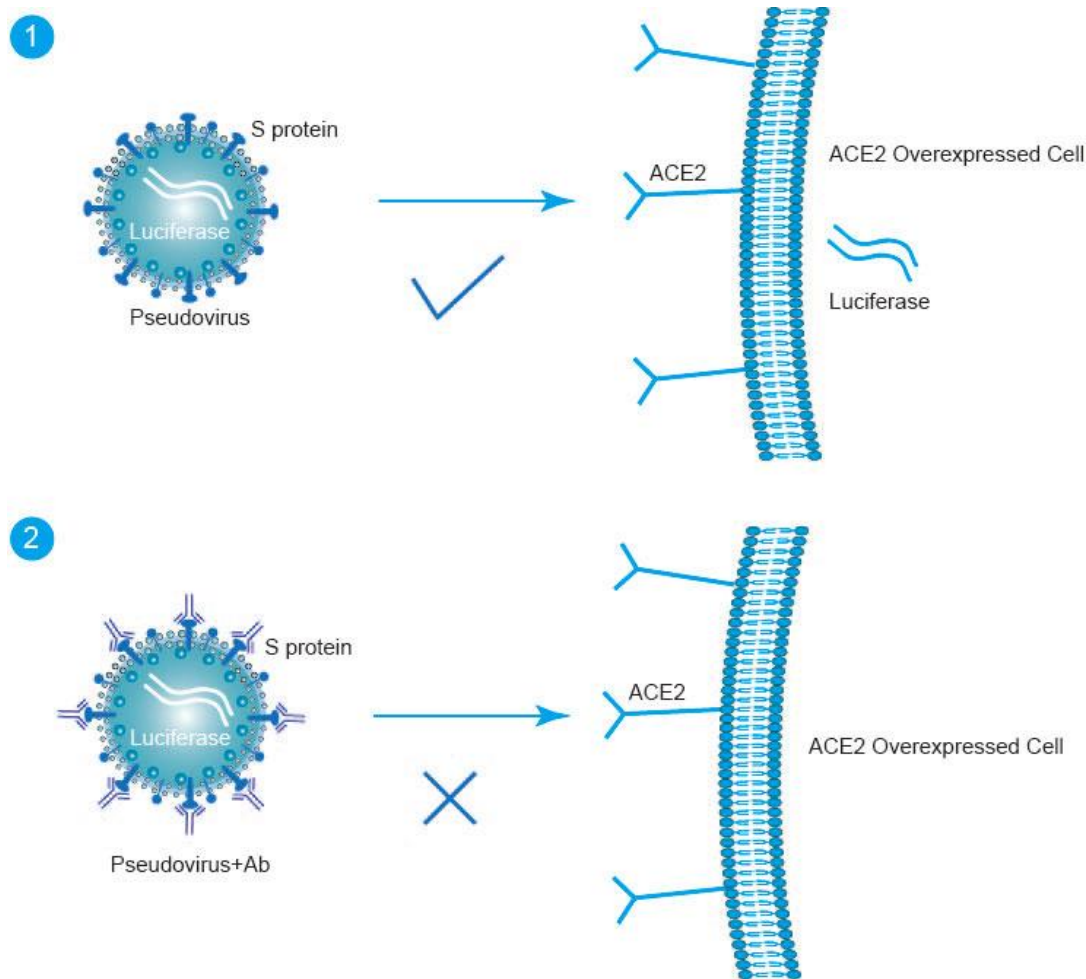
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CC	12
A	0,105	0,089	0,077	0,082	0,068	0,829	0,717	0,568	0,593	0,662	0,503	0,431
B	0,107	0,074	0,073	0,083	0,776	0,692	0,665	0,605	0,526	0,807	0,594	0,505
C	0,094	0,086	0,072	0,095	0,071	0,727	0,725	0,669	0,516	0,604	0,539	0,554
D	0,115	0,090	0,073	0,095	0,067	0,843	0,861	0,960	0,678	0,646	0,629	0,541
E	0,086	0,072	0,061	0,061	0,058	0,821	0,842	0,614	0,612	0,545	0,556	0,519
F	0,089	0,075	0,062	0,065	0,060	0,070	0,769	0,634	0,589	0,560	0,579	0,569
G	0,094	0,080	0,065	0,060	0,865	0,885	0,865	0,714	0,563	0,654	0,573	0,552
H	0,102	0,086	0,064	0,075	0,849	0,757	0,710	0,678	0,684	0,599	0,484	0,526

Cut-off	0,278
Viral Titre	10 ^{6.25} TCID ₅₀ /mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CC	12
A	0,051	0,064	0,619	0,598	0,613	0,628	0,597	0,628	0,467	0,540	0,492	0,185
B	0,055	0,057	0,865	0,988	0,773	0,701	0,758	0,647	0,625	0,715	0,568	0,513
C	0,060	0,057	1,017	0,946	0,878	0,707	0,753	0,613	0,744	0,682	0,641	0,549
D	0,053	0,197	0,897	0,897	0,812	0,650	0,698	0,640	0,621	0,663	0,618	0,521
E	0,055	0,054	0,829	0,778	0,732	0,627	0,707	0,610	0,752	0,724	0,557	0,480
F	0,059	0,927	0,965	0,876	0,839	0,695	0,650	0,642	0,609	0,746	0,582	0,554
G	0,053	0,051	0,912	0,858	0,809	0,713	0,849	0,708	0,592	0,667	0,543	0,404
H	0,055	0,913	0,067	0,840	0,680	0,590	0,654	0,592	0,606	0,507	0,488	0,224

Cut-off	0,280
Viral Titre	10 ^{3.3} TCID ₅₀ /mL

Pseudovirus (virus de la estomatitis vesicular, lentivirales) que integran la glicoproteína de la envoltura de otro virus de forma exógena, y el genoma conserva las características del virus original.

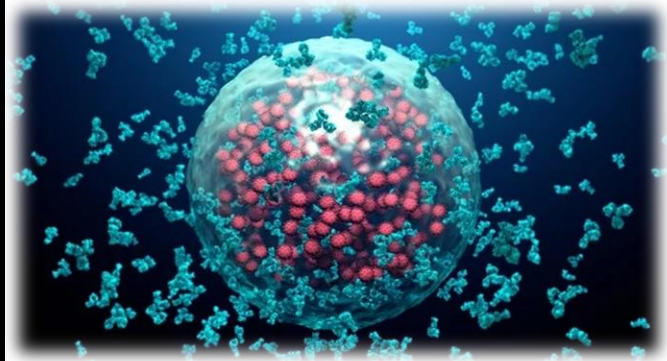
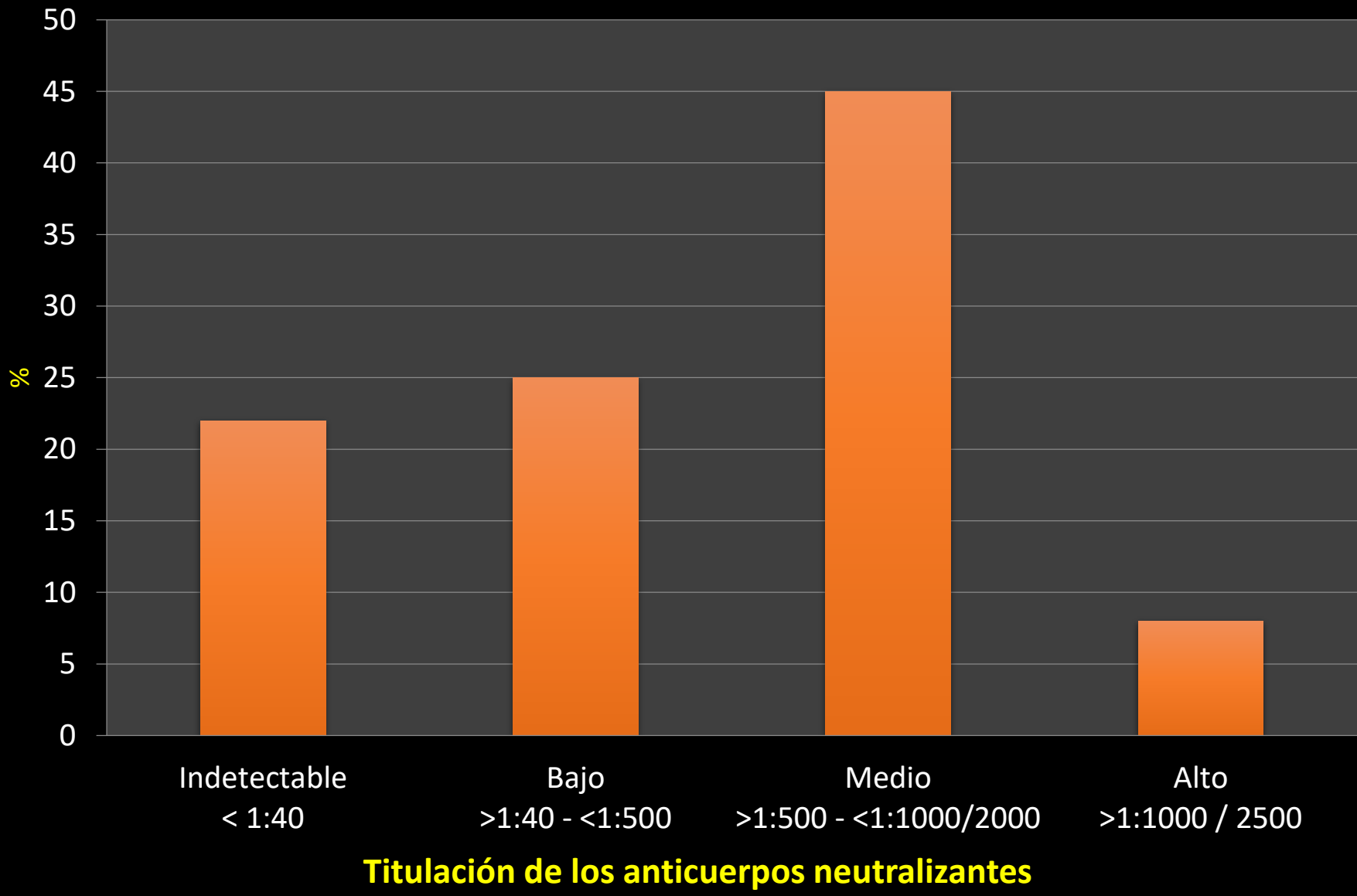


Ensayo de Neutralización de Pseudoviriones – Ps VNA

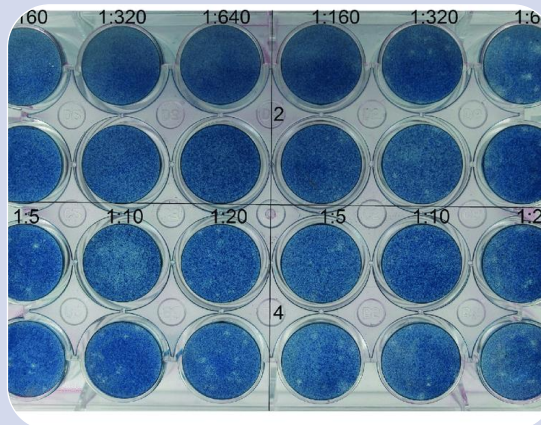
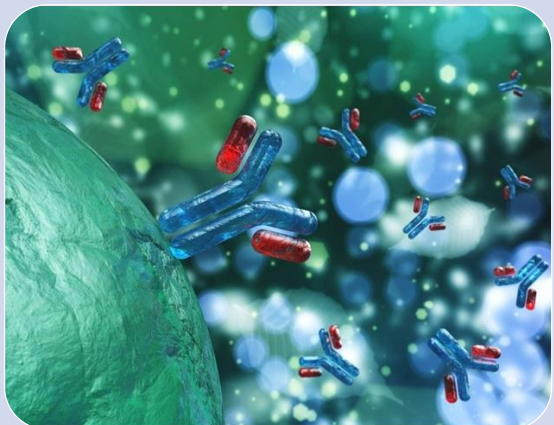


Son **virus diseñados**, genéticamente modificados que albergan un gen informador que se explota para el sistema de detección. Ejemplos incluyen luciferasas

Actividad neutralizante



Grado de neutralización	Rango de actividad	% de pacientes
Indetectable	<1:40	10-30
Bajo	>1:40 y <1:500	15-30
Medio	>1:500 y <1:1000/2000	30-50
Alto	>1:1000/2.500	2-10



No es sólo su actividad neutralizante

Contribuye a la citotoxicidad celular favoreciendo el control y curación de la COVID-19.

Metodologías

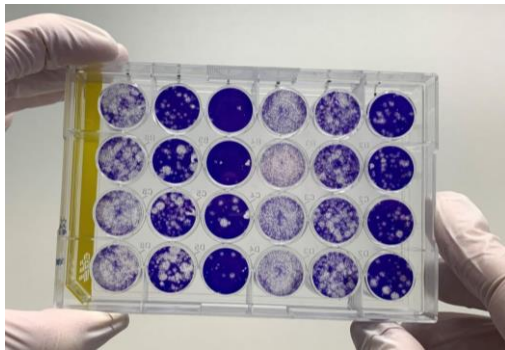
Las técnicas tienen una sensibilidad que desconocemos y deben optimizarse para aumentar su sensibilidad

Neutralización asegurada

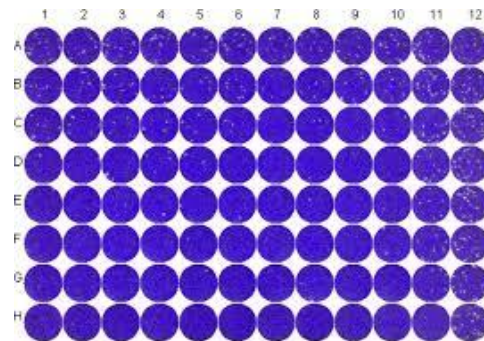
El hecho de que no se detecte su actividad neutralizante, no excluye que el paciente tenga esos anticuerpos capaces de bloquear el virus

METODOS **GOLD STANDARD** PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI SARS COV 2

Test de Reducción de Neutralización en Placa PRNT

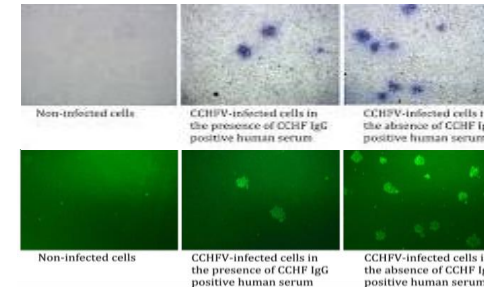


Test de Reducción de Microneutralización en Placa

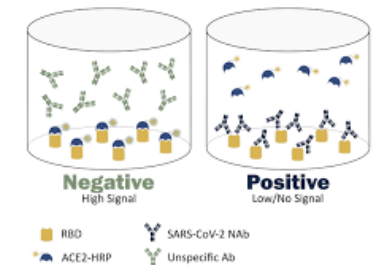


METODO **ALTERNATIVOS** PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI SARS COV 2

Test de Reducción de PseudoNeutralización en Placa



Test de Neutralización de Virus Sustituto o Subrogado

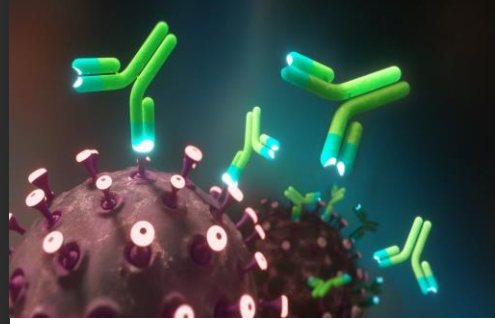


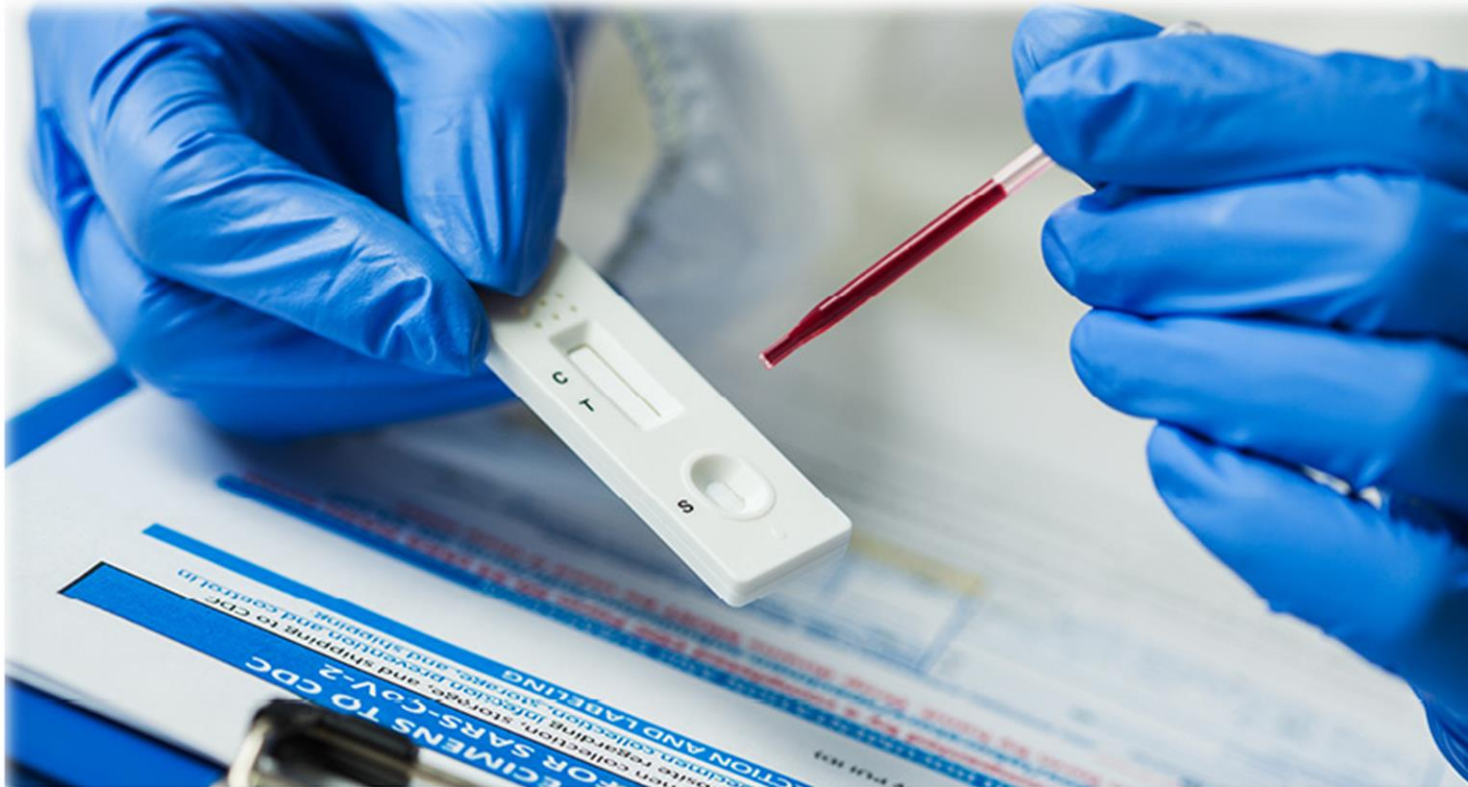
Para considerar diseños de métodos de inmunoensayo, para determinar IgG (anticuerpos neutralizantes) contra el SARS-CoV-2

Inmunoensayos (EIA-CLIA)
validados contra Gold
Estándar

Número de muestras (n)
utilizada en la validación

Sensibilidad





Variantes, vacunas y lo que significan para las pruebas de COVID-19

Ahora, las variantes emergentes del SARS-CoV-2 y las campañas de vacunación contra COVID-19 *han aumentado la complejidad de las pruebas de COVID-19.*

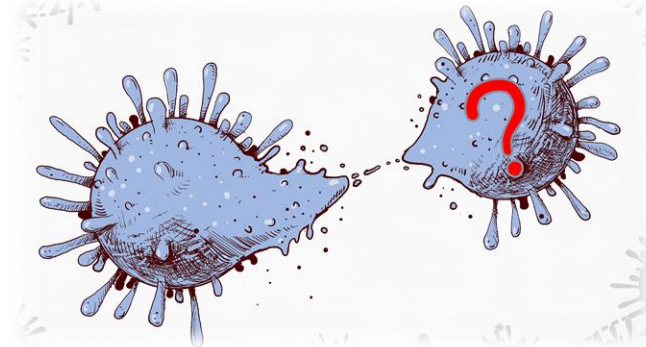
Muchos se preguntan si las pruebas *diagnosticarán con precisión la infección* con una cepa variante del SARS-CoV-2 y si la vacunación dará lugar a *resultados inexactos con una prueba de diagnóstico o serológica.*

La buena noticia es que la mayoría de las pruebas de diagnóstico que se utilizan actualmente **seguirán siendo precisas** con las cepas variantes y la vacunación **no debería interferir** con las pruebas de diagnóstico o de anticuerpos



COVID-19

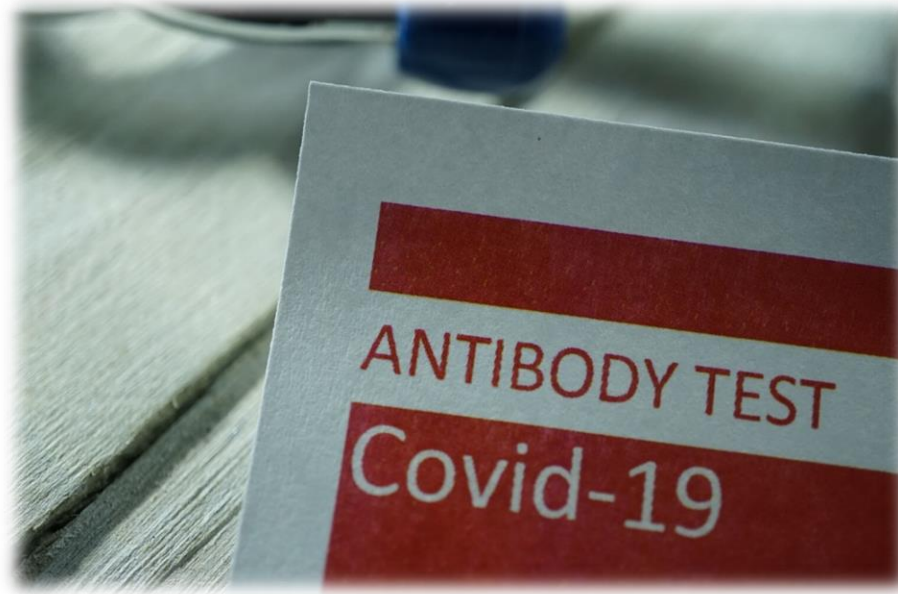
CORONAVIRUS TESTING



¿Qué tal una prueba de anticuerpos para determinar si la vacuna fue efectiva?

El CDC de los EE.UU. desaconseja las pruebas de anticuerpos para evaluar la inmunidad después de recibir la vacuna.

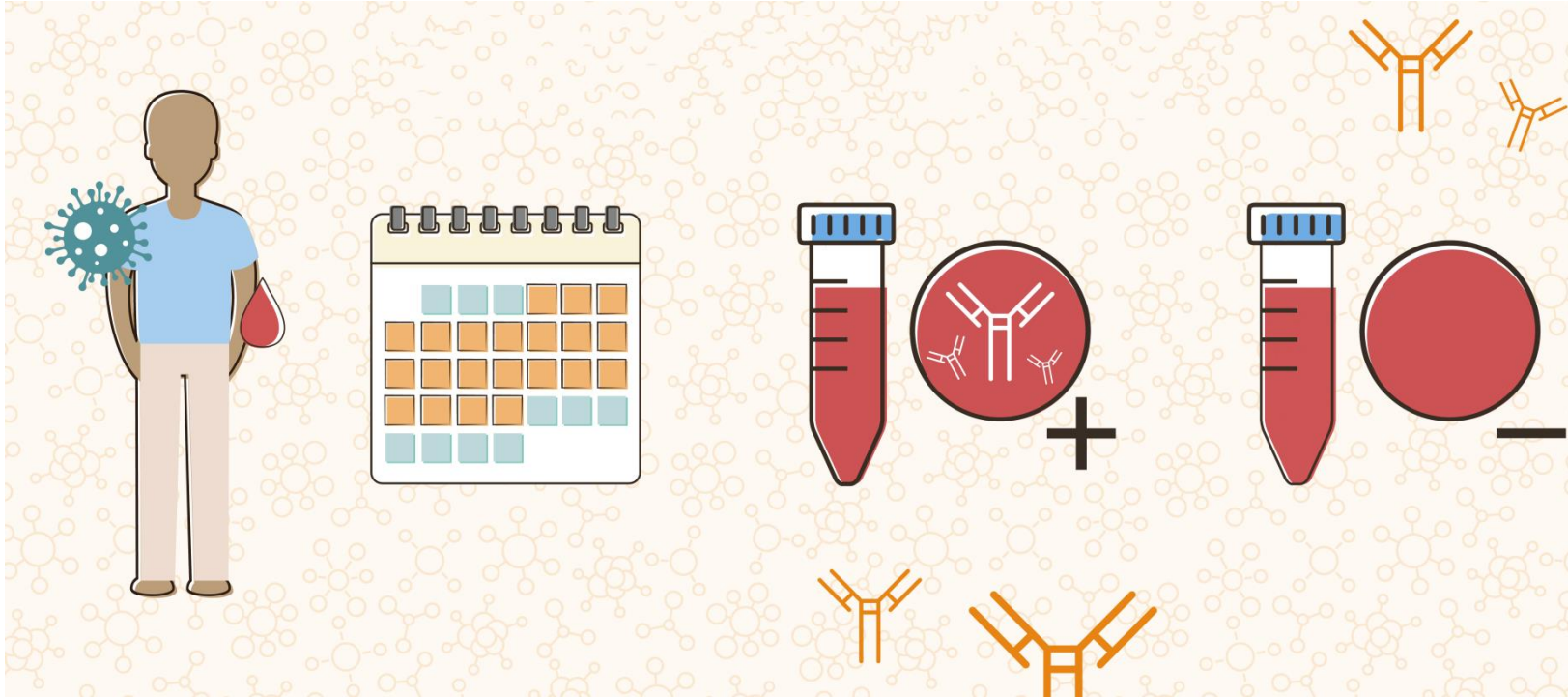
No significa que todos los que reciben la vacuna darán positivo en la prueba de anticuerpos



Robert L. Murphy, MD
Professor of Medicine (Infectious Diseases)
and McCormick School of Engineering

Es posible que las **pruebas de anticuerpos comerciales no busquen los mismos anticuerpos que activa la vacuna.** Alguien que haya recibido la vacuna y sea inmune al virus aún puede dar negativo en la prueba de ciertos anticuerpos.

¿Qué tal una prueba de anticuerpos para determinar si la vacuna fue efectiva?

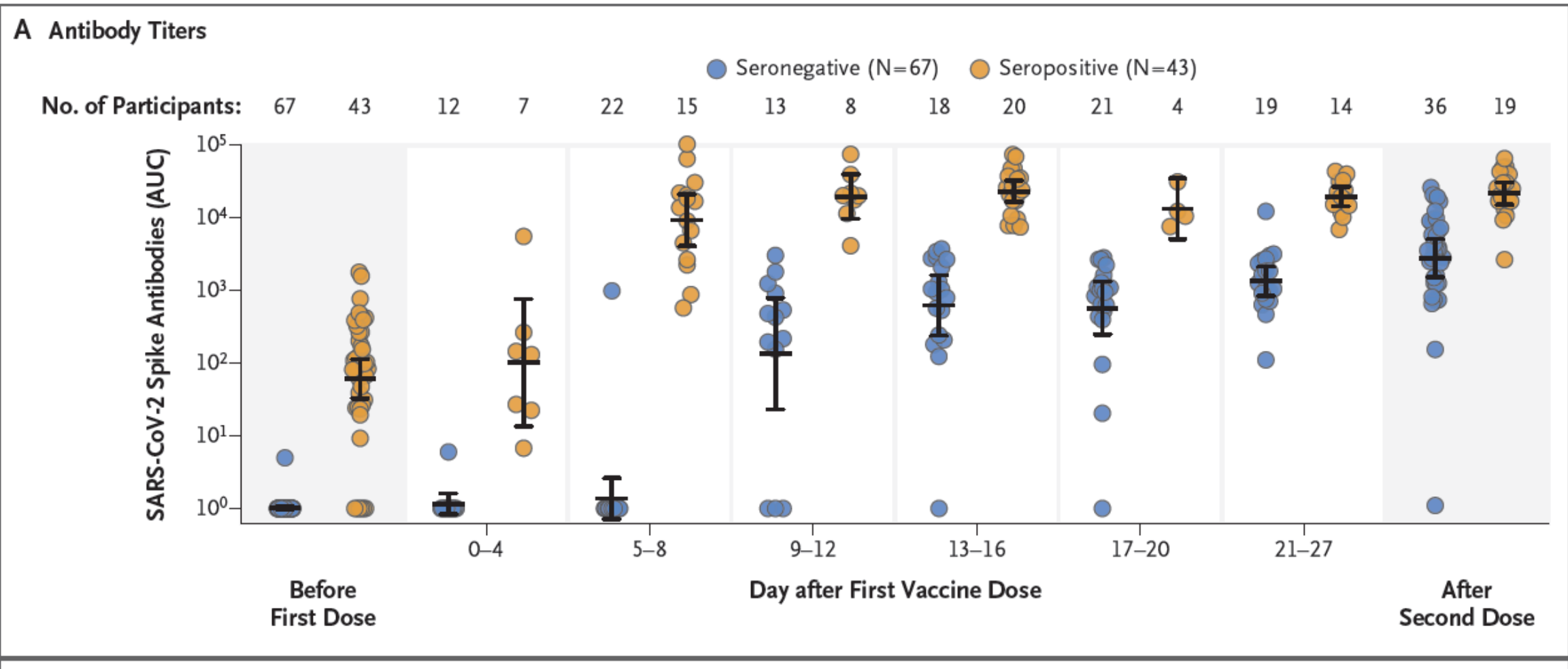


"Muchas personas darán negativo en la prueba de anticuerpos, y eso no significa que la vacuna no haya funcionado".



Robert L. Murphy, MD
Professor of Medicine (Infectious Diseases)
and McCormick School of Engineering

Respuestas de anticuerpos en personas seropositivas después de una dosis única de la vacuna de ARNm del SARS-CoV-2

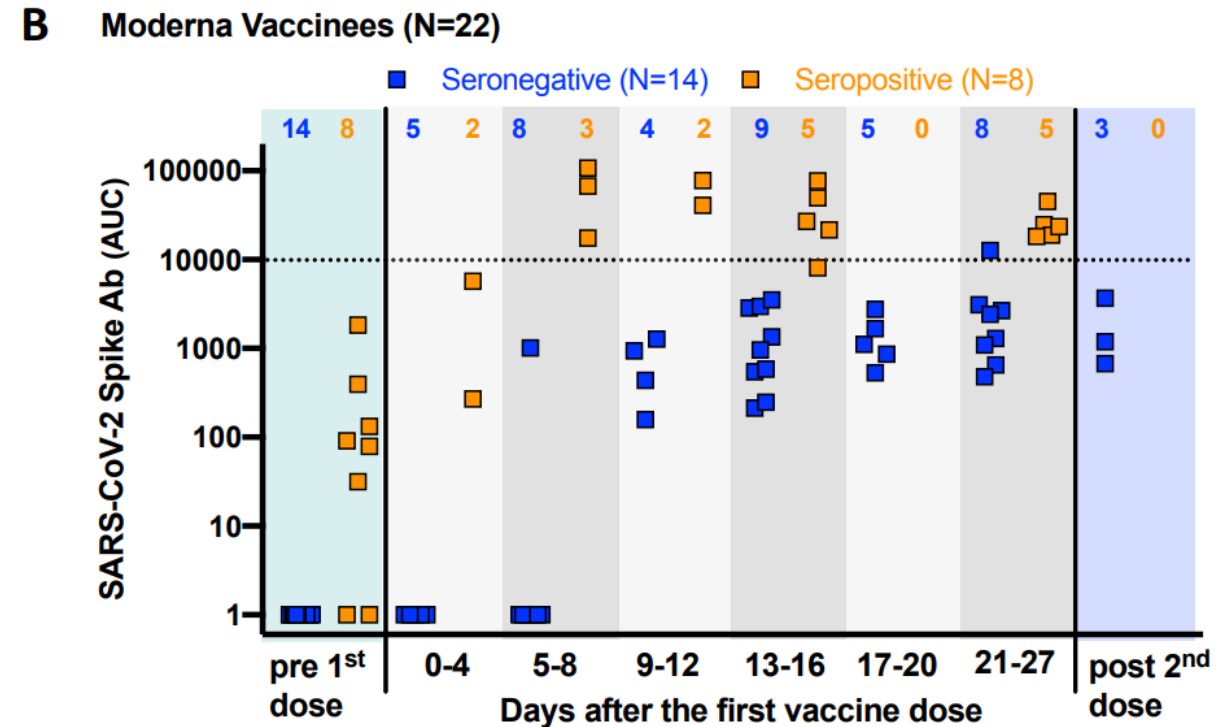
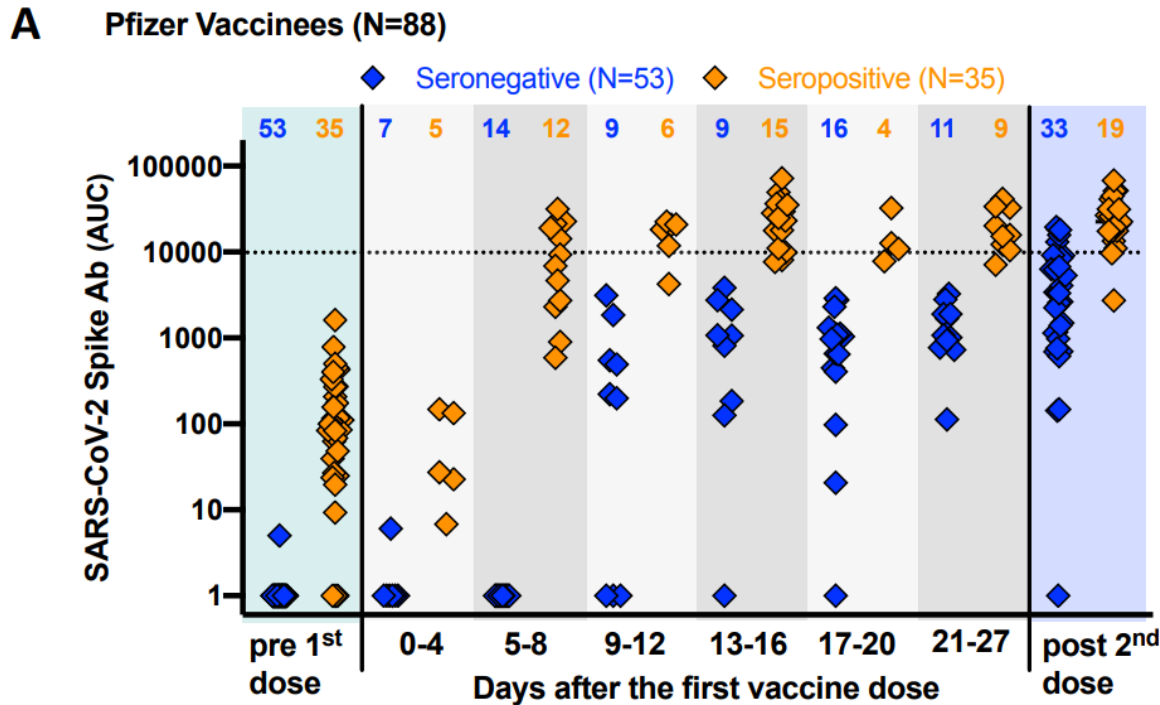


¿Cuál sería la respuesta a la primera dosis de vacuna en personas con Covid-19 previo?

10 de marzo de 2021

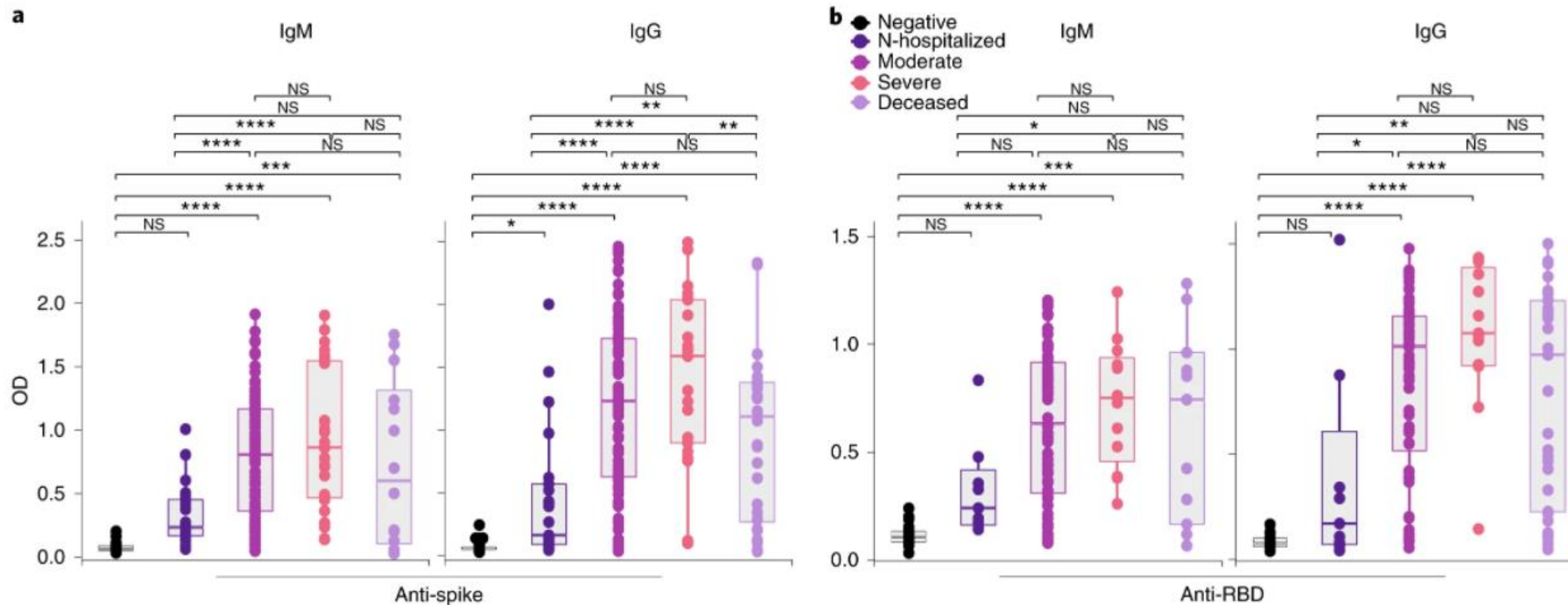
Krammer F, et al. Antibody responses in seropositive persons after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *N Engl J Med*. DOI: 10.1056/NEJMc2101667

Respuestas de anticuerpos en personas seropositivas después de una dosis única de la vacuna de ARNm del SARS-CoV-2



Los títulos de anticuerpos de los vacunados con inmunidad preexistente fueron de **10 a 45 veces más altos que los de los vacunados sin inmunidad** preexistente en los mismos puntos de tiempo después de la primera dosis de vacuna.

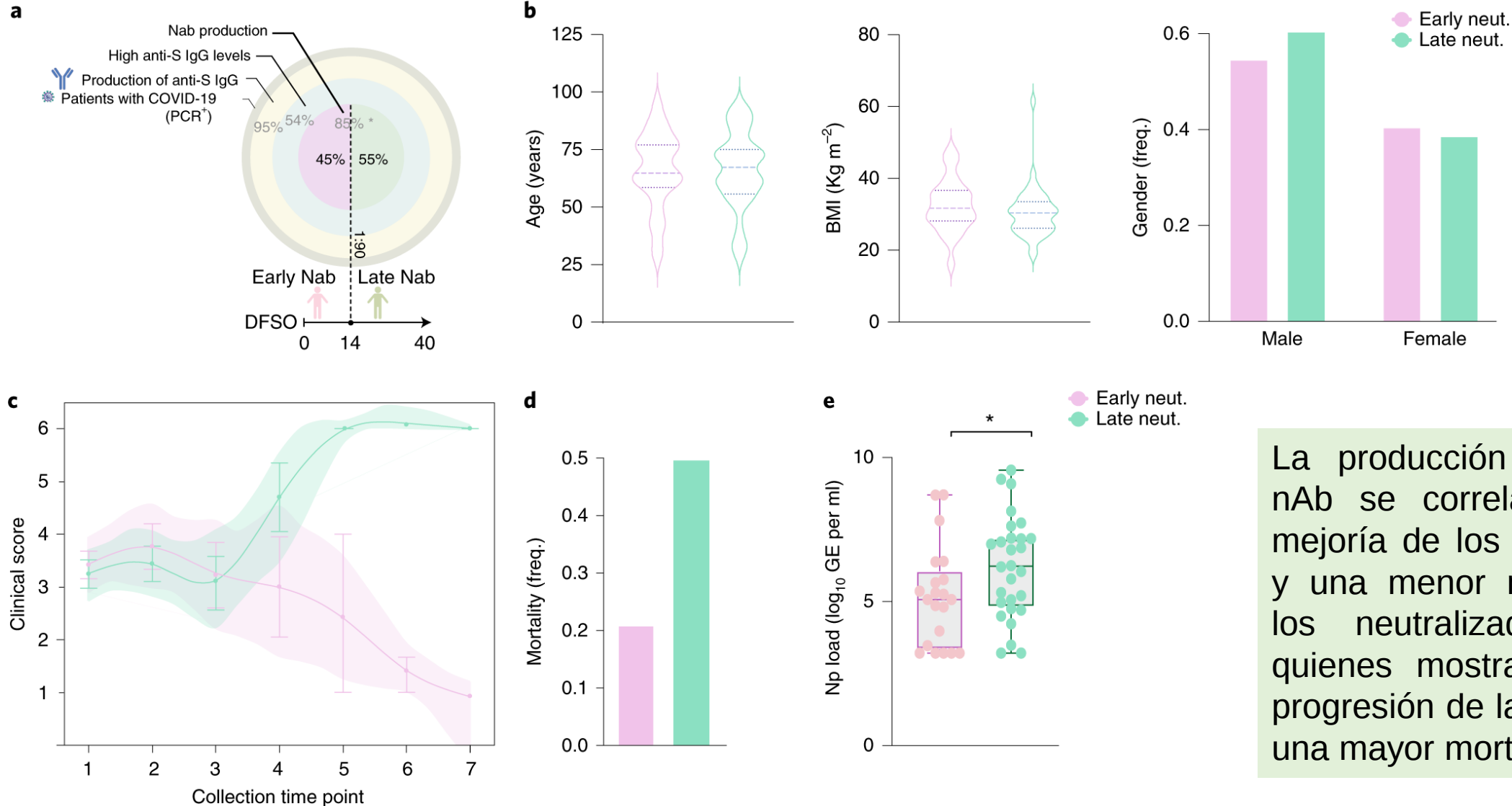
La producción retardada de anticuerpos neutralizantes se correlaciona con el COVID-19 grave



La gravedad de COVID-19 se correlaciona con los anticuerpos anti-S

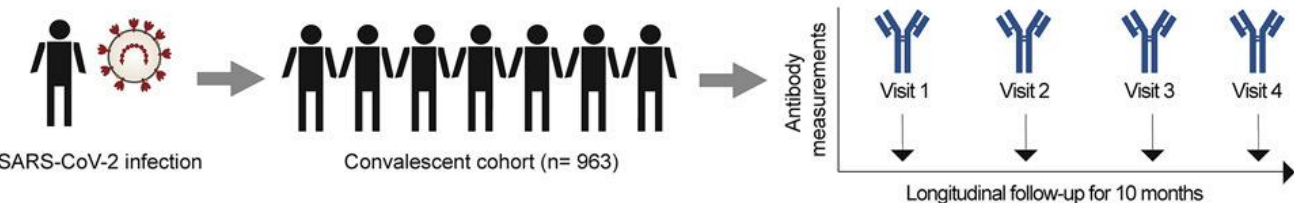
El estudio demuestra que la mortalidad se correlaciona, con la cinética retardada de la producción de nAb. Aunque los sueros del 85% de los pacientes mostraron cierta capacidad de neutralización, la generación de nAb antes de los 14 días del inicio de la enfermedad surgió como un factor clave para la recuperación

Los anticuerpos neutralizantes tempranos se correlacionan con una mejor evolución clínica del COVID-19.

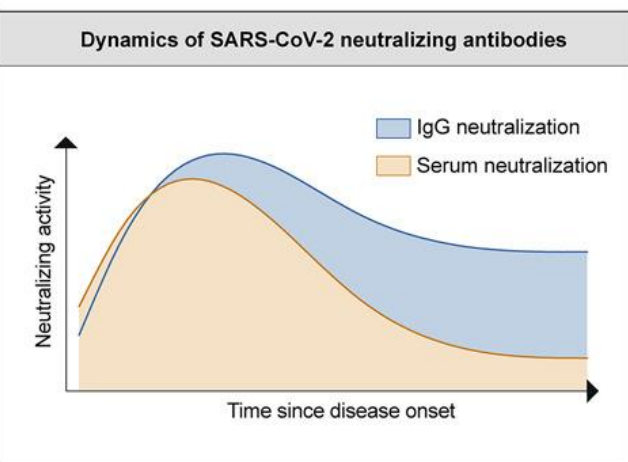
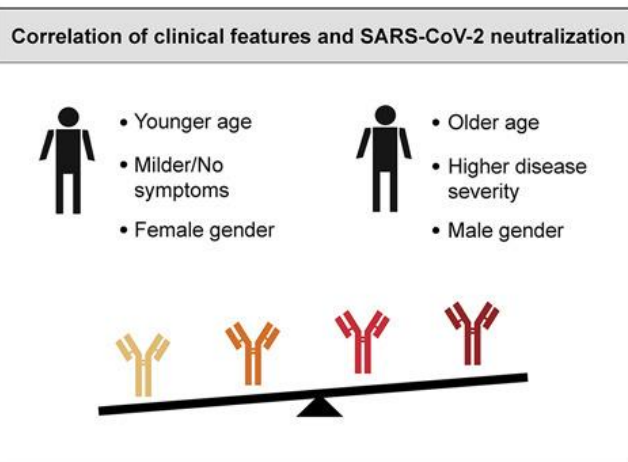
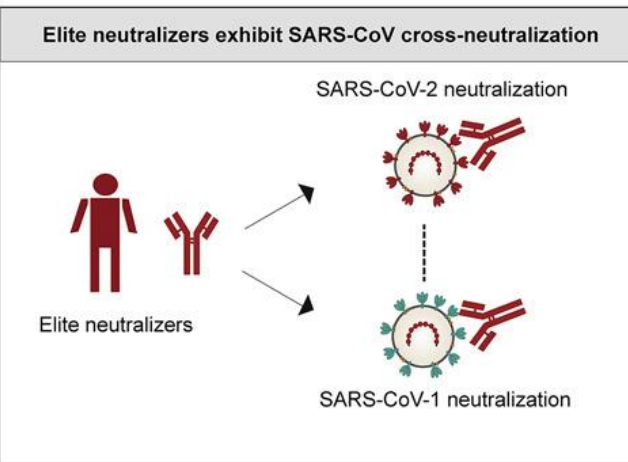
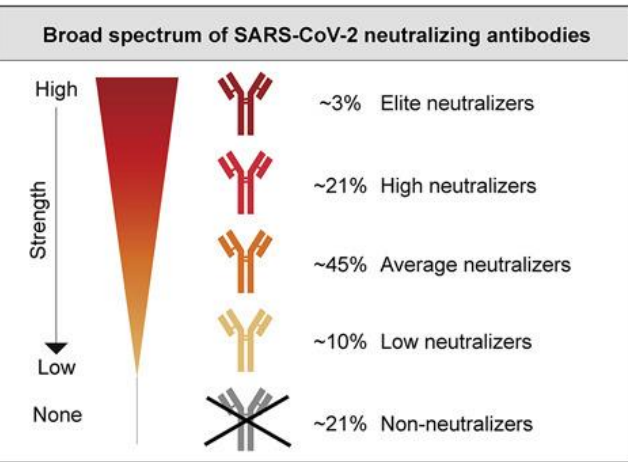


La producción temprana de nAb se correlacionó con la mejoría de los signos clínicos y una menor mortalidad que los neutralizadores tardíos, quienes mostraron una peor progresión de la enfermedad y una mayor mortalidad.

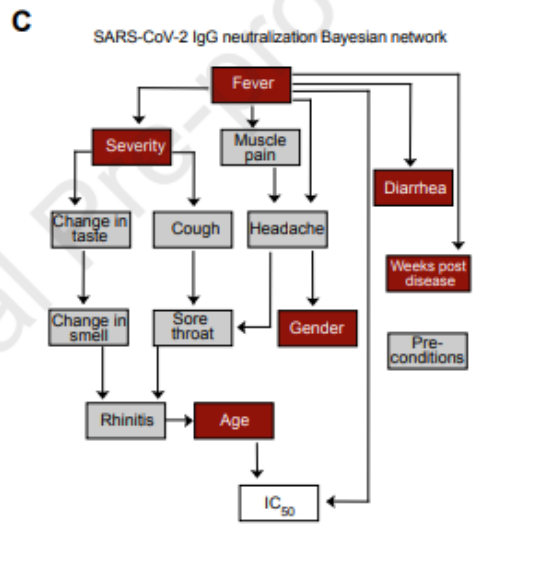
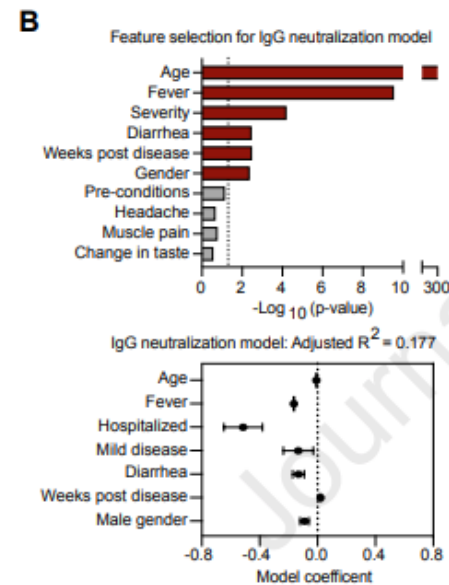
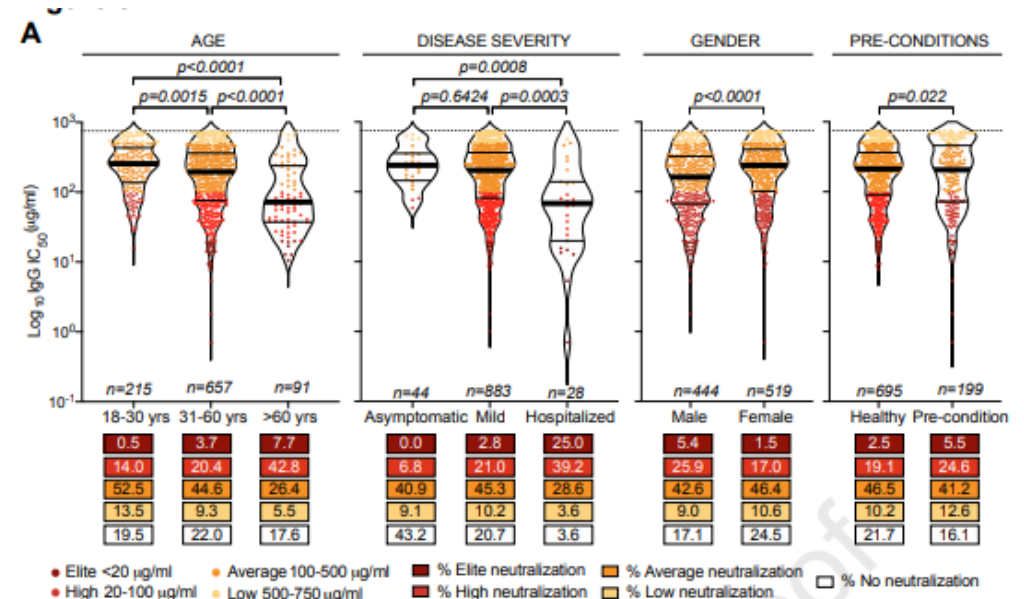
1. STUDY DESIGN



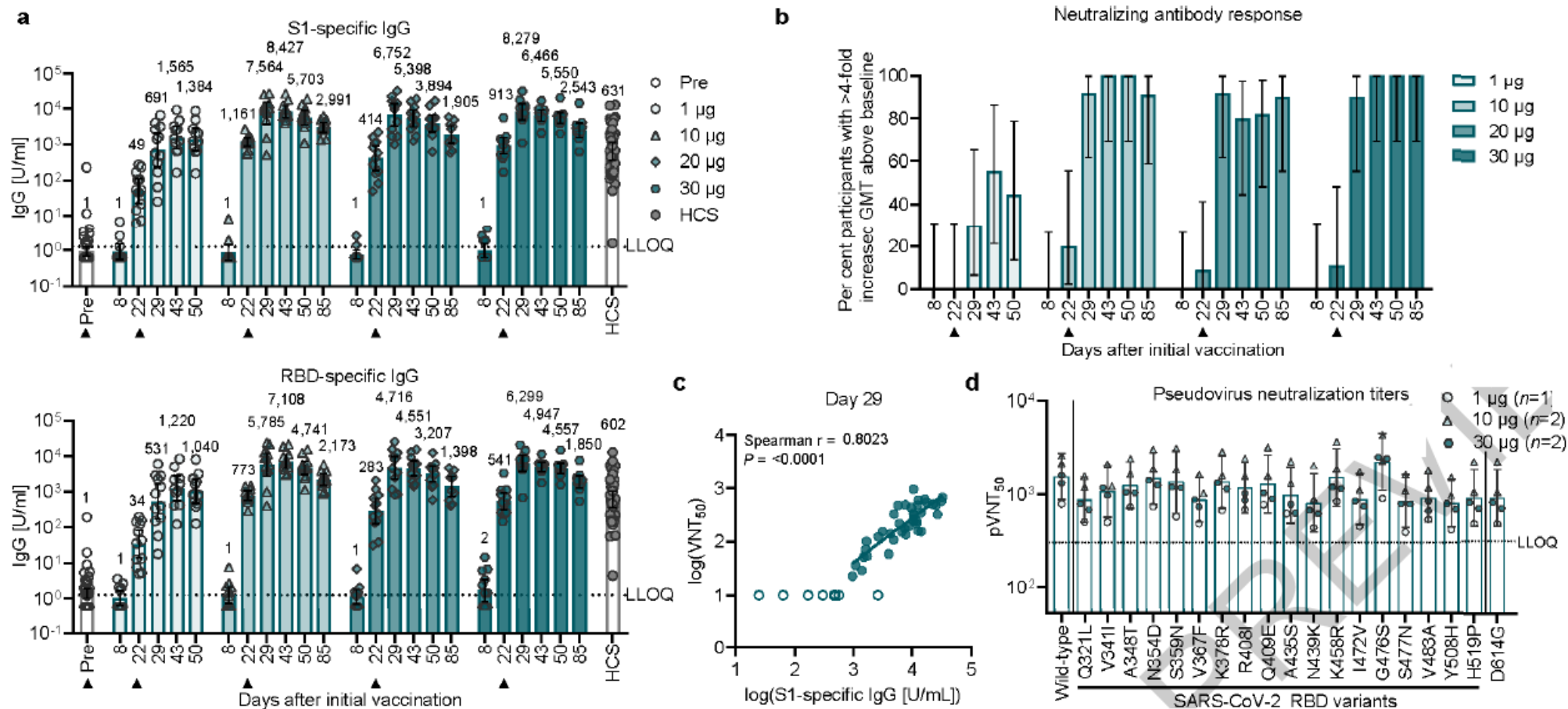
2. STUDY FINDINGS



Pseudovirus assay



La vacuna BNT162b2 induce anticuerpos neutralizantes y células T poli-específicas en humanos



Esta vacuna produce fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes, con títulos hasta **3,3 veces superiores** a los observados en muestras convalecientes por infecciones naturales, una semana después del refuerzo.

Dado el aumento de estas variantes virales, considerar 5 recomendaciones:

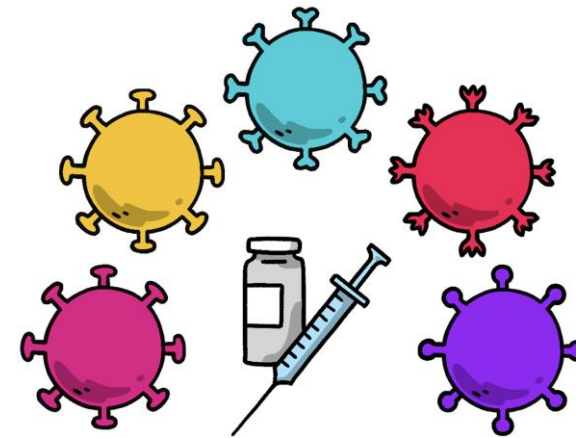
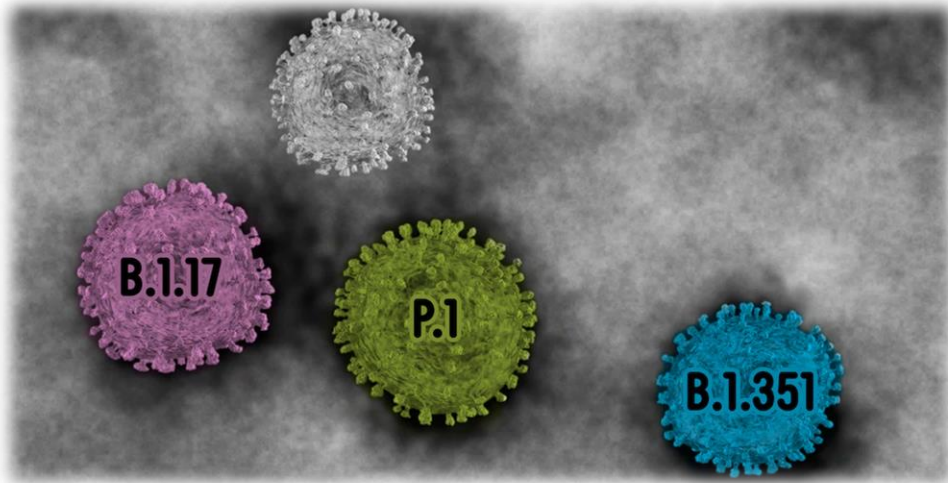
Virus SARS-CoV-2 de personas vacunadas (2 dosis) ingresadas por COVID-19, **deben aislarse y caracterizarse**

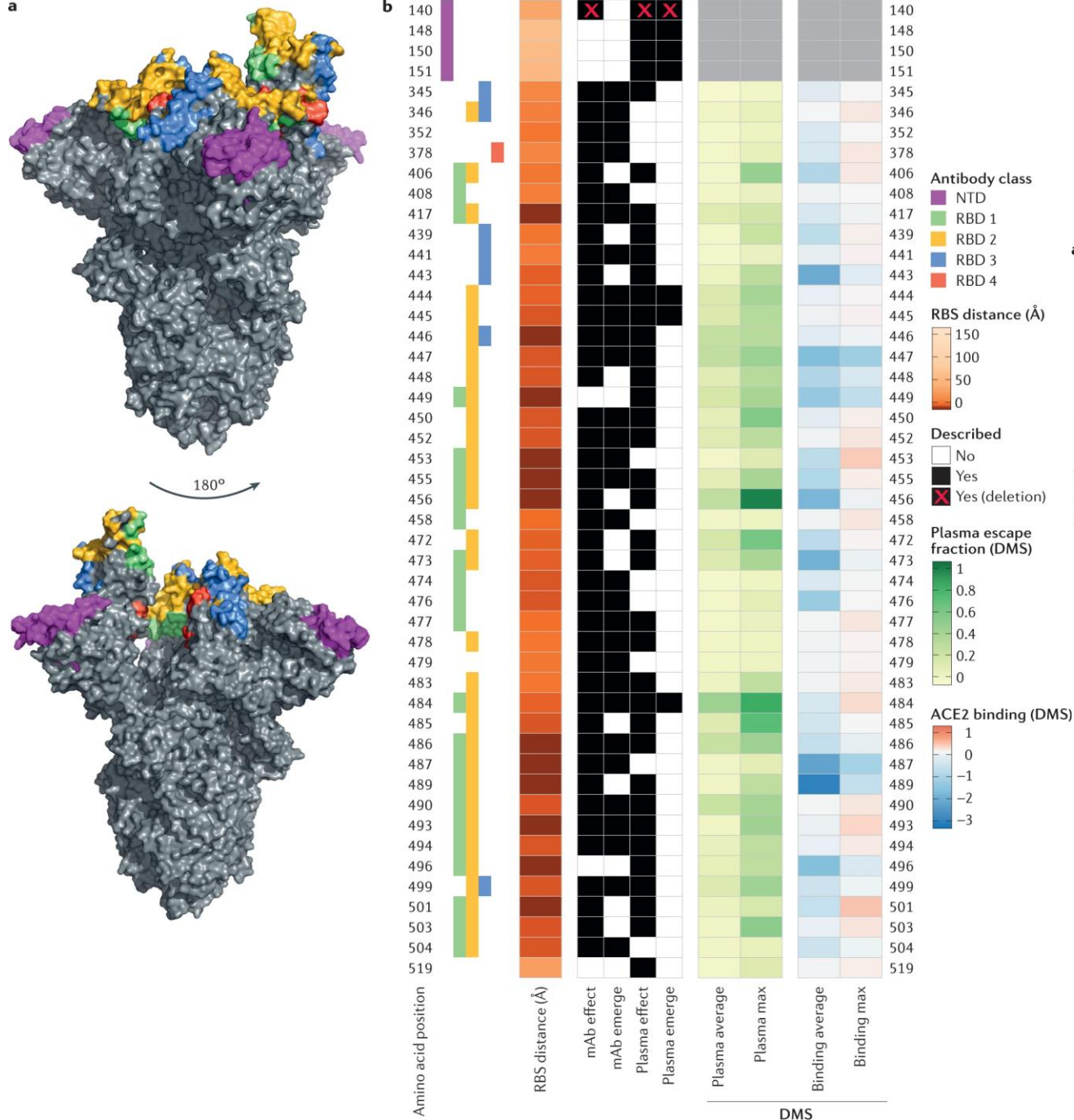
Crear y mantener un **sistema activo de secuenciación y vigilancia** para identificar estas variantes rápidamente una vez que surjan

Crear un **banco de muestras** de suero de personas que hayan sido inmunizadas con vacunas contra el SARS-CoV-2

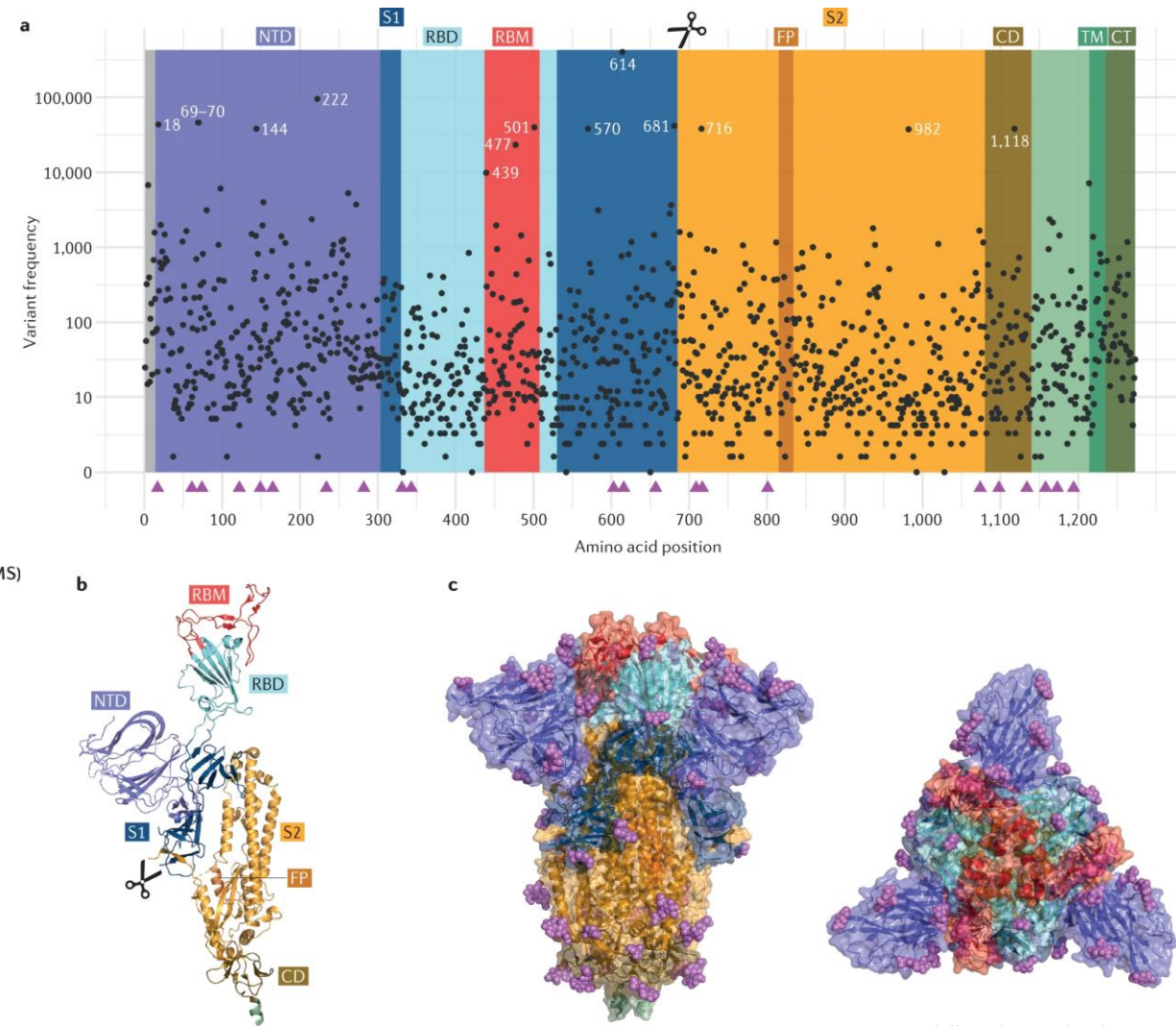
Es esencial **reducir la propagación global de nuevas variantes**, particularmente N501Y.V2 y su variante brasileña P1

Vacuna ARNm y con vectores, **pueden ajustarse para adaptarse a los cambios**, presentes en las nuevas variantes



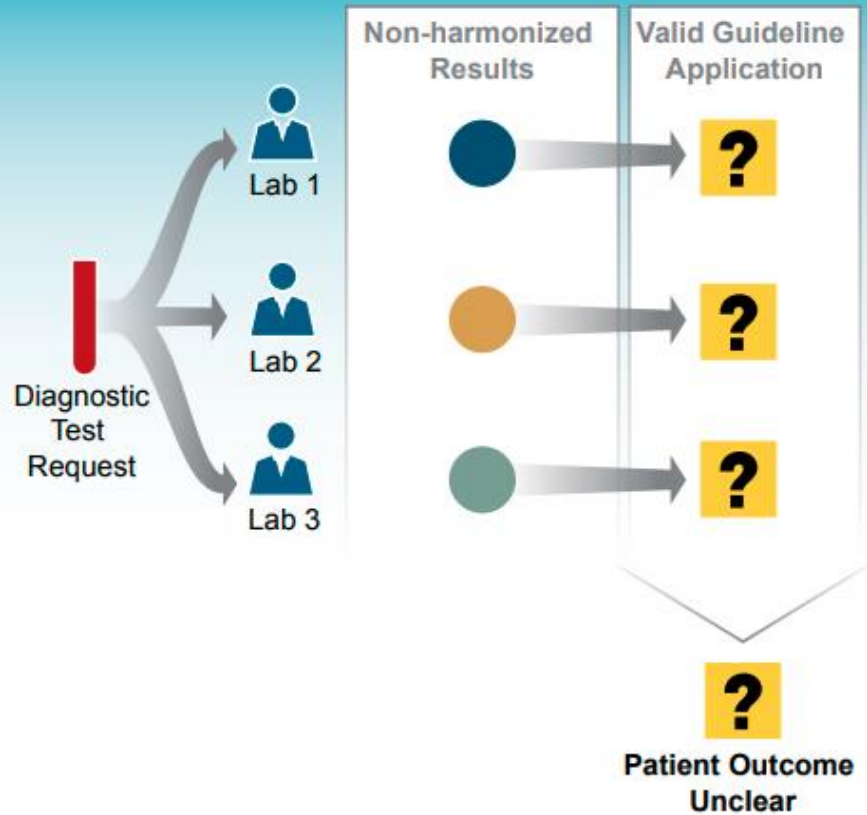


Los residuos de aminoácidos de la proteína S, se colorean de acuerdo con la clase de anticuerpo que se une a un epítipo.

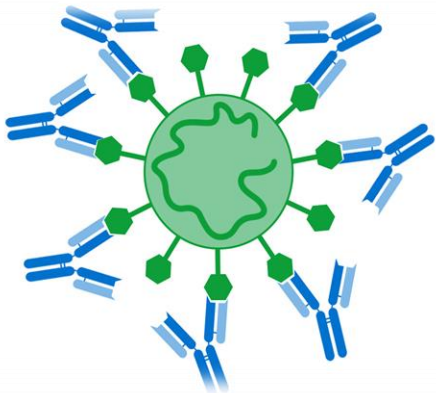
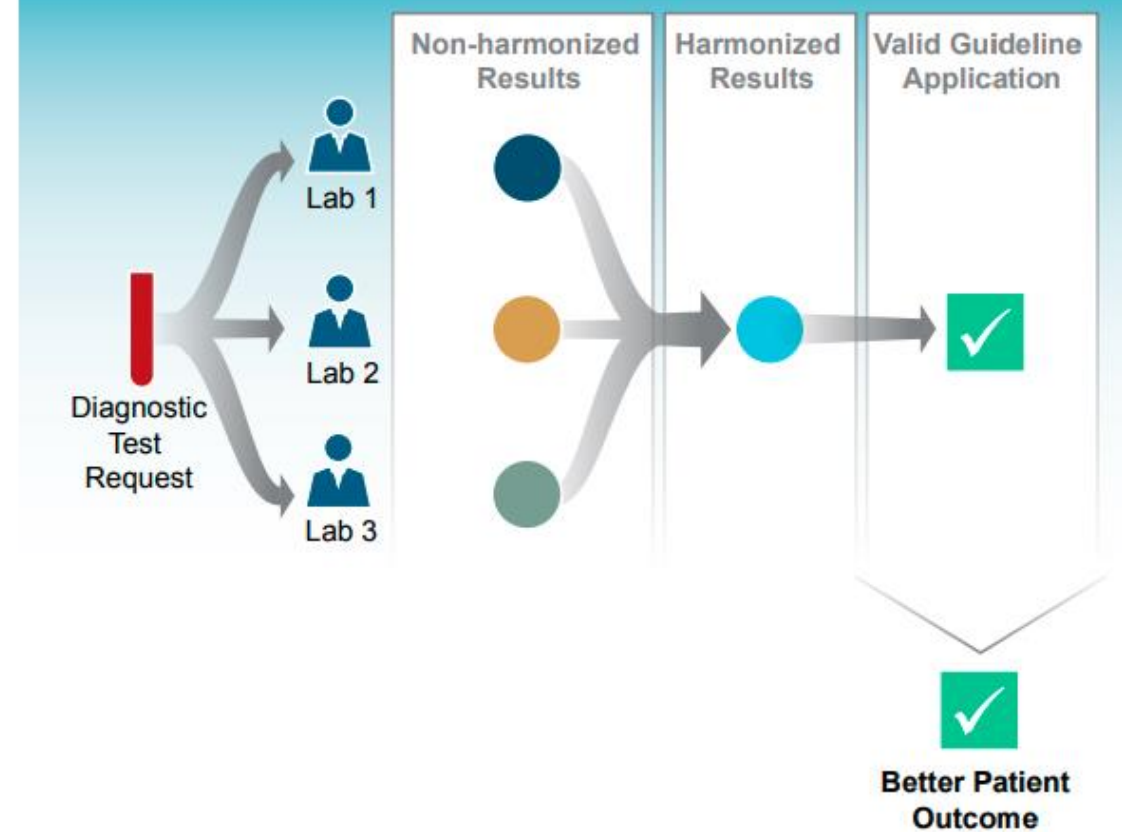


Publicado 01 junio 2021

Non-harmonized laboratory testing



Harmonized laboratory testing



¿Las pruebas de laboratorio que determinan los *anticuerpos neutralizantes* por Inmunoensayo, están *armonizadas*?



World Health Organization

Medicines & Healthcare products
Regulatory Agency



First WHO International Standard
Immunoglobulin (human)
NIBSC code: 20/136
Instructions for use
(Version 2.0, Dated 17/12/2020)

1. INTENDED USE

The First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin is the freeze-dried equivalent of 0.25 mL of pooled plasma obtained from eleven individuals recovered from SARS-CoV-2 infection. The preparation has been evaluated in a WHO International Collaborative study (1). The intended use of the International Standard is for the calibration and harmonisation of serological assays detecting anti-SARS-CoV-2 neutralising antibodies. The preparation can also be used as an internal reference reagent for the harmonisation of binding antibody assays. The preparation has been solvent-detergent treated to minimise the risk of the presence of enveloped viruses (2).

2. CAUTION

This preparation is not for administration to humans or animals in the human food chain.

The preparation contains material of human origin, and either the final product or the source materials, from which it is derived, have been tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and HCV RNA. As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

3. UNITAGE

The assigned potency of the WHO International Standard for SARS-CoV-2 is 250 IU/ampoule for neutralising antibody activity. After reconstitution in 0.25 mL of distilled water, the final concentration of the preparation is 1000 IU/mL. For binding antibody assays, an arbitrary unitage of 1000 binding antibody units (BAU)/mL can be used to assist the comparison of assays detecting the same class of immunoglobulins with the same specificity (e.g. anti-RBD IgG, anti-N IgM, etc.).

4. CONTENTS

Country of origin of biological material: United Kingdom.
Each ampoule contains the freeze-dried equivalent of 0.25 mL pooled human plasma.

5. STORAGE

The International Standard 20/136 should be stored at -20°C or below upon receipt.
Please note: because of the inherent stability of lyophilized material, NIBSC may ship these materials at ambient temperature.

6. DIRECTIONS FOR OPENING

DIN ampoules have an 'easy-open' coloured stress point, where the narrow ampoule stem joins the wider ampoule body. Various types of ampoule breaker are available commercially. To open the ampoule, tap the ampoule gently to collect material at the bottom (labelled) end and follow manufacturers instructions provided with the ampoule breaker.

7. USE OF MATERIAL

No attempt should be made to weigh out any portion of the freeze-dried material prior to reconstitution.

This material should be reconstituted in 0.25 mL sterile distilled water. Following addition of water, the ampoule may be left at ambient temperature for approximately 30 minutes until dissolved and then mixed thoroughly, avoiding the generation of excessive foam.

8. STABILITY

Reference materials are held at NIBSC within assured, temperature-controlled storage facilities. Reference Materials should be stored on receipt as indicated on the label.

NIBSC follows the policy of WHO with respect to its reference materials.

9. REFERENCES

(1) Manzillo et al. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. 2020, WHO Expert Committee on Biological Standardization, WHO/BS/2020.3403
(2) Dichtelmüller et al. Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. Transfusion. 2009;49:1931-43.

10. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to wholeheartedly thank the anonymous donors of the plasma samples for their consent which has allowed this material to be prepared; we would like to express our gratitude to those groups and individuals who have coordinated the collection of the convalescent plasma: Malcolm Simple (University of Liverpool, UK), Lance Turtle (University of Liverpool, UK), Peter Openshaw (Imperial College London, UK) and Kenneth Ballie (University of Edinburgh) on behalf of the ISARIC4C Investigators; Hei Hanva Simmonds and David Roberts (National Health Service Blood and Transplant, UK). We would also like to thank NIBSC Standards Production and Development staff for the formulation and distribution of materials. The International Standard for SARS-CoV-2 antibody wouldn't have been possible without the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI) sponsored the sourcing and formulation of the candidate material.

11. FURTHER INFORMATION

Further information can be obtained as follows:
This material: enquiries@nibsc.org
WHO Biological Standards:
<http://www.who.int/biologicals/en/>
JCTLM Higher order reference materials:
<http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
Derivation of International Units:
http://www.nibsc.org/standardisation/international_standards.aspx
Ordering standards from NIBSC:
<http://www.nibsc.org/products/ordering.aspx>
NIBSC Terms & Conditions:
http://www.nibsc.org/terms_and_conditions.aspx

12. CUSTOMER FEEDBACK

Customers are encouraged to provide feedback on the suitability or use of the material provided or other aspects of our service. Please send any comments to enquiries@nibsc.org

13. CITATION

In all publications, including data sheets, in which this material is referenced, it is important that the preparation's title, its status, the NIBSC code number, and the name and address of NIBSC are cited and cited correctly.

14. MATERIAL SAFETY SHEET

WHO International Standard First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)

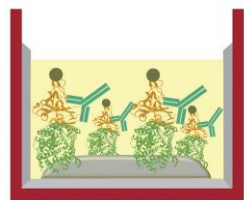
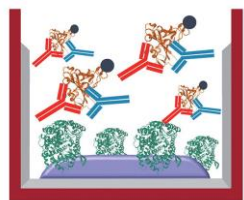


Plasma combinado
obtenido de personas
recuperadas de la
infección por SARS-
CoV-2

Recomendado para
la calibración y
armonización de
ensayos serológicos
que detectan
anticuerpos
neutralizantes anti-
SARS-CoV-2

también se puede
utilizar como
referencia para la
armonización de los
ensayos de
anticuerpos de unión

BAU/mL



ELISA



RESULTADOS

NEGATIVO
POSITIVO

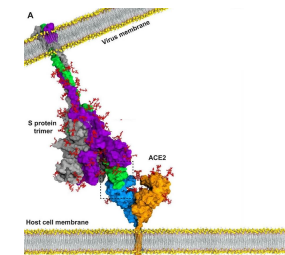
(cualitativos)

UNIDADES

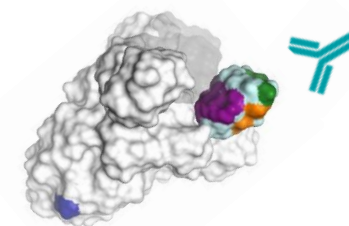
%

DISEÑO

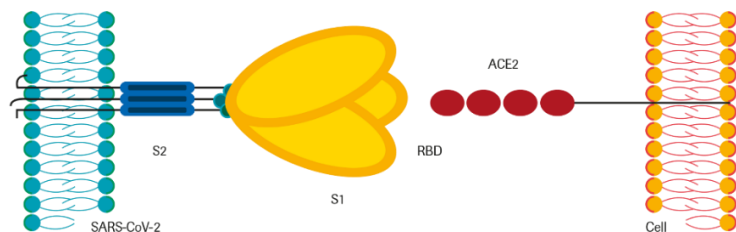
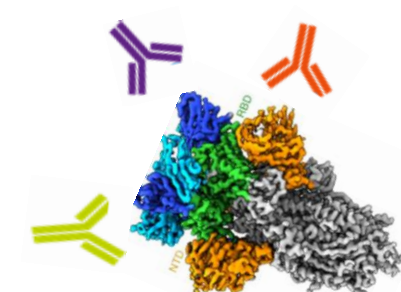
RBD recombinante de SARS-CoV-2 y ACE2 humana



Anticuerpos (incluidos IgG) específicos a RBD



Anticuerpos IgG específicos anti-S1 y anti-S2



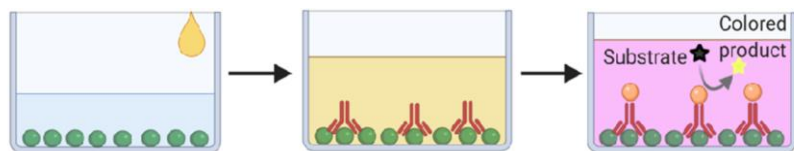
ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA



< 0.8
 ≥ 0.8

(cuantitativos)

U/mL



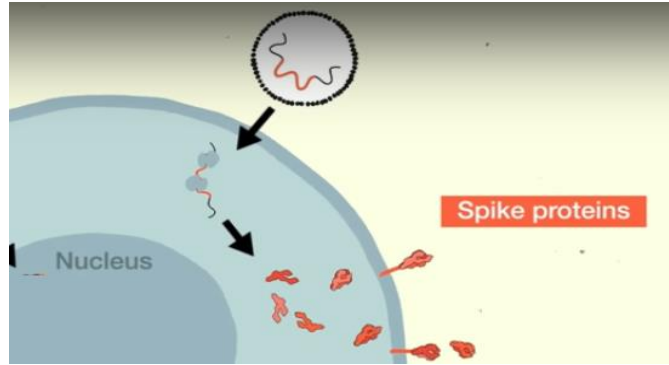
QUIMIOLUMINISCENCIA

< 33.8
 ≥ 33.8

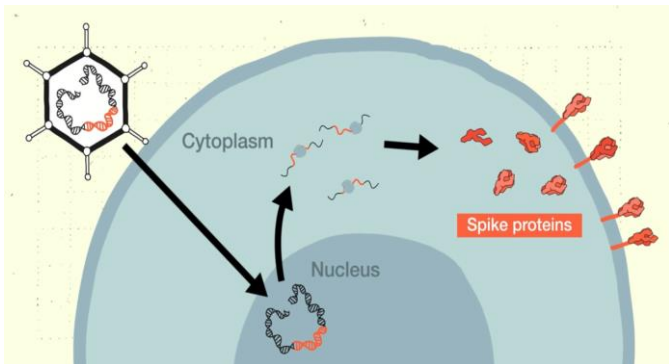
(cuantitativos)

BAU/ml

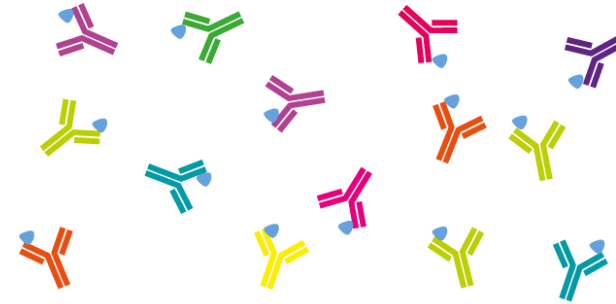
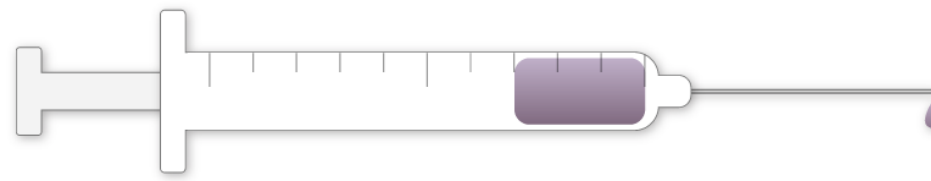
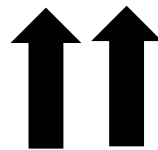
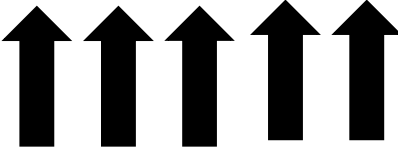
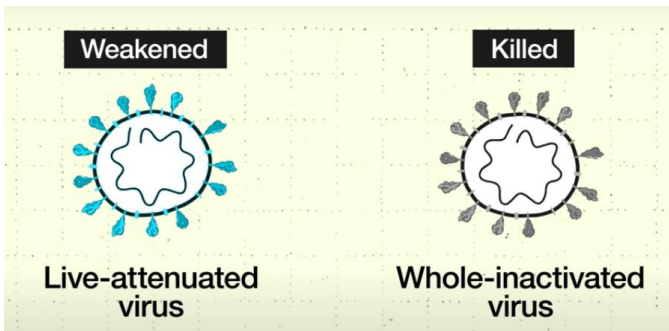
Vacuna Génica



Vacuna Vector Viral



Vacuna Virus Inactivado



Valores de referencia



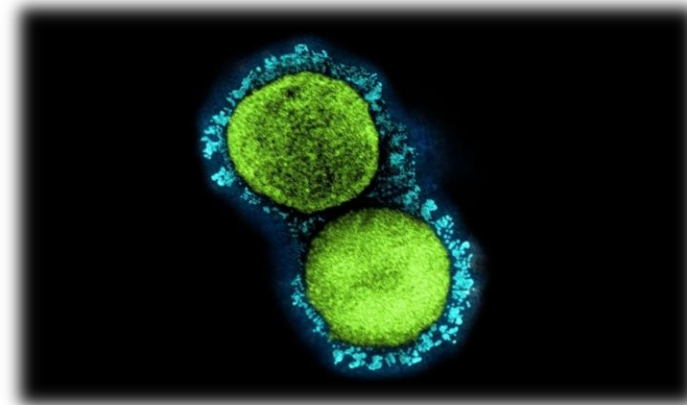
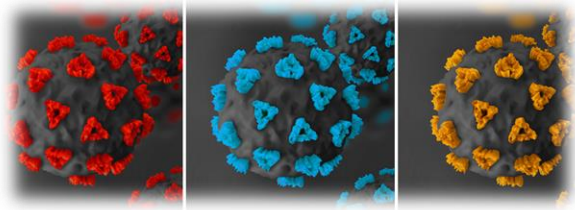
Resultados armonizados



Correlatos de protección



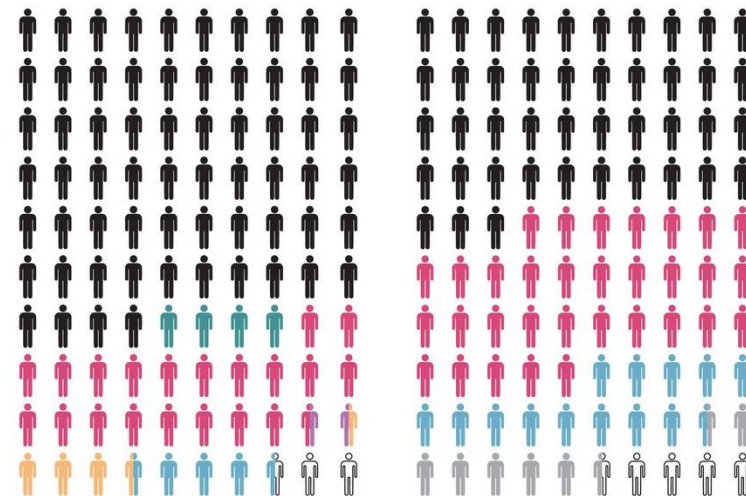
Protegido
No protegido



Diseño A : > 800 BAU/MI

Diseño B : > 500 BAU/mL

Diseño C : > 200 BAU/mL



COVID-19 natural immunity

Scientific brief

10 May 2021



El **90 al 99%** de pacientes después de la infección, desarrollan anticuerpos neutralizantes

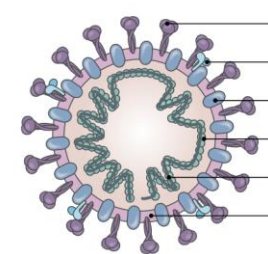
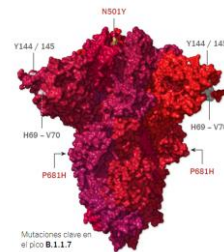
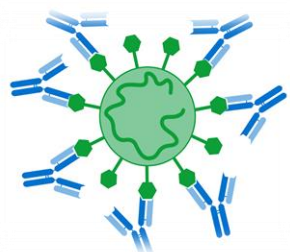
La fuerza y duración de las respuestas inmunes, varía según la **edad y la gravedad de los síntomas**

Las respuestas inmunitarias son protectoras contra la reinfección durante **6 a 8 meses** después de la infección

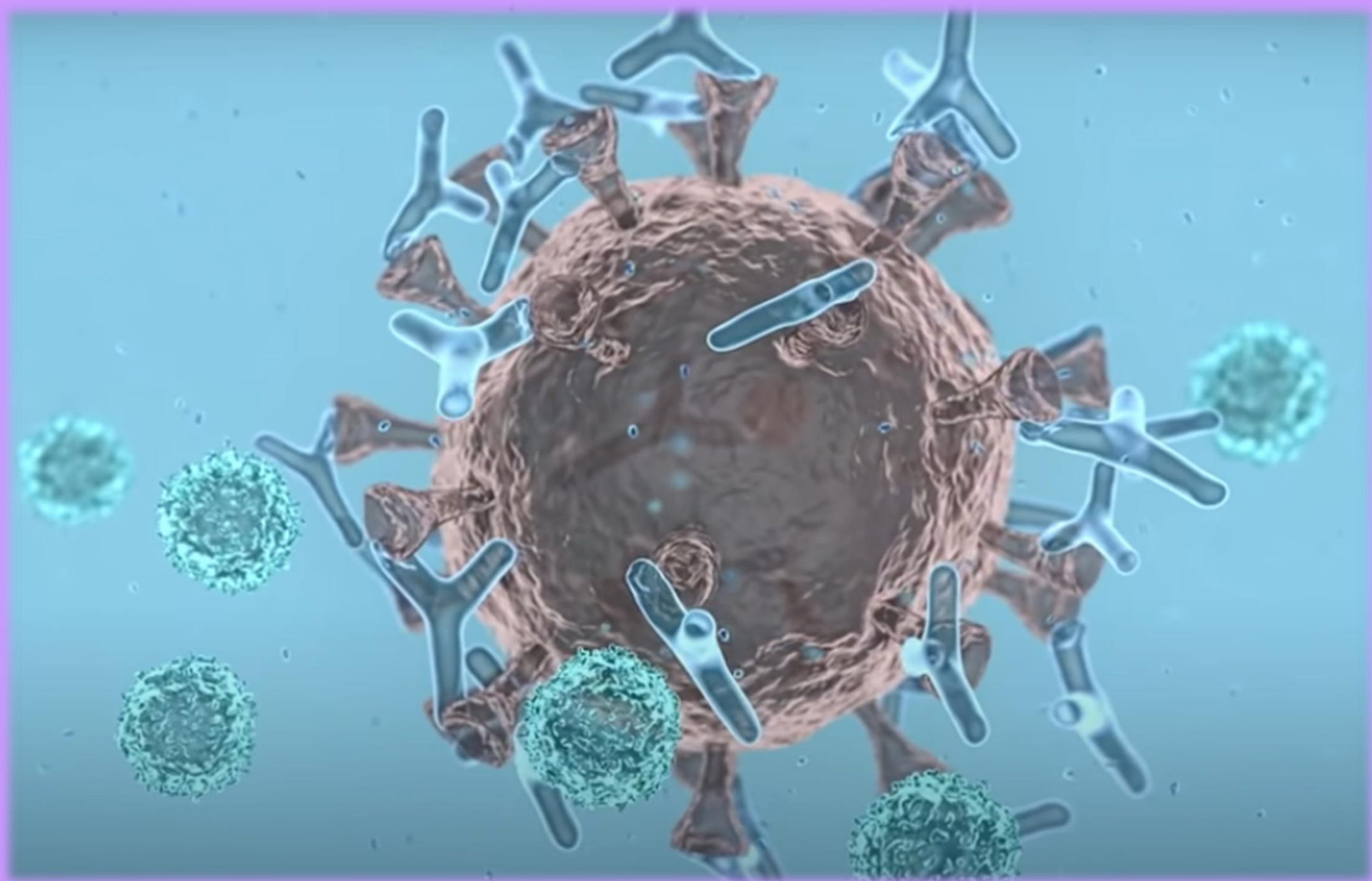
Algunas variantes con cambios en la **proteína S**, tienen una **susceptibilidad reducida** a la neutralización

La inmunidad celular se dirige además de la proteína S, a **otras proteínas virales**, que son más conservadas para las variantes

Existen ensayos serológicos disponibles que miden la respuesta de anticuerpos a la infección por SARS-CoV-2, pero **los correlatos de protección no se comprenden bien**



S Glicoproteína espicular
HE Dímero de hemaglutinina-esterasa
Proteína M
Proteína N
RNAmc(+) genómico } Nucleocápside
Envoltura



EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) SUMMARY
T-Detect COVID Test
Adaptive Biotechnologies Corporation

For *In vitro* Diagnostic Use
Rx Only
For use under Emergency Use Authorization (EUA) only

The T-Detect COVID Test will be performed at laboratories designated by Adaptive Biotechnologies Corporation that are certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), 42 U.S.C. §263a, and meet the requirements to perform high complexity tests as set forth in this EUA.



LIMITACIONES

1. Las muestras solo deben analizarse de individuos que hayan pasado 15 días o más desde la aparición de los síntomas.
2. Se desconoce en este momento si la presencia de una respuesta inmune de células T confiere inmunidad a la reinfección.
3. Los resultados de las pruebas de respuesta inmune de células T no deben usarse para diagnosticar o excluir una infección aguda por COVID-19 o para informar el estado de la infección.
4. Pueden producirse resultados falsos positivos debido a reactividad cruzada u otras causas posibles.
5. **No se ha establecido el rendimiento de esta prueba en personas que han recibido una vacuna COVID-19.**
6. **No se ha establecido la importancia clínica de un resultado positivo o negativo después de la vacunación con COVID-19, y el resultado de esta prueba no debe interpretarse como una indicación o grado de protección contra la infección después de la vacunación.**

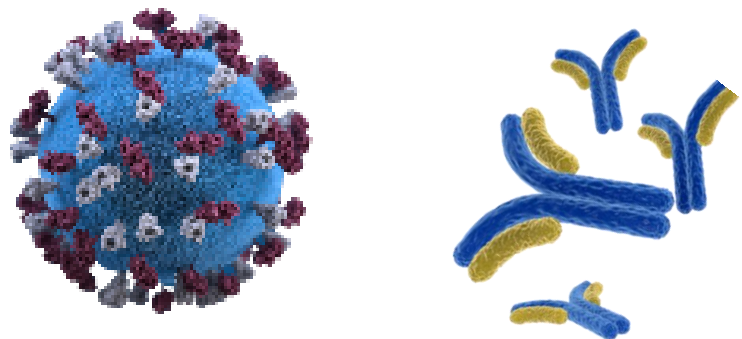
Pruebas serológicas contra el SARS - CoV -2

Seroprevalencia

Diagnóstico en retrospectiva

En casos de PCR negativos

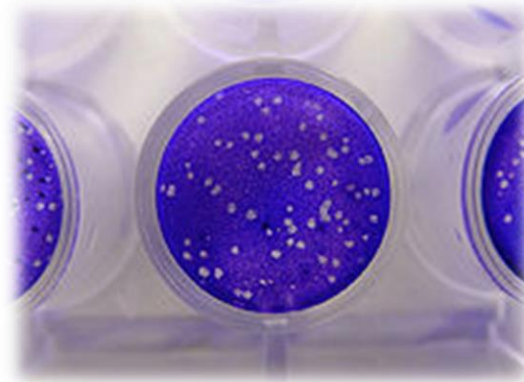
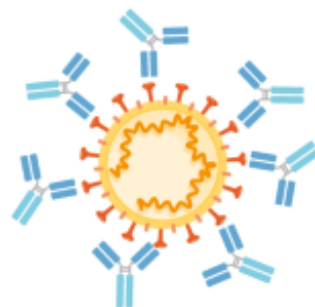
Diseños validados contra PCR +

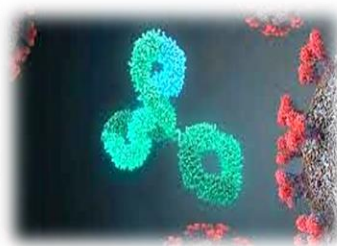
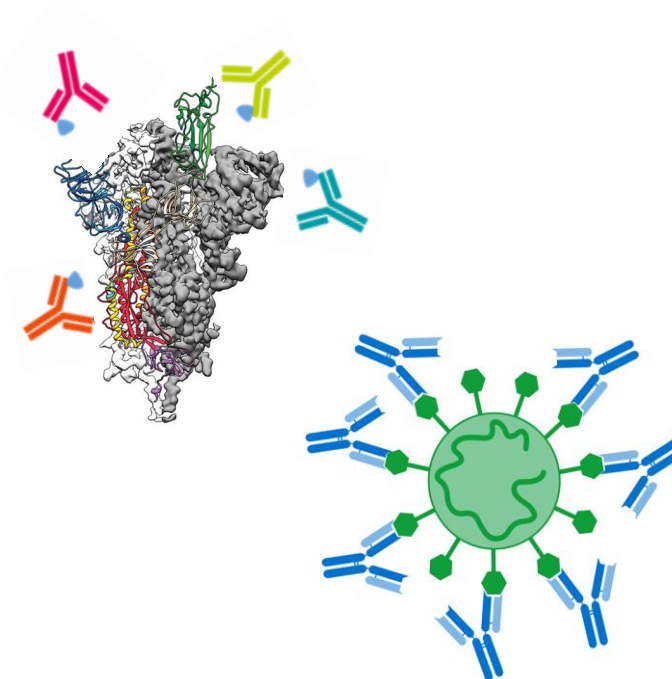
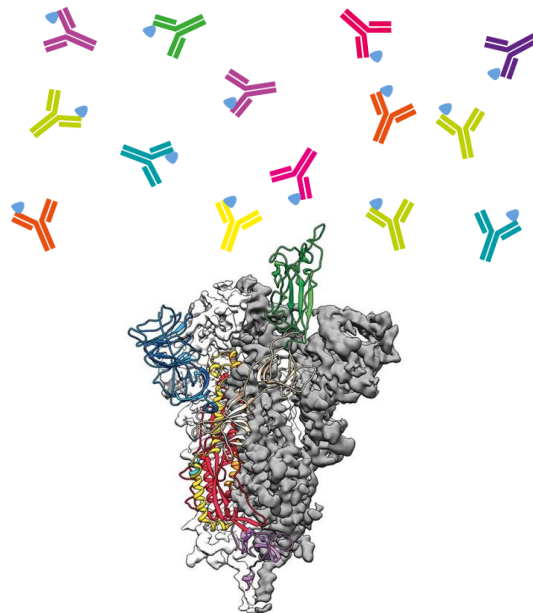
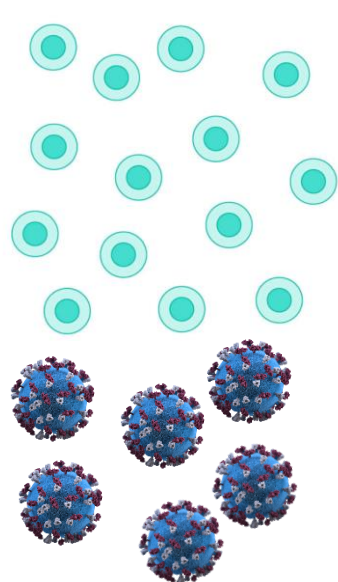


Anticuerpos neutralizantes contra el SARS - CoV -2

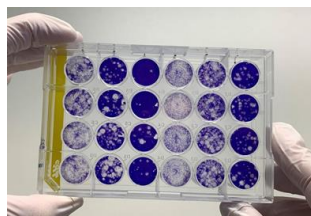
Evaluación de la vacunación

Diseños validados contra pruebas de neutralización por reducción de placa (PRNT) / microneutralización / pseudovirus

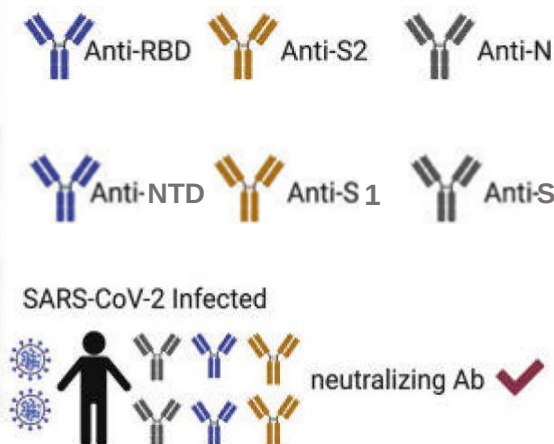




Immunoensayos (EIA-CLIA-ELISA) *validados contra Gold Estándar*



	Con. scFv	27D	80R
1:40			
1:80			
1:160			
1:320			



Número de muestras (n) utilizada en la validación - *Sensibilidad*

↑ More cases

200 new cases per 100,000

160

120

80

40

Goa

Delhi

Buenos Aires

Paris

Toronto

Los Angeles

New York City

Miami

Santiago

Tel Aviv

More vaccinated →

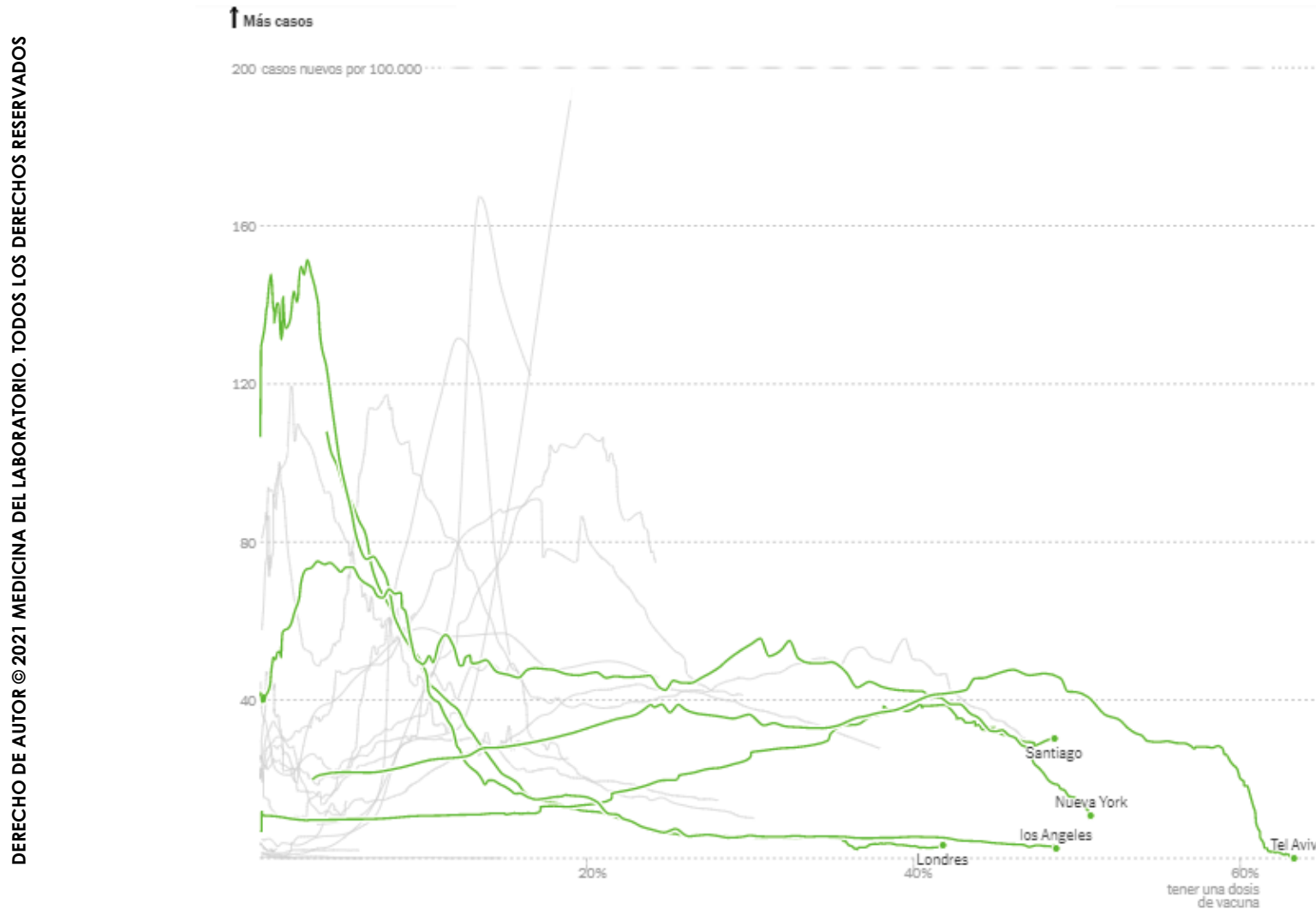
60%
have one
vaccine dose

The Pandemic Has Split in Two

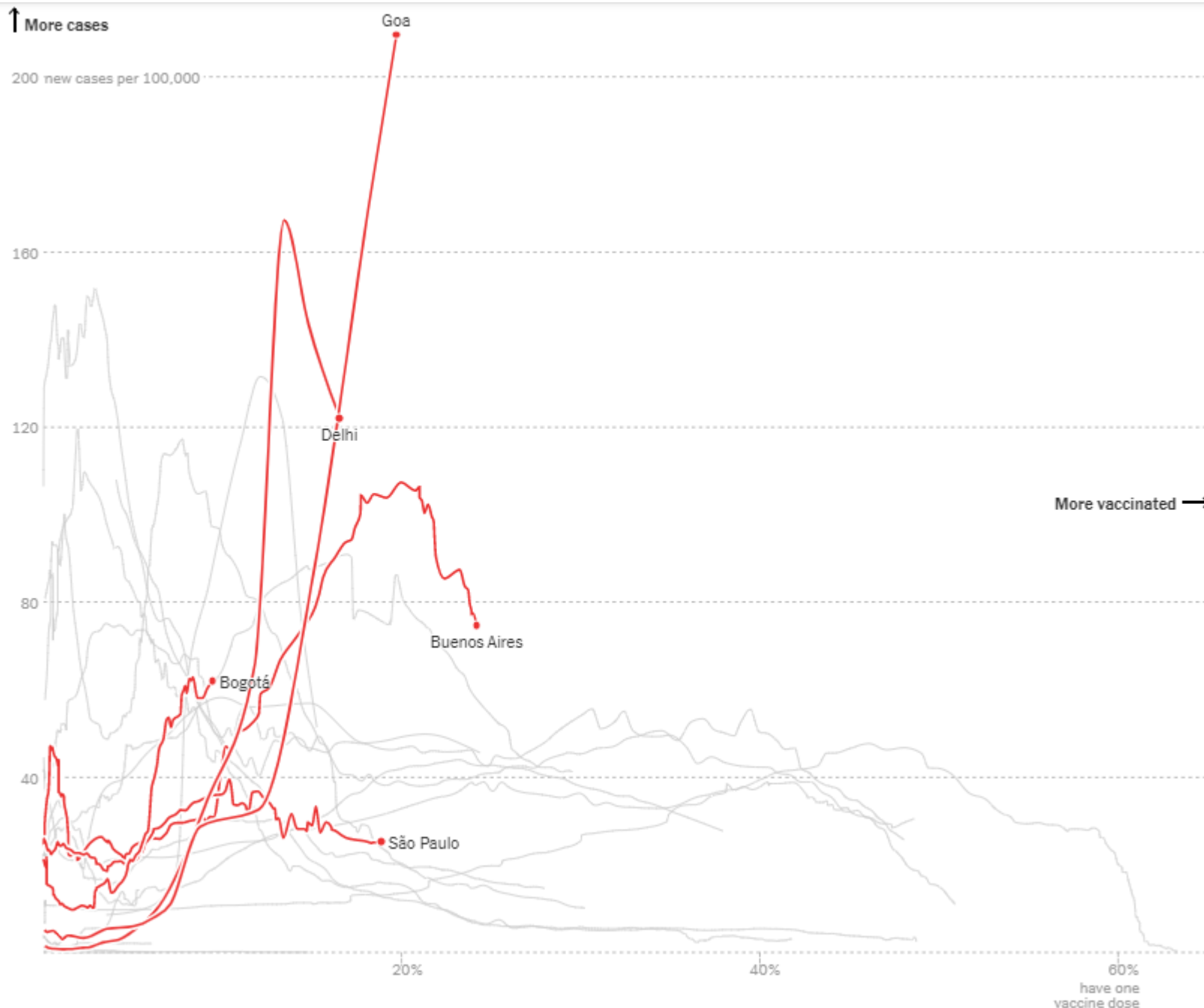
Zero deaths in some cities. Thousands in others. The pandemic's fault lines continue to widen as vaccines flow toward rich countries.

By [Weiyi Cai](#), [Lazaro Gamio](#), [Lauren Leatherby](#) and [Allison McCann](#) May 15, 2021

Muchas ciudades ricas están logrando un progreso dramático al desacelerar COVID-19. A medida que vacunan a más personas, los casos han comenzado a disminuir



Solo 10 países han administrado el **75%** del suministro de vacuna COVID-19



Los brotes están devastando **la India** y gran parte de **América del Sur.**

No hay suficientes vacunas para detenerlos.



Las disparidades de la pandemia nunca han sido tan marcadas



Las vacunas son limitadas, los sistemas de salud son débiles y la voluntad política para mantener a la gente en casa y las economías cerradas se ha debilitado.

En India, las infecciones se han disparado en **Delhi y Goa**, y los brotes se están extendiendo rápidamente a más áreas rurales, en una de las olas más mortíferas desde el inicio de la pandemia.



© Un trabajador quema a varias personas fallecidas por Covid-19. EFE

Las disparidades de la pandemia nunca han sido tan marcadas

DERECHO DE AUTOR © 2021 MEDICINA DEL LABORATORIO. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS



A nivel mundial, se han administrado **18 dosis de vacunas por cada 100 personas**, pero ese número es de solo **1,6 dosis por cada 100 residentes africanos**.

La crisis del COVID-19 en India está devastando a sus pueblos

DERECHO DE AUTOR © 2021 MEDICINA DEL LABORATORIO. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS

Los pobres están perdiendo trabajos,
pasando hambre y siendo víctimas de
estafas



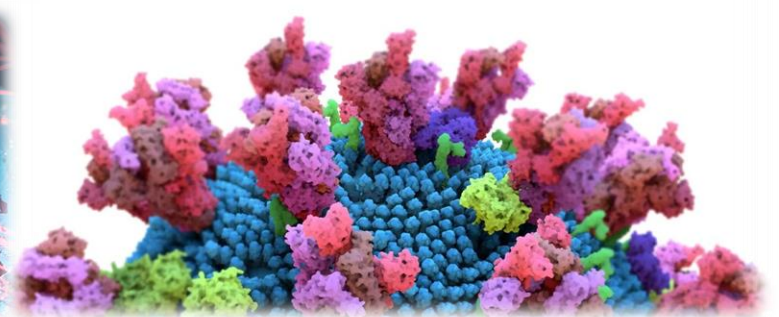
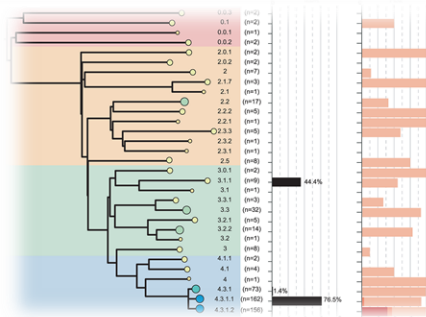
PA

Diez millones de razones para vacunar al mundo



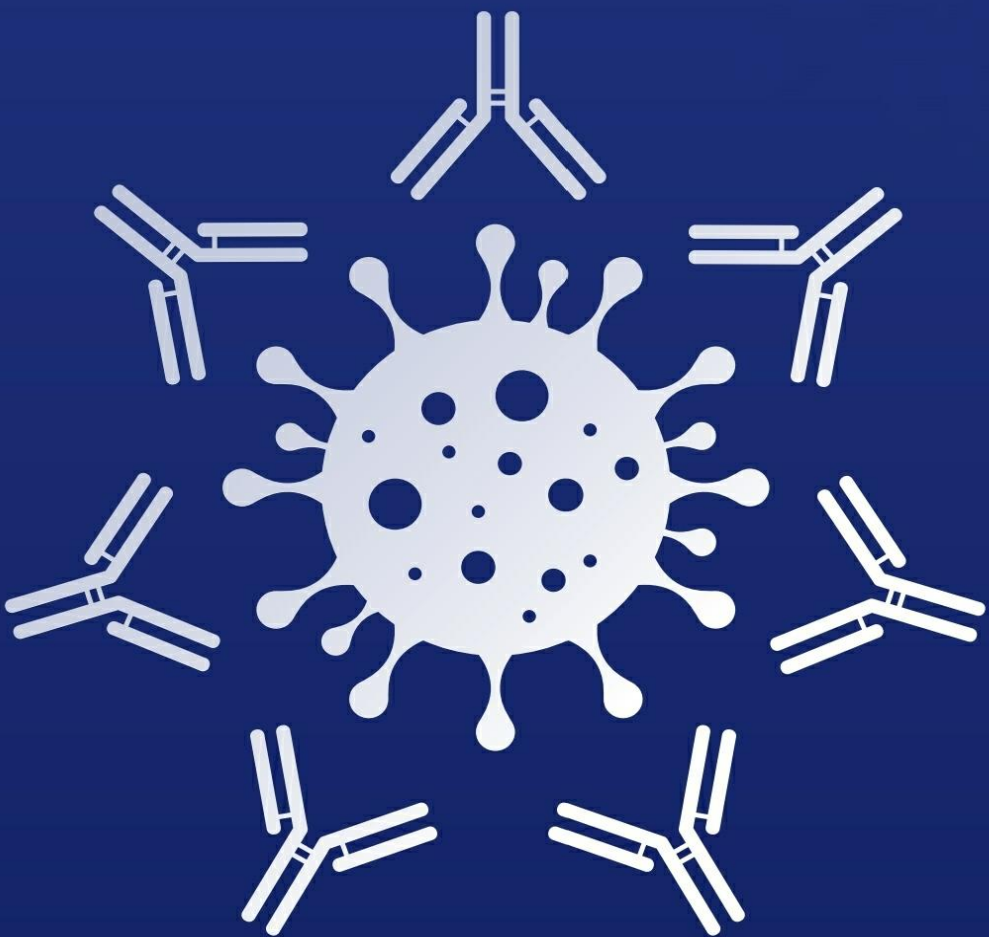
A menos que los suministros de vacunas lleguen a los países más pobres, las trágicas escenas de la India corren el riesgo de repetirse en otros países.
Morirán millones más.

Andrea Ucini





VACCINES 2.0



GRACIAS

patologoclinico@gmail.com

luis.figueroa@expertta.com.pe