



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

“ABORDAJE SISTÉMICO DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR ANTICUERPOS CONTRA EL SARS-COV-2”

Mag. Florencia Rammauro

Tesis de doctorado. PEDECIBA Biología.
Directores: Dr. Sergio Bianchi y Dr. Otto Pritsch

Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de
Medicina, UdelaR. Laboratorio de Inmunovirología
“Prof. Dr. Otto Pritsch”, Institut Pasteur de
Montevideo. Montevideo, Uruguay. 2023.

Se dice que en la vida científica hay un momento mágico en el cual el investigador se encuentra con su experimento y se da cuenta que, al menos por un instante, es la única persona en el mundo que sabe el resultado.

Lo que nadie dice es que esos instantes son aún más mágicos cuando son compartidos.

A Otto, porque esta tesis no es más que la suma de un montón de esos momentos y no podía pedir alguien mejor para que me guie en ellos.

AGRADECIMIENTOS

A Sergio, por todo el trabajo compartido desde ese sábado donde aparecieron anticuerpos contra SARS-CoV-2 en la primera de incontables placas de ELISA, y por asumir este rol como director de tesis.

A Natalia, Federico y Martín, por ser los mejores compañeros en todo lo que nos tocó vivir en estos años.

A Ana María Ferreira, Mariana Seija, Lilia López y Jimena Prieto, cuatro maravillosas personas a las cuales este trabajo me dio la oportunidad de conocer.

Al resto de los miembros actuales y pasados del Laboratorio de Inmunovirología y del Departamento de Inmunobiología.

A todos los que integraron el grupo de trabajo interinstitucional para el desarrollo de métodos serológicos contra el SARS-CoV-2 en Uruguay, sin cuyo trabajo hoy este ELISA no existiría, y a los que desde ATGen lo convirtieron en un kit.

A todos los integrantes del Institut Pasteur de Montevideo por el compromiso y entusiasmo con el que se involucraron en el estudio de respuesta de anticuerpos. Y a todos los médicos, enfermeras, estudiantes y pacientes que participaron de los estudios realizados en el ámbito clínico.

Y por último a mi familia, en particular a mis padres, y a mis amigos, pilares fundamentales en este período.

RESUMEN

El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus causante de la enfermedad llamada de COVID-19, la cual, desde la aparición de los primeros casos en diciembre de 2019 en China, ha causado numerosos impactos sanitarios, económicos y sociales. En este contexto, la aplicación de ensayos serológicos capaces de evidenciar la presencia de anticuerpos específicos ha sido muy útil. En nuestro país, se desarrolló una prueba de tipo ELISA con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos específicos dirigidos al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del SARS-CoV-2. En este trabajo describimos el desarrollo, validación y la aplicación de este ensayo en estudios de seroprevalencia, así como para la evaluación de plasmas hiperinmunes COVID-19.

La vacunación contra el SARS-CoV-2 ha mostrado se una estrategia exitosa para prevenir las formas severas de enfermedad y muertes asociadas a COVID-19. CoronaVac (SinoVac) y BNT162b2 (Pfizer-BionTech) han sido las vacunas más empleadas a nivel global, y también en nuestro país. Como parte de este trabajo, evaluamos la respuesta inmune humoral, en particular los niveles de anticuerpos de tipo IgG dirigidos al RBD de la proteína S de SARS-CoV-2, inducida por la vacunación con CoronaVac y BNT162b2, y la aplicación de dosis de refuerzo en esquemas de vacunación homóloga y heteróloga, en una cohorte de población sana, trasplantados renales, trasplantados hepáticos y pacientes en diálisis crónica. En la cohorte de población sana evaluamos además la dinámica de decaimiento de los anticuerpos post-vacunación en el tiempo, y la actividad neutralizante, cinética de unión y capacidad de mediar funciones efectoras dependientes del Fc de estos anticuerpos.

En la cohorte de individuos sanos todos mostraron niveles de anticuerpos detectables luego de la vacunación con dos dosis, independientemente de la vacuna empleada, aunque los niveles de anticuerpos alcanzados con BNT162b2 fueron significativamente mayores. La aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en aquellos inmunizados con CoronaVac, aumento cerca de 20 veces los niveles de anticuerpos anti-RBD comparado con lo encontrado luego de la aplicación de dos dosis. La funcionalidad de las inmunoglobulinas mostró un comportamiento similar. En los grupos de trasplantados, se pudieron detectar anticuerpos en un porcentaje menor de individuos luego de la vacunación y los niveles de anticuerpos también fueron significativamente menores, independiente de la vacuna empleada, comparado con el

grupo control. En los pacientes en diálisis si bien no se encontraron diferencias tan notables con respecto al porcentaje de individuos con presencia de anticuerpos específicos, los niveles alcanzados fueron si significativamente menores. La aplicación de dosis de refuerzo aumento de manera significativa tanto el número de individuos en los que se pudo detectar la presencia de anticuerpos como los niveles de estos, para todos los grupos estudiados. A pesar del impacto de la aplicación de dosis de refuerzo en estas poblaciones, algunos individuos continúan sin evidenciar respuesta a la vacunación, lo cual parece estar relacionado al estado de inmunosupresión.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	1
Agradecimientos	2
Resumen	3
Tabla de contenido	5
Abreviaturas	9
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 SARS-COV-2 Y COVID-19	12
1.1.1. Características generales del SARS-CoV-2	13
1.1.2. Infección por SARS-CoV-2	18
1.1.3. Infección por SARS-CoV-2 en individuos inmunocomprometidos	20
1.1.4. COVID-19 en Uruguay	24
1.1.5. Variantes virales del SARS-CoV-2	25
1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2	29
1.2.1. Respuesta inmune innata a la infección por SARS-CoV-2	29
1.2.2. Respuesta inmune adaptativa a la infección por SARS-CoV-2	34
1.2.3. Respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2 en RTOS y PDC	39
1.3. VACUNAS CONTRA COVID-19	44
1.3.1. Principales vacunas empleadas contra COVID-19	45
1.3.2. Refuerzos vacunales contra COVID-19	49
1.3.3. Efectos adversos reportados para las vacunas contra COVID-19	51
1.3.4. Vacunación contra la COVID-19 en Uruguay	52
1.4 RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LAS VACUNAS CONTRA EL SARS-COV-2	56
1.4.1. Respuesta inmune humoral y celular inducida por las vacunas contra SARS-CoV-2	57
1.4.2. Respuesta inmune a las vacunas contra SARS-CoV-2 en RTOS	62
1.4.3 Respuesta inmune a las vacunas contra SARS-CoV-2 en pacientes en diálisis crónica	65

1.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE AL SARS-COV-2	67
1.5.1. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)	68
1.5.2 Ensayos de neutralización	72
1.5.3 Estándares internacionales para ensayos serológicos contra el SARS-CoV-2	73
2. CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA	75
2.1 OBJETIVO GENERAL	77
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
3. RESULTADOS	78
3.1 DESARROLLO A NIVEL NACIONAL DE UN ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA EL SARS-COV-2	78
3.1.1 Puesta a punto de un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2	80
3.1.2 Estudios de seroprevalencia: aplicación de los ensayos COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y COVID-19 IgG QUANT ELISA en territorio	94
3.1.3 Aplicación del ensayo para la conformación de un banco de plasma de pacientes convalecientes de COVID-19	97
3.2 ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-SARS-COV-2 EN UNA COHORTE DE TRABAJADORES DE UN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN URUGUAYO.	103
3.2.1 Estudio de seroprevalencia y evolución de los niveles de anticuerpos en una cohorte de trabajadores del IPMon	104
3.2.2 Caracterización de la respuesta inmune humoral a la vacunación contra COVID-19 en una cohorte de trabajadores de un instituto de investigación uruguayo.	108
- Publicación 1	111
3.3 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN CONTRA COVID-19 EN GRUPOS DE PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS EN URUGUAY.	119
3.3.1 Respuesta a la vacunación contra COVID-19 en receptores de trasplante renal	120
- Publicación 2	120
- Publicación 3	129

3.3.2 Respuesta a la vacunación contra COVID-19 en receptores de trasplante de hígado	138
- Publicación 4	138
- Respuesta frente a la aplicación de una dosis de refuerzo en trasplantados hepáticos	145
3.3.3 Respuesta a las vacunas contra COVID-19 en pacientes en diálisis crónica	147
4. DISCUSIÓN GENERAL	151
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	172
5.1 Conclusiones	172
5.2 Perspectivas	175
6. METODOLOGÍA SUPLEMENTARIA	177
6.1. Obtención de muestras de suero de pacientes convalecientes de COVID-19 y sueros humanos prepandémicos para la optimización de inmunoensayos	177
6.2. Producción de RBD recombinante	177
6.3. ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en suero humano	178
6.4. Ensayos serológicos comerciales empleados para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2	178
6.5. Análisis serológico de muestras de suero mediante tiras reactivas	179
6.6. Determinación de los parámetros diagnósticos de los ensayos serológicos	180
6.7. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero del personal de la salud de la ciudad de Rivera	180
6.8. Ensayo de tamizaje para la categorización de candidatos a donantes de plasma convaleciente COVID-19	181
6.9. Ensayo de activación de células NK dependiente de anticuerpos	181
6.10. Determinación de los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-RBD en el suero de pacientes transfundidos con plasma convaleciente COVID-19	182
6.11. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de funcionarios del IP Montevideo	182
6.12. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de TH luego de la administración de dosis vacunales de refuerzo contra COVID-19	183

6.13. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de PDC luego de la aplicación de vacunas contra COVID-19	183
7. BIBLIOGRAFÍA	185
8. ANEXO I- PUBLICACIONES CIENTÍFICAS VINCULADAS A LA TESIS	211
8.1 Publicación 5	212
8.2 Publicación 6	225
8.3 Publicación 7	227
8.4 Publicación 8	244
9. ANEXO II- OTROS DOCUMENTOS	259
9.1 Informe DLSP COVID-19 IgG ELISA UY	260
9.2 Informe DLSP COVID-19 IgG ELISA UY 2.0	261
9.3 Informe DLSP COVID-19 IgG QUANT ELISA	263
Declaración de autoría	266

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADE	Potenciación de la infección dependiente de anticuerpos
ADP	Fagocitosis dependiente de anticuerpos
Ag-RDT	Pruebas rápidas de detección de antígenos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AU	Unidades arbitrarias
AUC	Área bajo la curva
BAU	Unidades de unión de anticuerpos
BSA	Seroalbúmina bovina
BSL1	Bioseguridad nivel 1
BSL2	Bioseguridad nivel 2
BSL3	Bioseguridad nivel 3
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
CEIC	Comité de Ética en la Investigación Clínica
CLIA	Inmunoensayo de quimioluminiscencia
CoV	Coronavirus
COVID-19	“COroNaVirus Disease 2019” Enfermedad por coronavirus 2019
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DLSP	Departamento de Laboratorios de Salud Pública
DP	Diálisis peritoneal
E	Proteína de envoltura
ECLIA	Inmunoensayo de electro quimioluminiscencia
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
ERC	Enfermedad renal crónica
ERGIC	Compartimiento intermediario ER-Golgi
Fc	Fragmento cristalizante
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HCoV	Coronavirus humano
HD	Hemodiálisis
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana 1
HLA	Antígeno linfocitario humano
HRP	Peroxidasa del rábano
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia

IFN-I	Interferón de tipo I
IFN-III	Interferón de tipo III
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
ILCs	Células linfoides innatas
INAU	Instituto del Niño y Adolescente del Uruguay
iRBD	Dominio de unión al receptor (producido en células de insecto)
IRF3	Factor de respuesta al interferón 3
ISG	Gen de respuesta al interferón
J	Índice de Youden
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
M	Proteína de membrana
M/CO	Muestra/cutoff
m1Ψ	N1-metilpseudouridina
MAVS	Proteína adaptadora mitocondrial de señalización antiviral
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
MIS-C	Síndrome inflamatorio multisistémico en niños
mRBD	Dominio de unión al receptor (producido en células de mamífero)
MSP	Ministerio de Salud Pública
N	Proteína nucleocápside
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NIH	National Institutes of Health
NK	“Natural killer”
NLRs	Receptores tipo NOD
NSP	Proteínas no estructurales
NTD	Dominio N terminal
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Marco abierto de lectura
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR	Proteína C reactiva
PDC	Pacientes en diálisis crónica
PF4	Factor plaquetario 4
PRNT	Ensayo de neutralización por reducción de placas
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
R0	Número reproductivo básico
RBD	Dominio de unión al receptor

RBM	Motivo de unión al receptor
RLRs	Receptores tipo RIG-I
ROC	Característica operativa del receptor
RTC	Complejo de replicación-transcripción
RTOS	Receptores de trasplante de órganos sólidos
RU	Unidades relativas
S	Proteína spike
S-2P	Proteína S estabilizada en estado de pre fusión
SARS	Síndrome respiratorio agudo
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo
SNC	Suero normal de cabra
SNS	Servicio Nacional de Sangre
sVNT	Ensayo de neutralización viral sustituto
TA	Temperatura Ambiente
TH	Trasplantados hepáticos
Thf	Células T colaboradoras foliculares
TLRs	Receptores tipo Toll
TMPRSS2	Serina proteasa transmembrana 2
TR	Trasplantados renales
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UdelaR	Universidad de la República
VBM	Variantes bajo monitoreo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
VITT	Trombocitopenia trombótica inmunitaria inducida por vacuna
VOC	Variante de preocupación
VOHC	Variante de alta preocupación
VOI	Variante de interés
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VSV	Virus de la estomatitis vesicular

1. INTRODUCCIÓN

A finales del año 2019 comenzamos a escuchar de casos de neumonías virales atípicas en China, y más tarde de un nuevo virus causante de estos casos perteneciente a la familia de los Coronavirus. Lejos estábamos de sospechar el alcance que tendría la enfermedad causada por este nuevo coronavirus y la manera en la que se transformarían nuestras vidas. La rápida propagación de la infección, la saturación de los sistemas de salud, incluso en países desarrollados, y el total desconocimiento inicial llevó a la toma de medidas urgentes y en algunos casos extremas. En varios lugares se decretó la cuarentena obligatoria y se restringió la movilidad tanto dentro de las naciones como entre ellas. La pandemia tuvo un impacto significativo en la salud pública sí, pero también tuvo un impacto no menor a nivel económico y social. Durante la pandemia por COVID-19, que en algún momento se creía iba a durar unos meses, vivimos todo tipo de situaciones, desde las más extremas a las más esperanzadoras. En el medio de la incertidumbre vimos a la comunidad organizarse para afrontar la situación, con el conocimiento científico y el desarrollo tecnológico avanzando a una velocidad inaudita. Al Uruguay los primeros casos llegaron un poco más tarde y a pesar de la incertidumbre inicial, el trabajo en conjunto y la conciencia social hicieron que tuviéramos una primera ola de COVID-19 leve, comparado con otros países del mundo, sin necesidad de recurrir a medidas extremas. Con el ingreso de la variante P.1 (gamma) a principios de 2021 sufrimos un aumento significativo en el número de casos, en el umbral de la llegada de las primeras vacunas contra COVID-19 al país. La llegada de las vacunas y el rápido avance y alcance de la campaña de vacunación permitió un tránsito lento hacia la normalidad. Recién el 5 de mayo de 2023 la Organización Mundial de la Salud decretó el fin de la emergencia sanitaria, pero es imposible saber por cuanto tiempo seguiremos sintiendo los efectos que dejó este evento en todos nosotros.

1.1 SARS-COV-2 Y COVID-19

Los coronavirus (CoV) son una familia diversa de virus envueltos con ARN simple hebra de polaridad positiva. Infectan humanos, mamíferos y algunas especies de aves, incluidos ganado y animales de compañía, por lo que representan un desafío, no solo para la salud pública, sino también en el ámbito veterinario y productivo. La familia *Coronaviridae* se especifica más en la subfamilia *Orthocoronavirinae*, que consiste en cuatro géneros: *alfacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gamacoronavirus* y *deltacoronavirus*¹. Mientras que los alfacoronavirus y betacoronavirus infectan exclusivamente mamíferos,

los gamacoronavirus y deltacoronavirus tienen un rango más amplio de hospederos¹. Las infecciones por coronavirus en humanos y animales generalmente causan enfermedad respiratoria o entérica.

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 del tracto respiratorio, asociadas con los síntomas del resfrío común. En contraste, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV o SARS-CoV-1) surgió en 2002 en países del sudeste asiático, y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) apareció en 2012, los dos betacoronavirus, surgieron en el humano causando enfermedad respiratoria en algunos casos fatal, lo que convirtió a los coronavirus emergentes en una nueva causa de preocupación para la salud pública en el siglo XXI.

1.1.1. Características generales del SARS-CoV-2

A finales de 2019 un nuevo HCoV, designado coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV-2) emergió en la ciudad de Wuhan, China, causando un brote de neumonías virales atípicas. Siendo un virus altamente transmisible, la enfermedad causada por el SARS-CoV-2, llamada COVID-19 (por “*CO*rona*V*irus *D*isease 2019”), se propagó rápidamente en todo el mundo, sobrepasando ampliamente al SARS y MERS, tanto en número de personas infectadas como en expansión geográfica de la epidemia, representando un enorme desafío para la salud pública global.

Existe considerable controversia en torno al origen del SARS-CoV-2. El descubrimiento de diversos coronavirus de murciélago cercanamente emparentados a este virus sugirió que estos animales podrían constituir su reservorio. Sin embargo, la divergencia entre el SARS-CoV-2 y los coronavirus de murciélago representarían más de 20 años de evolución secuencial, insinuando que probablemente representen precursores evolutivos, pero no sean el progenitor directo de este virus². Además de los murciélagos, los pangolines son otro posible hospedero de la fauna silvestre vinculado al SARS-CoV-2. El dominio de unión al receptor (RBD, *receptor binding domain*) de los coronavirus de los pangolines de Guangdong es altamente similar al de SARS-CoV-2, en particular, el

motivo de unión al receptor (RBM o *receptor binding motif*), parte del RBD de estos virus,

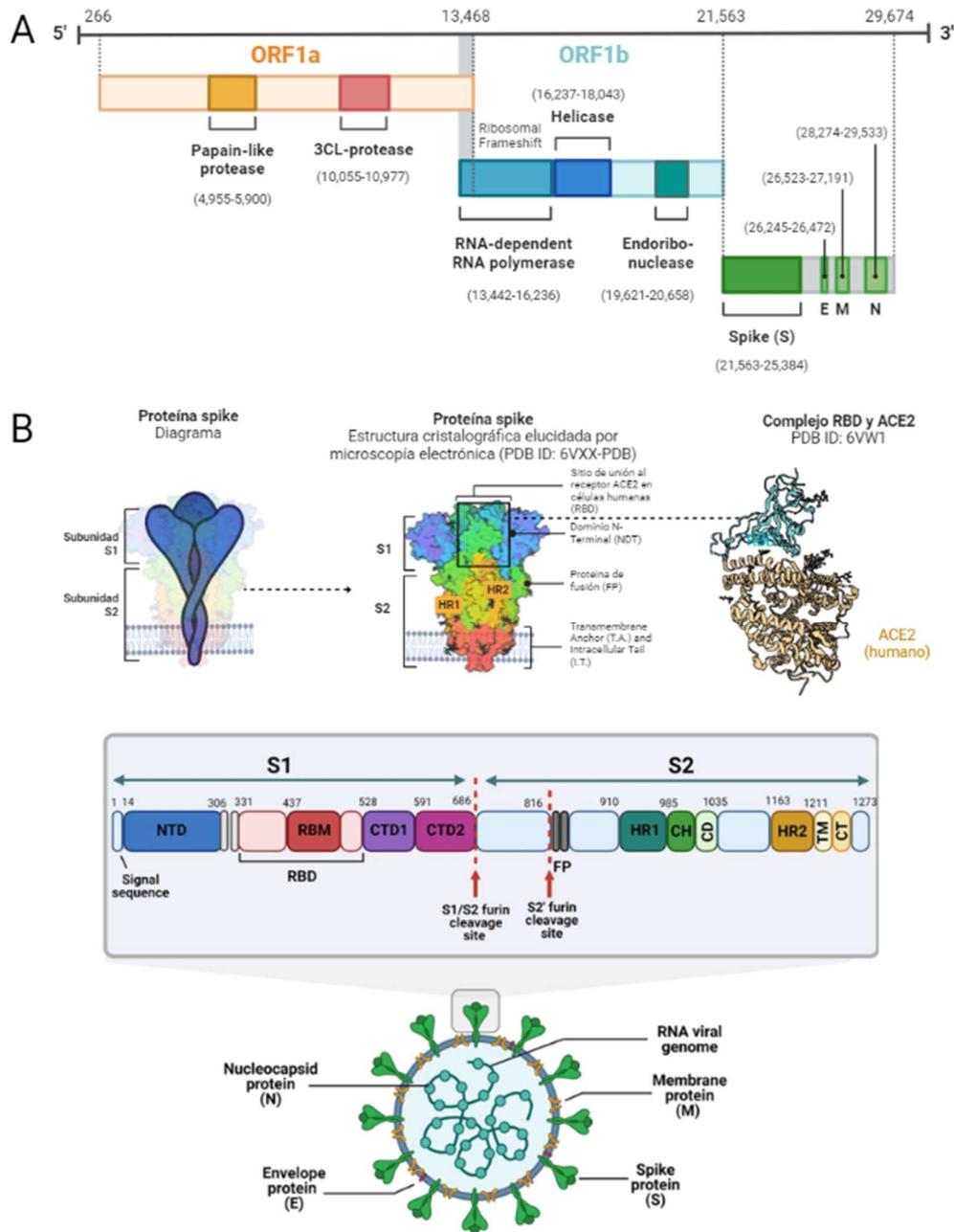


Figura 1. Características generales del SARS-CoV-2. A- Organización del genoma de SARS-CoV-2 en marcos abiertos de lectura (ORF) y principales proteínas virales codificadas en estos. **B-** Estructura general del virión. Se muestra la organización de la proteína S y su estructura tridimensional, destacando el RBD, dominio responsable de la interacción con el receptor celular ACE2. Figura adaptada de Mistry et al. 2022³ en BioRender.com.

tiene solo una variación aminoacídica con respecto al del SARS-CoV-2⁴. Sin embargo, dadas las características de la infección en estos animales no existe información suficiente como para identificarlos de manera definitiva como los hospederos

intermediarios. Además de la fauna silvestre, se ha investigado la susceptibilidad de animales domésticos y experimentales a la infección por el SARS-CoV-2. Un estudio demostró que el virus se replica de manera eficiente en gatos y en el tracto respiratorio superior de hurones, mientras que perros, patos, cerdos y pollos no serían susceptibles al SARS-CoV-2⁵. También se reportó la infección de visones, y en perros convivientes con casos humanos de COVID-19^{6,7}. Se ha sugerido que el SARS-CoV-2 se podría haber originado en un laboratorio de investigación desde donde se habría diseminado, extremo este que ha sido investigado por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sin poder llegar a conclusiones claras.

El SARS-CoV-2 comparte un 79% de identidad de secuencia con el SARS-CoV y un 50% con el MERS-CoV⁸. Su organización genómica es compartida con otros betacoronavirus, con seis marcos abiertos de lectura (ORF) funcionales, ordenados de 5' a 3' en: replicasa (ORF1a/ORF1b), spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), los últimos cuatro codifican para las principales proteínas estructurales del virus (Figura 1-A). Además, se han identificado siete ORF putativos codificantes para proteínas accesorias intercalados entre los genes estructurales⁹. El gen replicasa comprende dos tercios del genoma viral desde el extremo 5' y codifica para una poliproteína larga (pp1ab), la cual es escindida proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales (NSP), involucradas en la transcripción y replicación del virus⁹ (Figura 1-A).

De las cuatro proteínas estructurales, el SARS-CoV-2 comparte más de un 90% de identidad de secuencia con el SARS-CoV, salvo para la proteína S donde divergen, con un 77% de similitud¹⁰. La proteína S de SARS-CoV-2 tiene un tamaño total de 1273 aa, y está conformada por dos subunidades, S1, donde se encuentra el RBD, y S2. Una particularidad de esta proteína comparada con las proteínas S de otros coronavirus es la inserción de cuatro residuos aminoacídicos (PRRA) en la unión entre las subunidades S1 y S2¹¹. Esta inserción genera un sitio de escisión polibásico (RRAR) que permite el corte eficiente por furina, y otras proteasas¹². Un estudio estructural sugiere que este sitio de corte por furina podría reducir la estabilidad de la proteína y facilitar la adaptación conformacional que es necesaria para la unión del RBD a su receptor¹³ (Figura 1-B).

El SARS-CoV-2 usa como receptor celular la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)¹⁰. La subunidad S1 de la proteína S del coronavirus se puede dividir en dos dominios funcionales, el dominio N terminal y el dominio C terminal. Análisis estructurales y bioquímicos identificaron una región de 211 aa (aminoácidos 319-529) en el dominio C terminal de la subunidad S1 como el RBD, el cual tiene un rol clave en la entrada del virus a las células y es blanco de anticuerpos neutralizantes^{14,15}. Dentro de este, el RBM media el contacto directo con el ACE2 (Figura 1-B). Como profundizaremos más adelante, también en esta región es donde se concentran la mayor parte de las mutaciones presentes en las variantes virales. Los análisis realizados indican que las diferencias estructurales en el RBD de SARS-CoV-2 hacen que tenga una afinidad de unión por ACE2 mayor que el SARS-CoV¹⁵⁻¹⁷. Similar a lo que ocurre con otros coronavirus, el SARS-CoV-2 necesita del procesamiento proteolítico de la proteína S para activar la ruta endocítica y permitir la entrada del virus a la célula. Se ha demostrado que proteasas del hospedero, incluidas la serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2), catepsina L y furina, participan de este proceso¹⁸⁻²⁰. Datos de secuenciación de célula única mostraron que TMPRSS2 se co-expresa con ACE2 en células epiteliales nasales y en células de la transición secretora/ciliada a nivel bronquial, lo que explicaría en parte el tropismo tisular del SARS-CoV-2^{21,22}. Análisis estructurales revelaron que el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 se encuentra principalmente en una conformación “hacia abajo” (o “*down conformation*” en inglés) lo cual podría no favorecer la unión al receptor, pero sí ser útil para evadir al sistema inmunológico¹⁹.

Luego de unirse al receptor, el genoma viral del SARS-CoV-2 puede atravesar la membrana plasmática de la célula por dos mecanismos de entrada diferente: (1) la vía de fusión de membranas y (2) la vía endocítica²³. La vía de fusión de membranas involucra el clivaje de la proteína S en el límite S2' por la proteasa celular TMPRSS2, seguido de la disociación de la subunidad S1, dejando expuesta a S2. A través de un mecanismo altamente conservado dentro de la familia de los coronavirus, y compartido con la proteína gp41 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1 (HIV-1), el dominio S2 se despliega para adoptar su conformación de post fusión dentro de la membrana plasmática de la célula hospedera^{24,25}. La proteína S en estado de post fusión une entonces, por un proceso que no está del todo elucidado estructuralmente, las dos membranas, llevando a la fusión. Por otra parte, la vía endocítica tardía no depende del clivaje por TMPRSS2, sino que explota el proceso de endocitosis celular. La unión prolongada del virus al exterior de la célula gatilla la endocitosis dependiente de receptor

de la partícula viral. La partícula es invaginada dentro de un endosoma, la acidificación de este compartimiento activa a Catepsina L y otras proteasas celulares, que escinden la proteína S resultando finalmente en la fusión de la membrana viral y endosomal²³. Estas dos vías de entrada culminan con el depósito del genoma viral en el citosol para su posterior replicación (Figura 2).

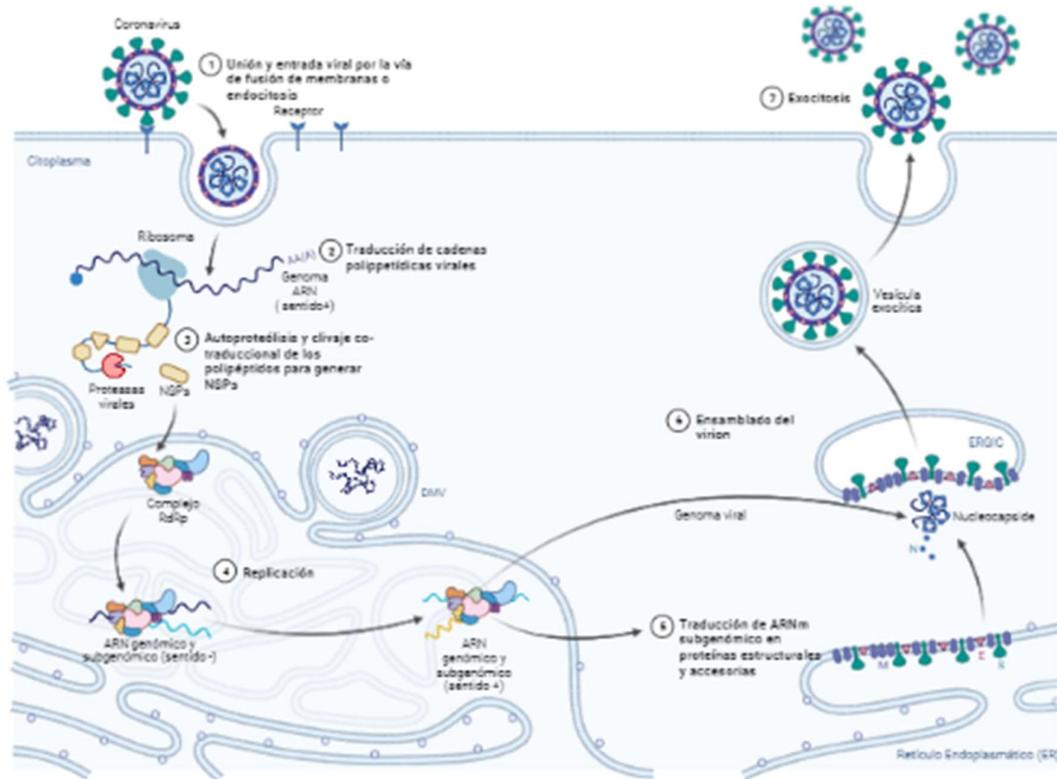


Figura 2. Ciclo de infección celular del SARS-CoV-2. Se señalan los pasos centrales del ciclo replicativo del virus SARS-CoV-2 en el interior de una célula blanco. Imagen adaptada con BioRender.com.

La traducción inicial del genoma del SARS-CoV-2 por los ribosomas celulares ocurre en el citoplasma^{26,27}. A partir de las primeras dos terceras partes del genoma se traducen dos poliproteínas largas (pp1a y pp1ab) que codifican para 16 NSP individuales²⁷, varias de las cuales tienen como función ser parte del complejo de replicación-transcripción (RTC), responsable de la síntesis del ARN viral²⁸ (Figura 2). Estas proteínas no estructurales son escindidas por las proteasas virales. Los pasos restantes de replicación requieren una reorganización espacial extensiva del citoplasma para secuestrar la síntesis del ARN junto con los organelos de replicación viral²⁹. Esta segregación tiene como beneficios concentrar la maquinaria de replicación y, además, proteger a los intermediarios de este proceso, como el ARN doble hebra, de ser reconocido por sensores celulares de la inmunidad innata.

La formación del virión completo de SARS-CoV-2 requiere que todos los componentes del genoma y la envoltura se ensamblen al mismo tiempo y en el mismo lugar. Numerosos estudios de microscopía de alta resolución mostraron que los viriones brotan dentro del lumen del compartimiento intermedio ER-Golgi (ERGIC)^{29,30}. La oligomerización y asociación de la proteína M con el complejo viral formado por la proteína N y el ARN y las proteínas E y S dirige el ensamblaje, la curvatura de membrana, y el eventual brotamiento de partículas virales dentro del ERGIC³⁰. Una vez que todos los componentes del virión están ensamblados, la fase final del ciclo de replicación del SARS-CoV-2 implica la liberación de las partículas virales al ambiente extracelular. Los viriones empaquetados en el ERGIC son llevados a la membrana plasmática por la vía de la exocitosis lisosomal³¹ (Figura 2).

1.1.2. Infección por SARS-CoV-2

La patogénesis de la infección por SARS-CoV-2 en humanos se manifiesta desde síntomas leves a fallo respiratorio grave. El SARS-CoV-2 se transmite principalmente por contacto cercano con las secreciones respiratorias de individuos infectados, a través de aerosoles, gotas respiratorias y superficies contaminadas. El R0 (número reproductivo básico) es utilizado como forma de medida para estimar la capacidad de propagación de una enfermedad infecciosa. Se estima que para el SARS-CoV-2 el R0 varía entre 2 y 3³², lo que significa que una persona infectada puede transmitir el virus a entre dos y tres personas en promedio en una población susceptible, considerándose un valor relativamente alto comparado con otros patógenos que causan enfermedades infecciosas. Es importante tener en cuenta que este valor puede variar en función de diversos factores como la variante viral, la región geográfica y las medidas de prevención y control implementadas.

La principal vía de ingreso del virus al organismo es por la vía respiratoria mediante la inhalación de partículas virales contenidas en gotículas o aerosoles respiratorios que son expulsados por los individuos infectados cuando hablan, tosen, estornudan o simplemente respiran³³. Además de la vía respiratoria, otras posibles vías de transmisión del SARS-CoV-2 incluyen la vía conjuntival y la vía oral³⁴, aunque su contribución global a la transmisión del virus aún está bajo investigación. Una vez que el virus ingresa al organismo, se une principalmente a las células del tracto respiratorio

superior e inferior y comienza a replicarse. Posteriormente, puede migrar por las vías aéreas e infectar las células epiteliales alveolares de los pulmones³³. La rápida replicación del virus en los pulmones puede gatillar una potente respuesta inmunológica. Esta respuesta puede desencadenar la denominada tormenta de citoquinas, la que a su vez es causa del síndrome de distrés respiratorio agudo y falla respiratoria, considerado la principal causa de muerte en pacientes con COVID-19. Pacientes de edad avanzada (>60 años) y con enfermedades preexistentes serias (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Miocardiopatía, *Diabetes Mellitus*, Obesidad, Cáncer, Inmunocomprometidos, etc.) tienen un riesgo aumentado de desarrollar síndrome de distrés respiratorio y de muerte³⁵. También ha sido descrito el fallo orgánico múltiple en algunos casos de COVID-19. Los cambios histopatológicos en pacientes con COVID-19 ocurren principalmente en los pulmones. Análisis histopatológicos muestran daño alveolar difuso bilateral, formación de membrana hialina, descamación de neumocitos y depósitos de fibrina en los pulmones de pacientes con COVID-19 severo.

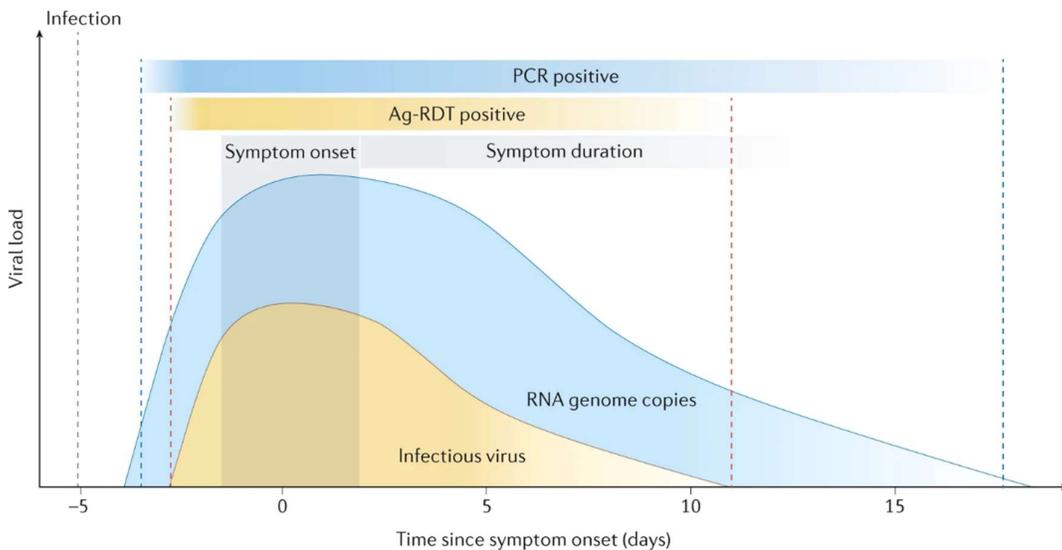


Figura 3. Evolución de la carga viral en el transcurso de la infección por SARS-CoV-2. Según diferentes estudios, el periodo de incubación de la variante ancestral del SARS-CoV-2 se estima entre 4,6 y 6,4 días. En promedio, los síntomas persisten durante 10 días. El ARN viral puede detectarse antes de la aparición de los síntomas, alcanza su punto máximo alrededor del inicio de los síntomas y luego disminuye gradualmente. La mediana de eliminación del ARN es de 16 días después de la aparición de los síntomas. Los títulos de virus infecciosos son más altos alrededor del inicio de los síntomas, pudiendo aislarse hasta 8 o 10 días después del inicio de los síntomas. El ARN se puede detectar durante periodos más prolongados mediante PCR en tiempo real, cuando el virus infeccioso ya no es detectable, demostrándose que la detección del virus mediante pruebas rápidas de detección de antígenos (Ag-RDT) tiene una mejor correlación con la infecciosidad. Los gradientes reflejan la variabilidad entre individuos (un tono más claro hacia el final de la infección muestra que se siguen detectando cargas virales en algunos individuos, pero no en todos). La línea discontinua gris marca la infección inicial, las líneas discontinuas azules marcan el periodo positivo de la PCR y las líneas discontinuas rojas marcan la positividad de Ag-RDT. Figura tomada de Puhach et al. 2022³⁶.

Individuos de todas las edades son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, con una media de edad de alrededor de 50 años. Sin embargo, las manifestaciones clínicas

difieren con la edad. En general, hombres de edad avanzada (>60 años) con comorbilidades son más propensos a desarrollar enfermedad respiratoria severa que requiera hospitalización o incluso lleve a la muerte, mientras que la mayoría de la personas jóvenes y niños tienen únicamente síntomas leves o son asintomáticos³⁵. Los síntomas más comunes de la infección son fiebre, fatiga y tos seca. Menos comunes son producción de esputo, dolor de cabeza, hemoptisis, diarrea, anorexia, dolor de garganta, dolor en el pecho, escalofríos, náuseas y vómitos. También se han reportado alteraciones del gusto y el olfato como consecuencia de la infección. Los síntomas predominantes también se han asociado a las diferentes variantes virales, habiéndose registrado variaciones en la presentación clínica de la infección a medida del surgimiento de estas³⁷. En un reporte de 72314 casos en China, 81% de los casos fueron clasificados como leves, 14% fueron casos severos que requirieron ventilación en una unidad de cuidados intensivos (UCI), y un 5% fueron pacientes críticos (con falla respiratoria, shock séptico y/o disfunción o fallo multiorgánico)³⁸. La mayoría de las personas muestran señales de enfermedad luego de un período de incubación de 1-14 días, siendo lo más común 5 días, y desarrollo de disnea y neumonía con una media de 8 días desde el comienzo de los síntomas (Figura 3).

El diagnóstico temprano ha sido crucial para controlar la expansión del COVID-19. La detección mediante técnicas moleculares de la presencia del ácido nucleico del SARS-CoV-2 es la técnica patrón para el diagnóstico de infección activa por el virus, existiendo diversas pruebas comerciales para esto, dirigidas a los genes ORF1b, N, E o S. El tiempo de detección va desde unos minutos a varias horas dependiendo de la tecnología empleada. Aunque el SARS-CoV-2 puede ser detectado en una variedad de muestras de origen respiratorio, la carga viral suele ser más alta en muestras del tracto respiratorio bajo. Más recientemente las técnicas que permiten la detección de antígenos virales, incluidas las pruebas Ag-RDT, también han ocupado un lugar central en el diagnóstico de la infección viral aguda.

1.1.3. Infección por SARS-CoV-2 en individuos inmunocomprometidos

La carga viral, factores propios del individuo y la presencia de comorbilidades pueden afectar la severidad del COVID-19³⁹. La evidencia sugiere que algunos individuos con alteraciones en su inmunidad, incluyendo los receptores de trasplantes de órganos sólidos (RTOS) y pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), incluidos aquellos en

diálisis, pueden tener un riesgo mayor de complicaciones y muerte debido a la infección por SARS-CoV-2⁴⁰⁻⁴⁴. Esto se atribuye a la presencia habitual de múltiples comorbilidades, al estado de inmunosupresión, natural o por uso de fármacos, y a la respuesta reducida a la vacunación.

Las infecciones son una causa común de morbilidad luego del trasplante, dando cuenta de una alta proporción de muertes en pacientes con trasplantes funcionales. El uso de drogas inmunosupresoras para controlar la alorreactividad y evitar el rechazo, es un punto de preocupación en RTOS expuestos al SARS-CoV-2. Estudios poblacionales y de metaanálisis reportaron una mortalidad a corto plazo de 19%-31% por COVID-19 en trasplantados renales (TR)⁴⁵⁻⁴⁷. Datos del registro de EE. UU. dan cuenta que el 16% de las muertes en este grupo, en el año 2020, son atribuibles a la COVID-19⁴⁸. Además, una comparación directa entre trasplantados y pacientes en lista de espera, sugiere un riesgo mayor de enfermedad severa y muerte en los primeros⁴⁹. Entre los trasplantados hepáticos (TH), varios estudios en EE. UU. y Europa han mostrado una tasa de mortalidad cercana al 20%, en línea con lo observado en los RTOS en general. Sin embargo, a pesar de las consideraciones iniciales respecto a que los TH, por su estado de inmunosupresión, podían verse impactados de manera más severa por COVID-19, las comorbilidades médicas no asociadas al trasplante parecen ser las que dirigen el resultado clínico. En línea con esto, en algunos estudios comparativos, el curso clínico de la infección fue similar entre trasplantados y no trasplantados cuando se compararon cohortes cuidadosamente pareadas. Esto sugiere que el enriquecimiento en factores de riesgo asociados a un peor desenlace de la enfermedad por COVID-19 que presentan los RTOS tendría una influencia mayor que el estado de inmunosupresión en su alta morbi-mortalidad frente a la infección.

Por el contrario, algunos estudios europeos mostraron tasas de mortalidad frente a la infección por SARS-CoV-2 significativamente elevadas en el primer período luego del trasplante, sugiriendo que la intensidad de la inmunosupresión podría impactar en el desenlace de la enfermedad^{50,51}. Los regímenes de inmunosupresión usados en el trasplante pueden afectar el sistema inmune a múltiples niveles por lo que el tipo de drogas utilizadas podría tener un impacto significativo en el desenlace de la COVID-19 en pacientes trasplantados. Por ejemplo, algunos trabajos sugieren la posibilidad de que los inhibidores de calcineurina, como la Ciclosporina A y el Tacrolimus, podrían no ser perjudiciales para la evolución clínica de la infección⁵², e incluso en algunos estudios se

encontraron tasas de mortalidad reducidas en TR tratados con Ciclosporina A^{53,54} y en TH tratados con Tracolimus⁵⁵. El uso de Ciclosporina A también se asoció con un mejor desenlace de la enfermedad en un estudio observacional retrospectivo⁵⁶. La Ciclosporina A tiene efectos antivirales ampliamente conocidos, y varios trabajos han caracterizado su capacidad para inhibir la replicación del SARS-CoV-2 en modelos celulares relevantes. De hecho, hay varios ensayos clínicos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) que están analizando el efecto de esta droga en el desenlace del COVID-19. Sin embargo, el uso de otros regímenes de inmunosupresión, como el micofenolato de mofetilo se han asociado a un peor desenlace de la enfermedad.

Además de los pacientes trasplantados, existen otros grupos de individuos que presentan alteraciones de la inmunidad asociadas a la presencia de patologías de base que podrían afectar el desenlace de la enfermedad por COVID-19. La ERC se asocia con los fenómenos de inmunosenescencia acelerada y de envejecimiento inflamatorio, que llevan a una activación crónica y disfuncional del sistema inmune, y genera que estos pacientes presenten una respuesta alterada frente a las infecciones. En la actualidad está claramente establecido que la ERC es un factor de riesgo preponderante para el desarrollo de COVID-19 grave⁵⁷. A su vez, el daño renal agudo es una consecuencia relativamente común de la COVID-19, aumentando el riesgo de desarrollar ERC para quienes cursan la infección⁵⁸. Numerosos estudios multicéntricos alrededor del globo han documentado tasas más altas de mortalidad a corto plazo por COVID-19, de entre 20% y 30%, en pacientes en diálisis crónica (PDC)⁵⁹⁻⁶⁴. Estudios poblacionales sugieren un incremento de cuatro veces en la mortalidad comparado con pacientes que no se encuentran en diálisis, incluso después de ajustar los datos por factores demográficos y por la presencia de comorbilidades, que son altamente prevalentes en pacientes en diálisis y que afectan la severidad de la enfermedad por COVID-19, como ser: hipertensión arterial, *diabetes mellitus*, obesidad, enfermedad cardiovascular y bajo estatus socioeconómico^{65,66}. Aunque no es simple comparar pacientes en hemodiálisis (HD) y diálisis peritoneal (DP) por las diferencias basales entre los mismos, la severidad de la enfermedad por COVID-19 parece ser similar entre ambos grupos^{67,68}. Los PDC con un desenlace fatal de la enfermedad presentan períodos significativamente más cortos entre el comienzo de los síntomas y la muerte, lo que indicaría que no cuentan con los mecanismos adecuados para el control de la infección en etapas tempranas⁶⁹⁻⁷¹. En Uruguay, mientras que la mortalidad por COVID-19 en la población general fue del 1,6% de los pacientes infectados, en los pacientes

con ERC pertenecientes al programa de salud renal la mortalidad global fue de 9,3%, y de 21% para los PDC⁷², valores similares a los reportados internacionalmente.

Los resultados aparentemente contradictorios en cuanto al impacto de la enfermedad por COVID-19 en pacientes inmunosuprimidos y el efecto del uso de drogas inmunosupresoras, pueden atribuirse, al menos parcialmente, a las características propias de la enfermedad, donde una respuesta inmunitaria disminuida puede ser perjudicial para controlar la replicación viral en etapas iniciales, pero beneficiosa para evitar la inflamación exacerbada que caracteriza las formas graves de la enfermedad en etapas tardías. De hecho, el control de la replicación viral y la eliminación del virus es un punto de especial preocupación en los pacientes inmunosuprimidos que cursan la infección por SARS-CoV-2.

Usualmente, los individuos inmunocompetentes dejan de presentar síntomas por COVID-19 a los 5-10 días de comenzar a cursar la enfermedad. El cultivo viral es la técnica definitiva para determinar la presencia de partículas virales infectivas en una muestra. Sin embargo, dadas las dificultades asociadas a este procedimiento, otras aproximaciones diagnósticas como la PCR a partir de exudado nasofaríngeo, han sido utilizadas para estimar la carga viral de SARS-CoV-2. Aunque la PCR evidencia partículas virales tanto infectivas como no infectivas, el ciclo de amplificación puede ser empleado para estimar la carga viral en muestras longitudinales de un mismo individuo^{73,74}. Con este abordaje, se estimó que un 58%-83% de los individuos sanos eliminaron el virus para el día 28 desde el comienzo de síntomas, con una media de 7-12 días para presentar carga viral indetectable⁷⁵ (Figura 3). Sin embargo, en individuos con diversas formas de desregulación inmunológica la ventana de liberación de partículas virales, incluso de partículas infectivas, puede persistir por meses, con una media de 20 días⁷⁶. Los pacientes con ERC, en particular los PDC, presentan de manera característica un retraso en la eliminación del virus luego de la resolución clínica de la infección por SARS-CoV-2⁷⁷⁻⁷⁹. La media de tiempo entre la admisión y un resultado por PCR negativo es de 18 días para los pacientes con enfermedad renal, siendo la función renal disminuida un predictor independiente del tiempo transcurrido para la eliminación viral⁷⁹. También se ha reportado que una proporción relativamente alta de TR pueden liberar partículas virales infectivas por un período de hasta tres semanas luego del comienzo de la infección⁸⁰. Este retraso para eliminar el virus en pacientes inmunosuprimidos tiene implicancias relativas no solo al contagio de la enfermedad y la

necesidad de períodos de aislamiento mayores, sino también a la posibilidad del surgimiento de variantes virales.

1.1.4. COVID-19 en Uruguay

Desde el reporte de los primeros casos de COVID-19 en noviembre de 2019 en China, hasta noviembre de 2023, se han reportado a nivel mundial más de 772 millones de casos y casi 7 millones de muertes⁸¹, cifras que pueden ser superiores teniendo en cuenta las dificultades de testeo y reporte en algunos lugares, y en ciertos períodos de tiempo, en el transcurso de la pandemia.

Casos totales de COVID-19 y evolución temporal del número de casos



Muertes asociadas a COVID-19 acumuladas y evolución temporal

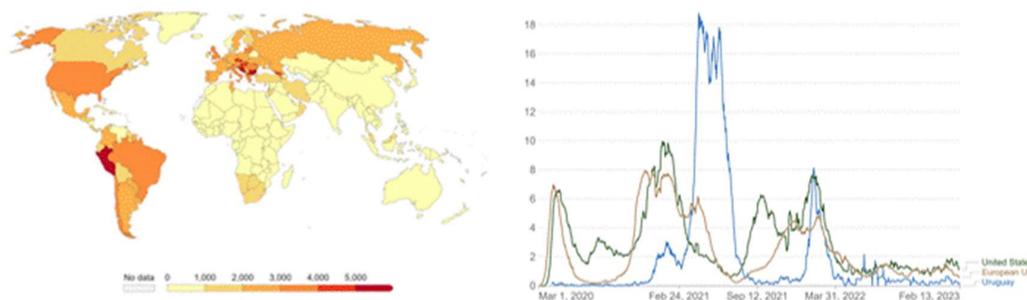


Figura 4. Casos totales de COVID-19 y muertes asociadas. Se muestra el número total de casos de COVID-19 y muertes acumuladas a febrero de 2022 en el mundo. Se compara la evolución temporal en esto parámetros en Uruguay (azul), con lo registrado en EE. UU. (negro) y la Unión Europea (naranja) por millón de habitantes. Figuras generadas en <https://ourworldindata.org/> en febrero de 2023.

Los primeros casos de infección por SARS-CoV-2 en Uruguay fueron confirmados el 13 de marzo de 2020 por parte del Ministerio de Salud Pública (MSP)⁸². Se trató de personas que ingresaron al país entre el 3 y 7 de marzo de 2020 provenientes de Europa y presentaron síntomas leves de la enfermedad⁸². Ese mismo día se decretó el estado de emergencia sanitaria nacional⁸³, el cual fue levantado por el gobierno en abril de

2022. Durante el año 2020 el país no experimentó grandes olas de contagios, sino que la epidemia se caracterizó por brotes, con una estrategia de contención basada en el testeo, rastreo de contactos y aislamiento, destacada a nivel mundial⁸⁴. A finales de 2020 comenzaron a aumentar los contagios, registrando un récord de casos, muertes y una positividad en el testeo de 14,29% el 10 de enero de 2021. Durante algunas semanas de abril y mayo de 2021 Uruguay se convirtió en uno de los países con mayor índice de contagios y muertes del mundo (Figura 4). Como se mencionará más adelante, este período coincidió con el desarrollo de la campaña nacional de vacunación masiva contra COVID-19. El 27 de diciembre de 2021 el MSP confirmó los primeros casos de la variante ómicron en el país⁸⁵, a lo que siguió una nueva ola de contagios. Al 20 de mayo de 2023 se registraban un total de 1.038.744 casos confirmados de COVID-19 acumulados en Uruguay y 7634 muertes asociadas a la enfermedad⁸⁶.

1.1.5. Variantes virales del SARS-CoV-2

Variantes y mutantes del SARS-CoV-2 han emergido en el transcurso de la pandemia debido a diversos factores, como ser: la evolución y adaptación del virus al hospedero, factores ambientales, mutaciones genómicas involucrando inserciones y deleciones, y eventos de recombinación a nivel del genoma viral³. Unas pocas de estas variantes han tenido la capacidad de esparcirse rápidamente a varios países del mundo provocando las diversas olas de COVID-19 que han caracterizado la pandemia. Dependiendo del grado de variación genómica y adaptación, estas variantes pueden tener una mayor transmisibilidad y/o causar una enfermedad más grave, con mayor mortalidad⁸⁷. Incluso se ha visto limitada la eficacia de las vacunas y terapias disponibles actualmente, determinando nuevas infecciones en individuos vacunados o recuperados de infecciones previas, y dificultando enormemente lograr una inmunidad de rebaño esterilizante⁸⁸. Una amplia red de instituciones y expertos han monitoreado la evolución del SARS-CoV-2 a nivel mundial desde enero de 2020⁸⁹. A final de 2020, la aparición de variantes que implicaban un aumento del riesgo para la salud pública global llevó a la caracterización de variantes virales específicas.

Las variantes emergentes del SARS-CoV-2 son clasificadas en cuatro categorías por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU.⁹⁰: variantes de preocupación (VOC, por “*variant of concern*”), variantes de interés (VOI, por “*variant of interest*”), variantes bajo monitoreo (VBM, “*variant being monitored*”), y variantes de alta

consecuencia (VOHC, “*variant of high consequence*”). La OMS distingue tres de estas categorías, VOC, VOI, y VOHC, y a principio de año agregó una nueva categoría a la que llamó “Subvariantes Ómicron Bajo Monitoreo”⁸⁹. Esta clasificación se basa en la predominancia de determinada variante a nivel regional, y el impacto potencial o conocido del conjunto de mutaciones que presenta en los métodos diagnósticos, la efectividad de las medidas de prevención y terapéuticas disponibles, la severidad de la enfermedad generada y la capacidad de la variante de transmitirse de persona a persona. Dada la continua evolución del SARS-CoV-2 y el conocimiento del impacto de las variantes en la salud pública, las mismas pueden ser reclasificadas basado en sus atributos y su prevalencia, también puede haber diferencias en la clasificación dependiendo de la situación particular en una determinada región. Una VOC se define como aquella que cumple con los criterios de VOI y además se ha demostrado su asociación con alguno de los siguientes cambios, a un nivel de significancia para la salud pública global: i) aumento de la transmisibilidad o cambio en detrimento de la epidemiología del COVID-19, ii) aumento en la virulencia o cambios en la manifestación clínica de la enfermedad o, iii) disminución en la efectividad de las medidas de salud pública o sociales, o de los métodos diagnósticos, vacunas y terapias disponibles⁸⁹.

Al 22 de febrero de 2023 la única variante de SARS-CoV-2 catalogada como VOC era Ómicron (B.1.1.529) incluidas BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5 y los linajes descendientes, mientras que dentro de las VOC que circularon previamente se incluyen las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) y Delta (B.1.617.2)⁸⁹ (Figura 5). La sustitución D614G fue una de las primeras modificaciones en la proteína S detectada y rápidamente predominó en todas las variantes surgidas en el mundo. Aunque las variantes con esta modificación mostraron ser más infecciosas⁹¹⁻⁹³, la neutralización mediada por el plasma de individuos convalecientes continuó siendo efectiva^{94,95}. La variante Alfa fue descrita por primera vez a finales de setiembre de 2020 y rápidamente se convirtió en la variante predominante en el Reino Unido⁹⁶. Por su parte, la variante Beta, detectada en octubre de 2020, se convirtió en la variante dominante durante la segunda ola de COVID-19 en Sudáfrica⁹⁷. De manera similar, la variante Gamma fue encontrada en enero de 2021 en cuatro individuos brasileños que viajaban a Japón⁹⁸ y fue la responsable por el resurgimiento de infecciones en la ciudad de Manaus, a pesar de los altos niveles de infección registrados previamente en esta ciudad⁹⁹. La variante Delta, detectada inicialmente en diciembre de 2020, fue responsable de un crecimiento masivo de casos, dando lugar a la segunda ola de COVID-19 en India^{100,101} y nuevas infecciones en múltiples lugares de EE. UU¹⁰². Por último, la variante Ómicron, última en

ser designada como VOC por la OMS¹⁰³, fue detectada en noviembre de 2021 por laboratorios de vigilancia genómica de Sudáfrica y encontrada en varios países del mundo (Figura 5).

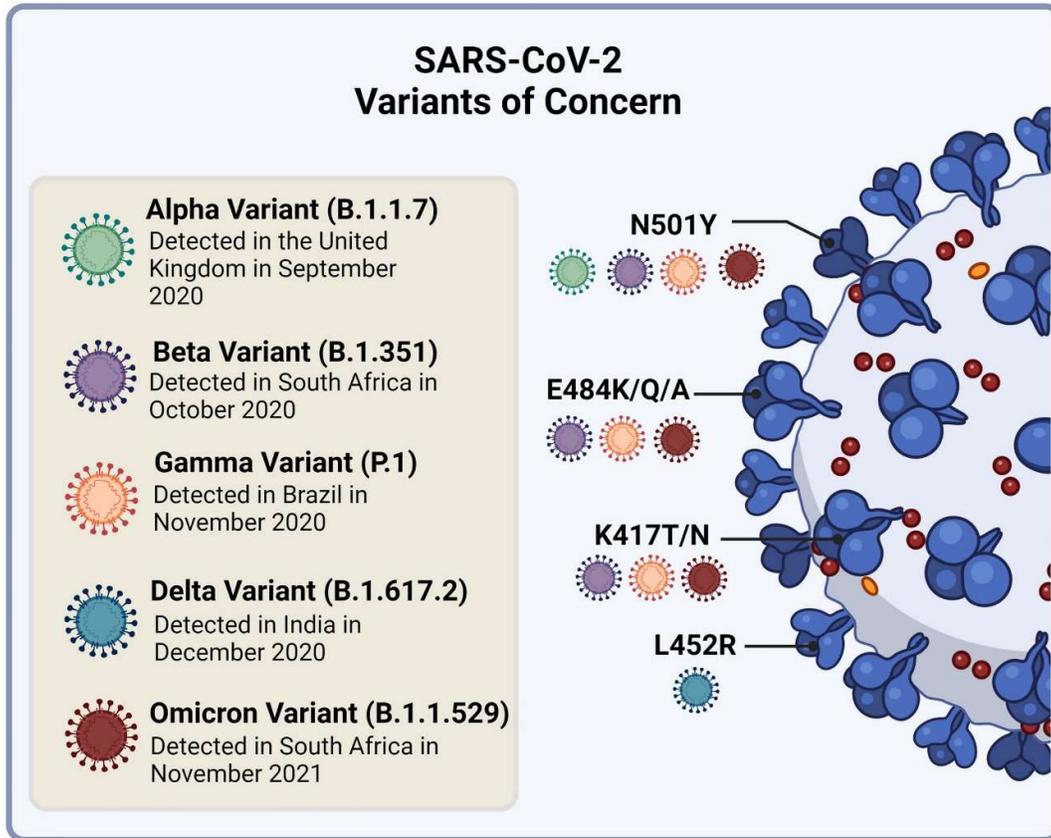


Figura 5. Variantes virales de preocupación del SARS-CoV-2 y sustituciones aminoacídicas en el RBD de interés por su efecto en la virulencia o evasión inmunológica. La sustitución N501Y es común a las cepas variantes Alfa, Beta, Gamma y Omicron. Las sustituciones E484K/Q/A y K417T/N están presentes en las cepas Beta, Gamma y Omicron, mientras que la sustitución L452R es exclusiva de la variante Delta. Imagen generada por los autores utilizando BioRender y tomada de Mistry et al. 2022³

Las VOC de SARS-CoV-2 que han emergido comparten patrones comunes de mutaciones en su proteína S pero cada variante presenta a su vez nuevas modificaciones. Hay cuatro sustituciones aminoacídicas principales en el RBD que han sido el foco de estudios sobre la virulencia y evasión inmunológica de estas variantes. La primera es la N501Y encontrada en el sitio de unión del RBD a ACE2, común a las variantes Alfa, Beta, Gamma y Ómicron⁸⁸. Las dos sustituciones E484K/Q/A y K417T/N están presentes en las variantes Beta, Gamma y Ómicron, mientras que la modificación L452R es exclusiva de la variante Delta⁸⁸. Además, la variante Ómicron tiene entre 26 y 32 cambios aminoacídicos en la proteína S que son foco de interés. (Figura 5)

En Uruguay también se realizó vigilancia genómica de las variantes de SARS-CoV-2 que se encontraban circulando en el país¹⁰⁴. Como se puede observar en la Figura 6, y fuera reportado en su momento por el Grupo de Trabajo Interinstitucional de Vigilancia de SARS-CoV-2¹⁰⁵, en febrero-marzo de 2021 se registró el ingreso a nuestro país de la variante Gamma, lo que fue atribuido a la movilidad con Brasil a través de la frontera seca. Esta variante fue responsable de la ola de casos de COVID-19 registrada en Uruguay entre febrero y junio de ese año¹⁰⁶. En agosto de 2021 se identificó la presencia de la variante Delta que para octubre ya había desplazado por completo a Gamma. En diciembre de 2021 se emitió el primer reporte de la presencia de la variante Ómicron en nuestro país⁸⁵ y para febrero de 2022 ya era la predominante¹⁰⁷. Esta variante fue responsable de una ola de casos de COVID-19, aunque, probablemente debido a la alta cobertura vacunal, esto no se tradujo en un número elevado de muertes.

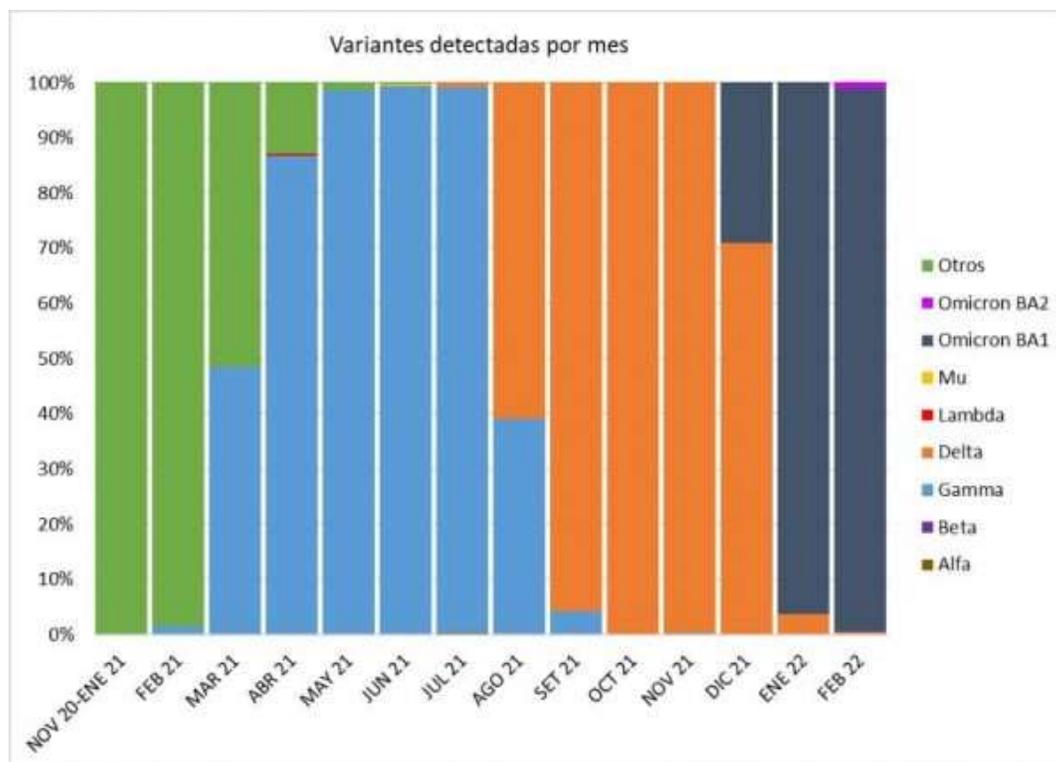


Figura 6. Variantes virales de SARS-CoV-2 en Uruguay. Proporción de variantes virales detectadas por mes en Uruguay por el Grupo de Trabajo Interinstitucional de Vigilancia de SARS-CoV-2. Figura extraída de <https://pasteur.uy/en/news/one-year-monitoring-sars-cov-2-variants/>

1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

El sistema inmunitario se divide comúnmente en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. Si bien ambos están interconectados y actúan de manera coordinada, cada uno cumple tareas particulares y está conformado por distintos tipos celulares. El sistema inmune innato actúa como primera línea de defensa contra los patógenos, incluido el SARS-CoV-2. La respuesta inmune innata limita la entrada, traducción, replicación y ensamblado viral, ayuda a identificar y eliminar células infectadas, y coordina el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa rápida. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en las membranas celular y endosomal, y en el citosol responden a la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) gatillando respuestas inflamatorias que limitan la infección y promueven la eliminación del virus¹⁰⁸. Sin embargo, una activación inmune excesiva puede llevar a inflamación sistémica y enfermedad grave. En respuesta al control viral ejercido por la inmunidad los CoV han adquirido estrategias de evasión que limitan el reconocimiento por el sistema inmune y aumentan su transmisión y replicación¹⁰⁹.

El sistema inmune adaptativo está integrado por tres grupos celulares principales: los linfocitos B, los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+. La respuesta inmune adaptativa es más lenta que la respuesta inmune innata ya que se deben seleccionar y expandir células específicas del virus a partir de un enorme conjunto de células B y T vírgenes con especificidades diversas. A este paso inicial de selección le sigue otra etapa de expansión y diferenciación de estas células vírgenes en células efectoras. Luego de que se desencadena la respuesta inmune adaptativa se necesitan al menos de 6 a 10 días para generar un número de células efectoras B (células secretoras de anticuerpos) y T (T CD4+ colaboradoras y T CD8+ citotóxicas) suficiente para que actuando en conjunto logren controlar y eliminar la infección viral. A pesar de que en la mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 se genera una respuesta humoral y celular robusta, hasta un 20% de los pacientes con COVID-19 muestran una respuesta inmune adaptativa pobre. En el caso de la infección por SARS-CoV-2 la respuesta inmune que se genera en respuesta al virus es particularmente relevante, ya que se asocia de manera clara con la evolución clínica de la enfermedad^{110,111}.

1.2.1. Respuesta inmune innata a la infección por SARS-CoV-2

Las células de la inmunidad innata, incluyendo macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células linfoides innatas (ILCs) como ser las células “natural killer” (NK), están equipadas con un arsenal de PRRs que reconocen PAMPs o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) induciendo la activación de vías de señalización inflamatoria y gatillando respuestas inmunes. Las cinco principales familias de PRRs comprenden: los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo RIG-I (RLRs), los receptores tipo NOD (NLRs), los receptores tipo lectina C y los receptores tipo AIM-2¹⁰⁸. Al momento, varios PRRs, en particular TLRs, RLRs, NLRs e inflamasomas han sido descritos como mediadores de la activación de vías de señalización en respuesta al reconocimiento del SARS-CoV-2¹¹² (Figura 7). Como en la mayoría de las infecciones virales, el primer paso crucial en la respuesta a la infección por CoV es la producción de interferones de tipo I (IFN-I) y de tipo III (IFN-III), así como la activación del fenómeno de muerte celular programada para eliminar células infectadas. Para el SARS-CoV-2 se han propuesto como principales PAMPs los intermediarios de replicación basados en ARN, que podrían ser reconocidos tanto por TLRs como como por receptores citoplasmáticos.

En lo que respecta a los TLRs, la infección por un virus a ARN podría ser censada a través del reconocimiento de ARN doble hebra, ARN simple hebra o ADN extracelulares a través del TLR3, TLR7/8 o TLR9 (Figura 7). En este sentido, alteraciones genéticas en el gen *TLR7* se han asociado a COVID-19 grave en individuos jóvenes, sugiriendo un rol protector de este receptor en la infección^{113,114}. Por otra parte, el TLR2 estaría involucrado en la generación de citoquinas proinflamatorias en respuesta al SARS-CoV-2, siendo un posible blanco para modular la respuesta inflamatoria exacerbada durante la infección¹¹⁵. Se ha propuesto a la proteína E como ligando viral de este receptor, aunque esto todavía no es del todo claro¹¹⁵.

A nivel citoplasmático el ARN simple hebra derivado del SARS-CoV-2 podría ser detectado por RIG-I, MDA-5 y LGP2 (Figura 7). De estos receptores se ha demostrado que MDA5 es crítico en el reconocimiento del SARS-CoV-2¹¹⁶, y LGP2 también participaría en la respuesta antiviral, mientras que el rol de RIG-I es controversial. Luego de su modificación postraduccional y activación, MDA5 se transloca a la mitocondria donde interacciona con la proteína adaptadora mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) para formar el MAVS señalosoma. La formación de este complejo activa TRAF3, TBK1 e IKK que inducen la fosforilación del IRF3 facilitando su traslocación al

núcleo y la transcripción de los genes de IFN-I e IFN-III. Los IFN producidos y liberados actúan a través de los receptores de IFN de manera autocrina y paracrina estimulando la transcripción de cientos de genes de respuesta al interferón (ISG) con variadas funciones antivirales. A modo de ejemplo, el ISG Ly6E previene la entrada del SARS-CoV-2¹¹⁷, miembros de la familia IFIT inhiben la replicación viral y BST2 puede bloquear la salida de viriones en líneas celulares que expresan estos ISG de manera ectópica o estable¹¹⁸.

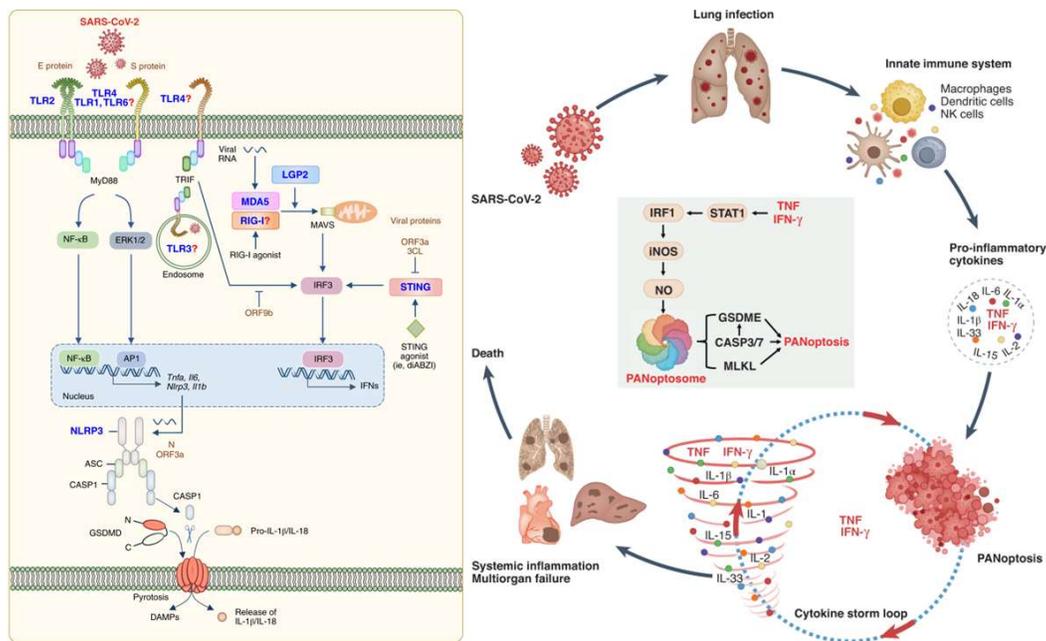


Figura 7. Respuesta inmune innata a la infección por SARS-CoV-2. PRRs en la superficie celular, las membranas endosómicas y en el citosol pueden responder a los PAMP del SARS-CoV-2 para activar vías de señalización de la inmunidad innata. TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 pueden enviar señales a través de MyD88 para activar las vías de señalización de NF-κB y MAPK para inducir la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias. TLR3 y TLR4 pueden enviar señales a través de TRIF para activar IRF3 e inducir la expresión de IFN tipo I y tipo III. Fuerte evidencia experimental respalda la activación de TLR2 mediada por el SARS-CoV-2, mientras que la activación de TLR1, TLR3, TLR4 y TLR6 se ha sugerido mediante estudios asociativos y bioinformáticos. La señalización a través de RIG-I, MDA5 y STING también activa IRF3 y la producción de IFN tipo I y tipo III. Los datos sobre la activación de RIG-I durante la infección por SARS-CoV-2 siguen siendo contradictorios. La formación del inflamasoma NLRP3 también puede ocurrir en respuesta a la infección por SARS-CoV-2, lo que lleva a la escisión de GSDMD para formar poros de membrana y liberar IL-1β e IL-18 e inducir piroptosis. Los signos de interrogación indican sensores que se espera que participen en la detección del SARS-CoV-2 pero que no han sido validados experimentalmente hasta la fecha. CASP, caspasa. Panel izquierdo. La inducción de la señalización inmune innata durante la infección por SARS-CoV-2 conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias. El TNF y el IFN-γ inducen una forma de muerte celular inflamatoria llamada PANoptosis, que está mediada por la formación de un complejo multiproteico llamado PANoptosoma. La PANoptosis mediada por TNF e IFN-γ puede conducir a un bucle de tormenta de citoquinas, así como la inflamación sistémica, la insuficiencia multiorgánica y la letalidad. Panel derecho. Figuras tomadas de Diamond et al. 2022¹¹².

La importancia de la respuesta de IFN frente a los CoV ya se había evidenciado previamente, la base de este fenómeno recae en que los CoV provocan una respuesta de IFN-I sistémica que sirve para proteger a órganos distales de la infección. En

ausencia de este mecanismo estos tejidos lejanos son más susceptibles en presencia de una baja carga viral lo que se traduce en un aumento de la patología¹¹⁹⁻¹²¹. Esta dinámica se evidenció para la infección por SARS-CoV-2 al encontrarse que individuos jóvenes con mutaciones en los genes *IFNAR* o *TLR*^{122,123}, e individuos con autoanticuerpos anti-IFN-I^{124,125} presentaban un mayor riesgo de COVID-19 grave y muerte. A su vez, diferencias en la expresión a nivel anatómico de PRRs, IFN-I o IFN-III, o ISGs durante la infección también se han asociado a la severidad de la COVID-19 de manera independiente de la edad¹²⁶⁻¹²⁸. Tratamientos con IFN-I o -III exógenos o con drogas que estimulen esta vía se han propuesto para el tratamiento de la COVID-19 en etapas tempranas de la enfermedad.

Por último, también se ha reportado que los NLRs responden a la infección por el SARS-CoV-2 induciendo la producción de IFN-I y citoquinas proinflamatorias (Figura 7). En este sentido, niveles elevados de IL-1 β e IL-18 en plasma se han correlacionado con la severidad y mortalidad de la enfermedad en pacientes con COVID-19^{129,130}. Varios trabajos han mostrado que el inflammasoma NLRP3 es capaz de censar la infección por SARS-CoV-2, y también se ha sugerido la participación de AIM-2 y NLRC1 en esta respuesta¹³¹. Dada la relevancia que tendría el inflammasoma en la patología de la COVID-19 también se han evaluado tratamientos anti-IL-1 para formas graves de esta enfermedad.

La activación de PRRs en respuesta a la infección por el SARS-CoV-2 estimula la producción concomitante de IFN y citoquinas proinflamatorias, muchas de las cuales están elevadas en pacientes con COVID-19 (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- β , IFN- γ , IL-17, y otras)^{132,133}. Estas citoquinas participan tanto en el control de la infección como en el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, la liberación desregulada de citoquinas proinflamatorias contribuye a que se desencadene la tormenta de citoquinas, una condición grave caracterizada por la producción excesiva de citoquinas a través de un proceso de muerte celular inflamatoria llamado PANoptosis¹³⁴ (Figura 7). En el contexto de la COVID-19 el TNF y el IFN- γ contribuyen a la patogénesis de la enfermedad a través de este fenómeno y anticuerpos bloqueantes de estas citoquinas han mostrado buenos resultado en modelos animales¹³⁵. La conexión entre una señalización por citoquinas excesiva y la muerte celular inflamatoria puede explicar el daño multiorgánico observado en algunos pacientes con COVID-19. Por ejemplo, la evidencia sugiere que el daño estructural de la membrana de las células endoteliales

contribuye con el inicio y propagación del síndrome de distrés respiratorio agudo durante la infección por SARS-CoV-2¹³⁶. El síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C) que se ha descrito en algunos niños con COVID-19 se caracteriza por daño vascular, incluida la lesión de vasos del corazón, el cual se ha propuesto estaría causado por el TNF y el IFN- γ ¹³⁷. Además, las vías que evitan la coagulación pueden ser bloqueadas por citoquinas proinflamatorias lo que explicaría algunas de las complicaciones tromboembólicas reportadas durante la COVID-19¹³⁸. Otro evento característico de la inmunopatogenia de la infección por SARS-CoV-2 es la depleción de centros germinales en bazo y nodos linfáticos¹³⁹, lo que podría ser atribuido a la muerte celular de linfocitos promovida por la señalización de citoquinas proinflamatorias. La liberación masiva de TNF e IFN- γ puede llevar a linfopenias e inmunosupresión, de hecho, grandes cantidades de TNF fueron encontradas en los centros germinales remanentes de pacientes con formas graves de COVID-19. Esto puede limitar los procesos de maduración de la afinidad y cambio de clase de las células B, y la producción de anticuerpos maduros, con efectos deletéreos en la progresión de los pacientes^{139,140}. Además de estas citoquinas, niveles elevados de IL-6 se han asociado con la severidad de la enfermedad^{132,133,141}, y con un incremento en la proteína C reactiva (PCR) La PCR está vinculada funcionalmente con la activación del complemento y el proceso inflamatorio, y se conoce que la IL-6 juega roles duales durante las infecciones virales con efectos patológicos y protectores. Por estas razones drogas con efecto inmunomodulador capaces de disminuir la respuesta inflamatoria, incluidos el baricitinib (inhibidor de JAK1 y JAK2)¹⁴² y tocilizumab (anticuerpo bloqueante del receptor de IL-6)¹⁴³, han sido evaluados y aprobados para el tratamiento de formas graves de COVID-19.

En conclusión, el sistema inmune innato utiliza una vasta variedad de sensores, incluidos TLRs, RLRs, NLRs e inflamosomas, y moléculas efectoras para detectar de manera directa o indirecta componentes del SARS-CoV-2. Esto genera que se desencadenen eventos claves para reducir la replicación viral y eliminar las células infectadas de manera de evitar la diseminación del virus, como ser la señalización mediada por IFN, la producción de citoquinas proinflamatorias, y la muerte celular programada. Sin embargo, aunque no abordados en esta introducción, el SARS-CoV-2 cuenta con proteínas y mecanismos que le permiten contrarrestar las defensas innatas del hospedador. Como complicación adicional la activación exacerbada de la inmunidad se asocia a muerte celular, tormenta de citoquinas, enfermedad grave y muerte. Por lo

que es necesario encontrar un correcto balance entre promover la actividad antiviral sin causar una respuesta inflamatoria patológica.

1.2.2. Respuesta inmune adaptativa a la infección por SARS-CoV-2

La respuesta inmune adaptativa es importante para controlar y eliminar la mayoría de las infecciones virales. Los tres componentes fundamentales del sistema inmune adaptativo son las células B (fuente de anticuerpos), y las células T CD4+ y CD8+, estos actores pueden tener funciones diferentes dependiendo de cuál es el agente infeccioso en cuestión. En la actualidad parece cada vez más claro que estos tres compartimentos contribuyen al control de la infección por SARS-CoV-2, tanto en los casos de COVID-19 leves como en aquellos que requieren de hospitalización (Figura 8). En respuesta a la infección por SARS-CoV-2 se generan tanto anticuerpos como células T CD4+ y CD8+ específicas¹⁴⁴.

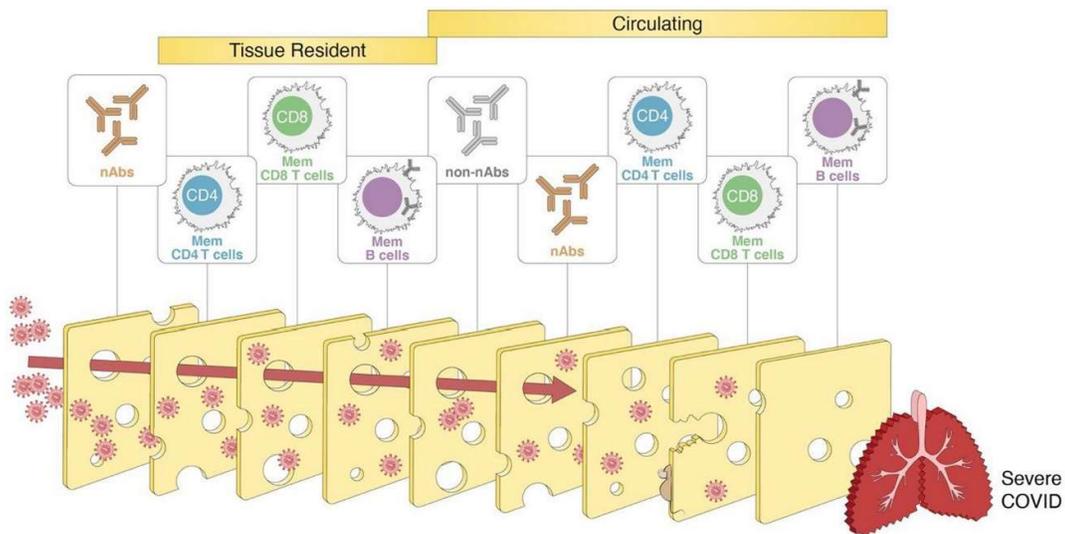


Figura 8. Modelo en capas de protección por parte de la inmunidad adaptativa contra el SARS-CoV-2. Diversos componentes de la inmunidad adaptativa con diferentes características y ubicados en distintos sitios anatómicos actúan como barreras para evitar, contener y eliminar la infección por el SARS-CoV-2 evitando en última instancia el desarrollo de formas graves de COVID-19. Es probable que múltiples tipos de inmunidad adaptativa con diversos mecanismos y ubicaciones proporcionen capas de defensa contra el COVID-19. Conceptualmente, las defensas en capas son como un “modelo de queso suizo”: aunque cada capa es imperfecta, en conjunto hacen que sea muy improbable que el patógeno rompa todas las capas de defensa. Gráfico inspirado en el modelo de queso suizo de defensas en capas de enmascaramiento y salud pública de Ian M. Mackay. Tomado de Goldblat et al. 2022¹⁴⁴.

En lo que respecta a la respuesta de anticuerpos la gran mayoría de los individuos infectados por SARS-CoV-2 muestran seroconversión en el período de 5 a 15 días luego

del comienzo de síntomas¹⁴⁵⁻¹⁴⁹. Los principales antígenos virales utilizados para evaluar seroconversión han sido aquellos derivados de la proteína S (S, S1 o RBD), y la proteína N. En este sentido, los títulos de IgG contra estas dos proteínas muestran una alta correlación¹⁵⁰. La tasa estimada de seroconversión contra la proteína S va del 91% al 99% cuando se analizan cohortes numerosas de pacientes^{151,152}. Con respecto a la cinética de generación de anticuerpos específicos, los de tipo IgM e IgA séricos aparecen antes que los IgG, tienen un pico entre las 2 y 5 semanas después de la infección y luego decaen, aunque las IgA persistirían por más tiempo que las IgM (Figura 9). Los anticuerpos de tipo IgG ya comienzan a ser detectables a los 8 días luego del comienzo de síntomas, tienen su punto máximo alrededor de las 3-7 semanas y luego persisten en el tiempo por períodos prolongados¹⁵³ (Figura 9). Varios factores, como la edad y el sexo pueden influir en la cinética de generación de anticuerpos. La concentración de todos los isotipos de anticuerpos correlaciona con la gravedad de la enfermedad, con títulos de anticuerpos específicos mayores en aquellos pacientes que presentaron formas más graves de COVID-19 y más bajos en los casos de infección asintomática^{110,154}. Se ha demostrado a su vez que si bien en los casos graves de COVID-19 se generan niveles más altos de anticuerpos la respuesta estaría desfasada en el tiempo¹⁵⁵, lo que se ha propuesto podría explicar al menos en parte la patogenicidad de la enfermedad¹¹¹.

Los anticuerpos con capacidad neutralizante se desarrollan rápidamente en la mayoría de los individuos infectados, siendo su principal blanco la proteína S, en particular, más de 90% de los anticuerpos con capacidad neutralizante se dirigen contra el RBD¹⁵⁰ mientras que algunos otros tienen como objetivo la región NTD¹⁵⁶. Estos anticuerpos neutralizantes son producidos por células B con una amplia gama de genes V, tanto de cadena pesada como de cadena liviana, y no muestran evidencia de presentar una hipermutación somática destacada¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Todo esto indicaría que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 es un proceso relativamente simple ya que no requiere de que necesariamente atraviesen el proceso de maduración de la afinidad. Los datos disponibles señalan además que esta respuesta de anticuerpos neutralizantes se desarrollaría a partir de células B vírgenes y no de células B memoria preexistentes¹⁶⁰. A pesar de todo esto, el título de anticuerpos neutralizantes circulantes contra el SARS-CoV-2 es relativamente bajo en una fracción de pacientes recuperados de COVID-19, siendo menor en aquellos que cursaron una infección leve o asintomática^{152,159,161}. La potencia de los anticuerpos neutralizantes ha mostrado ser un predictor de supervivencia en pacientes con COVID-19, y se ha demostrado que la

presencia de estos anticuerpos debido a una infección previa proporcionaría protección frente a una nueva infección por la misma variante viral^{162,163}. Los individuos que cursan enfermedad grave muestran niveles más altos de IgM e IgG específicas de la proteína N que, si bien es poco probable que tengan efectos neutralizantes directos contra el virus, podrían ejercer protección mediante funciones efectoras indirectas mediadas por su fragmento cristalizante (Fc). Recientemente se ha descrito que los pacientes con COVID-19 grave tienden a tener una firma serológica específica que incluye un nivel elevado de anticuerpos IgG con una región Fc específica afucosilada^{164,165}. Esto mediaría una interacción aumentada al receptor FcγRIIIa, lo que conduciría a una mayor secreción de citoquinas con efecto patológico.

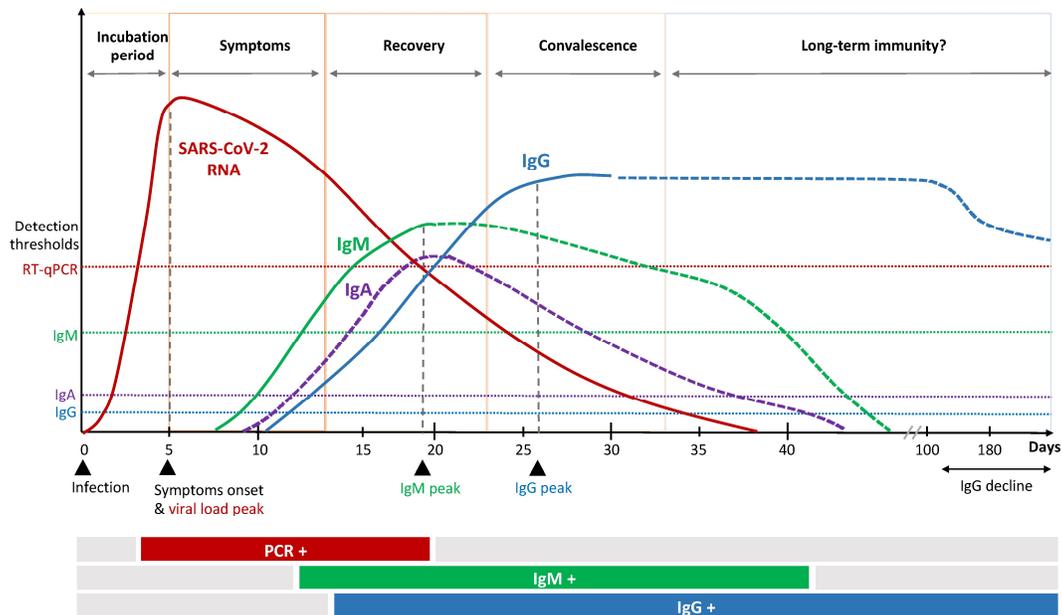


Figura 9. Cinética de generación de anticuerpos en la infección por SARS-CoV-2. Los pacientes recuperados de COVID-19 muestran anticuerpos específicos con actividad neutralizante contra el SARS-CoV-2, lo que se correlaciona positivamente con la gravedad de la enfermedad. La mayoría de los pacientes muestran respuestas de anticuerpos de inmunoglobulina (Ig)A, IgG e IgM específicas del SARS-CoV-2 poco después de la infección que persisten durante semanas o meses. Figura tomada de Koch et al. 2021¹⁶⁶.

La falta de ensayos serológicos estandarizados y las diferencias en las características de los pacientes estudiados ha dificultado analizar de manera sistemática la persistencia en el tiempo de anticuerpos específicos luego de la infección. Sin embargo, ha emergido cierto consenso respecto a que los anticuerpos dirigidos contra la proteína N decaerían más rápido que aquellos específicos para la proteína S o el RBD, mostrando que estos últimos permanecen detectables por hasta 13 meses luego de la infección y con modelos que sugieren que podrían persistir incluso por años^{152,167-169}. Si bien una

actividad neutralizante sostenida sería más relevante para la protección que la presencia de anticuerpos capaces de unirse al virus, se ha demostrado que ambos parámetros correlacionan muy bien entre sí^{152,168}.

Se han identificado anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en la orina, las heces, las secreciones de las vías respiratorias superiores e inferiores y en el esputo. Aunque el papel de la inmunidad de las mucosas no se ha estudiado tan exhaustivamente como el de la inmunidad sérica, es probable que sea importante tenerla presente para diseñar racionalmente vacunas que proporcionen una máxima protección contra patógenos que ocupan estos sitios anatómicos. En este sentido, se estudiaron a pacientes pediátricos y adultos con COVID-19, mostrando que la presencia de IgA específica para la proteína S en el líquido del revestimiento epitelial nasal se correlacionaría inversamente con la gravedad de la enfermedad; aquellos con enfermedad leve tienen títulos más altos de anticuerpos IgA neutralizantes dentro de la primera semana de la enfermedad¹⁷⁰. También se le ha asignado un rol protector a la IgA sérica, mostrando que aquellos trabajadores de la salud que no contraían COVID-19 presentaban un título mayor de IgA anti-S¹⁷¹.

Las células B memoria no secretan anticuerpos de manera activa, sino que permanecen quiescentes, pero se ha propuesto que pudiesen jugar un rol protector contra la infección por SARS-CoV-2 a través de varios mecanismos^{161,172}. Se ha demostrado que la frecuencia de células B memoria y los títulos de anticuerpos específicos muestran cinéticas diferentes en respuesta al SARS-CoV-2¹⁶¹. Los anticuerpos son más eficaces en el momento de la exposición que después de la exposición; sin embargo, es posible que las células B de memoria reaccionen y comiencen una respuesta de anticuerpos en un plazo de 3 a 5 días, lo que estaría dentro de un marco temporal probablemente valioso para limitar la propagación del virus SARS-CoV-2 dentro del cuerpo y reducir la probabilidad de sufrir COVID-19 severa.

La respuesta inmune celular ha evolucionado para reconocer y controlar patógenos intracelulares. Durante la infección por SARS-CoV-2 una respuesta inmune celular coordinada es esencial para controlar la enfermedad¹⁴⁵. El desarrollo temprano de una respuesta de células T CD8+ citotóxicas, que típicamente se observa a los 7 días desde el comienzo de síntomas y tiene un pico a los 14 días, se correlaciona con una

eliminación efectiva del virus y formas leves de la enfermedad^{173,174}. En una proporción importante de pacientes con COVID-19 se observa una profunda linfopenia en sangre, que se correlación con un mayor riesgo de enfermedad grave¹⁷⁵. Esto lleva a un perfil particular de respuesta donde coexisten la pérdida de hasta el 80% de las células T periféricas con una intensa proliferación de aproximadamente un 20% de células T CD8+^{129,176}. El control viral efectivo se asocia con un fenotipo de células T CD4+ de tipo I, y una expresión alta de moléculas efectoras por las células T CD8+^{174,177}. Sin embargo, una activación excesiva puede ser deletérea, de hecho, niveles excesivamente altos de marcadores de activación de células T se han asociado a un peor pronóstico¹⁷⁶. La expresión de PD-1 y Tim-3 que si bien son potenciales marcadores de agotamiento funcional también pueden reflejar una activación en curso, se han asociado a la progresión de la enfermedad¹⁷⁸. Este patrón de activación extrema de células T durante la infección aguda por SAR-CoV-2 ha llevado a preguntarse si esta respuesta no estaría contribuyendo a la inmunopatología de la enfermedad. En infecciones asintomáticas se observa un balance entre la producción de IL-10 y citoquinas inflamatorias en las células T específicas, con una polarización hacia estas últimas en la enfermedad sintomática.^{179,180}

En la mayoría de los individuos infectados se desarrollan células T específicas del virus, pero se ha demostrado que está respuesta es más alta en aquellos que presenta una infección inicial más severa¹⁸¹. La magnitud de la respuesta de células T CD4+ y CD8+ se correlaciona para la mayoría de las proteínas virales, aunque algunas como la nsp12 inducen una respuesta de células T CD8+ más débil probablemente reflejando mecanismos de presentación de antígeno diferentes¹⁸². En el caso de la células T específicas de la proteína S en su mayoría son de tipo CD4+ sirviendo de soporte para la generación de anticuerpos, de hecho, las células T colaboradoras foliculares (Thf) correlacionan con la inmunidad humoral en la fase de memoria^{183,184}.

El desarrollo de células T memoria específicas del SARS-CoV-2 y su persistencia en el tiempo es un punto de interés. Las células T CD4+ memoria se caracterizan por un perfil polifuncional caracterizado por altos niveles de IL-2 y una producción de IFN- γ menor que la observada frente a otros virus respiratorios¹⁸⁵. También se ha descrito la presencia de células T CD8+ memoria. Es esperable que estas células específicas se mantengan por varios años, aunque esto podría depender de la gravedad inicial de la infección¹⁸⁶, si se ha establecido que una respuesta inmune celular robusta persiste por

al menos 6 meses y se ha estimado una vida media de 200 días para las células T específicas del virus¹⁸⁵(Figura 10). Se ha demostrado además que algunas células T reactivas contra coronavirus estacionales pueden tener reactividad cruzada contra el SARS-CoV-2 y contribuir a la protección clínica contra la enfermedad, en particular en etapas tempranas de la vida¹⁸⁷.

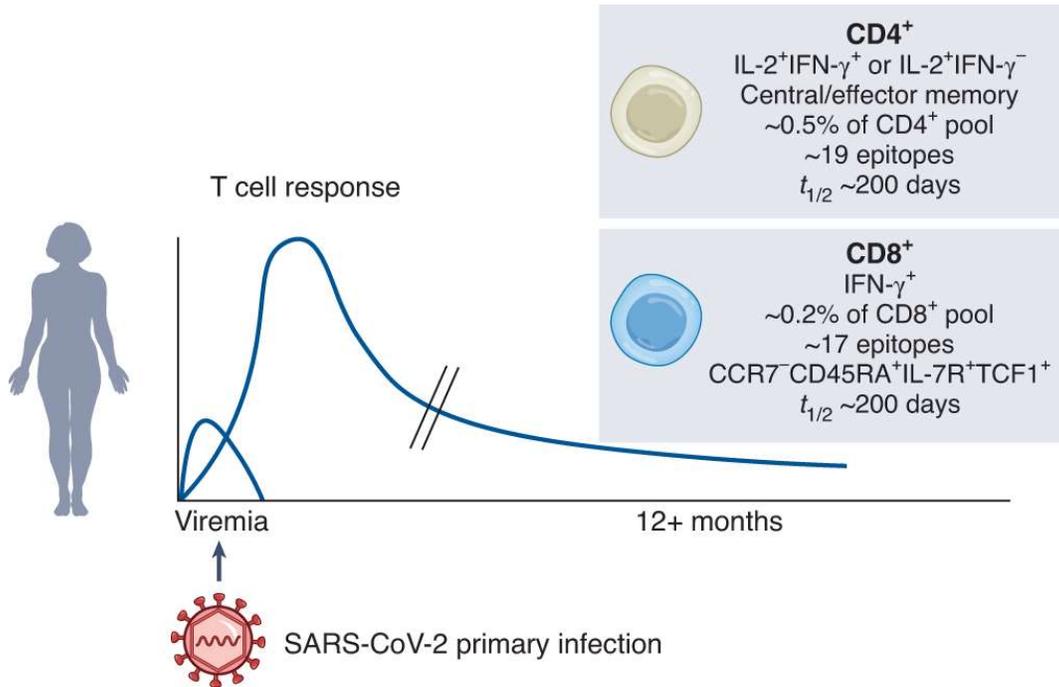


Figura 10. Respuesta de células T frente a la infección por SARS-CoV-2. La respuesta de células T memoria se mantiene al menos 12 meses luego de la infección y se compone tanto de células T CD4+ como T CD8+ específicas del virus. Estas células comprenden aproximadamente el 0,5% y 0,2% del repertorio y están dirigidas contra al menos 19 y 17 epítomos virales, respectivamente. Figura tomada de Moss 2022¹⁸⁸.

1.2.3. Respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2 en RTOS y PDC

La respuesta inmune innata frente al SARS-CoV-2 parece ser similar entre trasplantados y no trasplantados, aunque se destacan algunas diferencias (Figura 11). En estudios que compararon cohortes cuidadosamente pareadas de RTOS e individuos no trasplantados, los niveles de marcadores inflamatorios e IL-6 en los pacientes hospitalizados fueron similares en ambos grupos¹⁸⁹⁻¹⁹². En TR, los niveles de IL-6 se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad, pero con baja capacidad de predecir su progresión^{193,194}.

Múltiples estudios han descrito linfopenias profundas entre los RTOS con COVID-19, sin embargo, pocos trabajos han profundizado en la respuesta inmune celular inducida por la infección en este grupo¹⁹⁵. Un estudio pionero focalizado en el desarrollo de la respuesta de células T luego de la infección por SARS-CoV-2 en RTOS (riñón, corazón e hígado), mostró una frecuencia levemente disminuida de células T específicas productoras de citoquinas en etapas tempranas luego de la infección comparado con individuos inmunocompetentes¹⁹³. Sin embargo, estas diferencias se perdían cuando el análisis se realizaba un mes luego de la infección¹⁹³. En línea con esto, los RTOS mostraban una funcionalidad y frecuencia de linfocitos T CD4+ y T CD8+ con fenotipo memoria similar al grupo control. La frecuencia de linfocitos T reactivos medidos mediante ELISPOT de IFN- γ en una pequeña cohorte de TR (donde todos tuvieron una disminución de la inmunosupresión al diagnóstico de COVID-19), mostró que presentaban células T CD4+ y CD8+ de 2-6 semanas luego del comienzo de síntomas, con frecuencias similares a pacientes en diálisis¹⁹⁶. Sin embargo, debido a la falta de controles, no se pudo evaluar el impacto de la inmunosupresión en la robustez de la respuesta celular antiviral. Otro estudio más reciente confirmó que la respuesta de células T en TR era similar a la de los pacientes en diálisis y persistía por 10 meses desde la infección, momento en el que la respuesta humoral ya estaba completamente disminuida¹⁹⁷. Retomar por completo el régimen de inmunosupresión no parece impactar el número de células T específicas. Similar a lo reportado en la población general, los TR con infección asintomática mostraron una respuesta T específica menor que los que cursaron una enfermedad sintomática o severa¹⁹⁸. En un estudio donde compararon la memoria inmunológica en RTOS y controles sanos seis meses luego de la infección encontraron que la frecuencia de linfocitos T IFN- γ +, IL-2+, o IFN- γ +IL-2+ era menor en ambos grupos para aquellos que habían cursado una enfermedad leve comparado con los que cursaron una forma grave de la enfermedad¹⁹⁸. La única diferencia encontrada entre los RTOS y los controles sanos es que en los primeros parece haber una disminución más rápida en la frecuencia de las células T específicas del virus¹⁹⁸.

Los TR y TH conforman una gran proporción de los pacientes trasplantados. En el caso de los TR, varios trabajos han mostrado que son capaces de generar una respuesta de linfocitos T específicos robusta y durable en el tiempo luego de la infección^{197,199}. Para los TH la información disponible es menor, sin embargo, en un trabajo del 2021 mostraron que la gran mayoría de estos pacientes desarrollan una respuesta de células T específicas contra el virus, con una proporción sutilmente menor de linfocitos T CD8+

que de T CD4+, sin detectar diferencias en la magnitud de la respuesta en función de su especificidad de antígeno (S, N y proteína de membrana) entre los TH y no trasplantados, además esta respuesta inmune celular perduraba en el tiempo luego de la infección²⁰⁰.

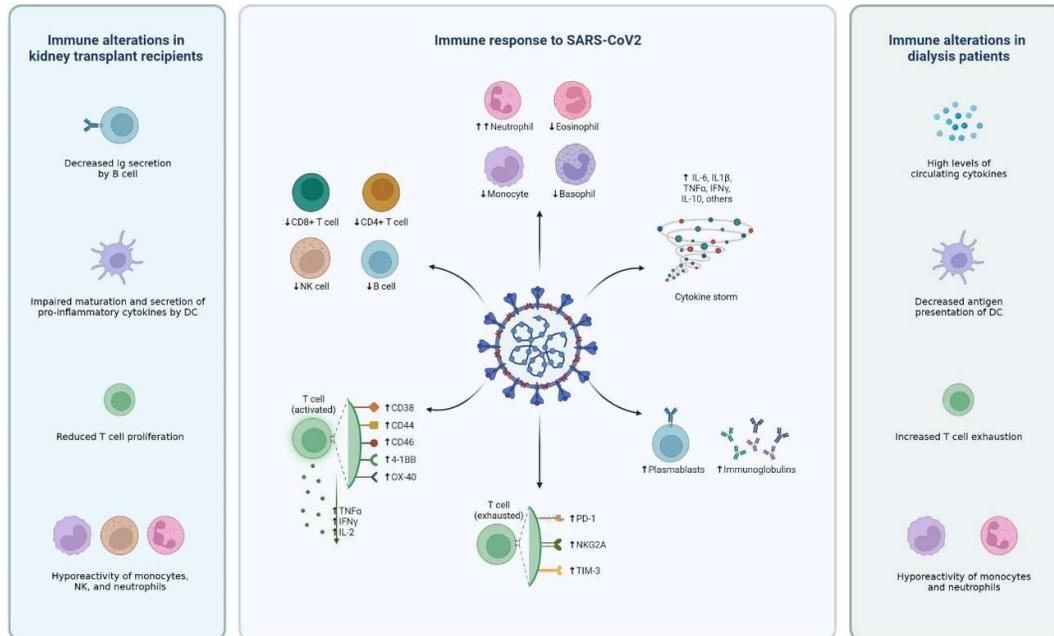


Figura 11. Respuesta inmune al SARS-CoV-2 en pacientes en diálisis y TR. Resumen de las alteraciones inmunitarias observadas comúnmente en pacientes con COVID-19 (panel central) y trastornos descritos en los TR (panel izquierdo) y en pacientes en diálisis crónica (panel derecho). Figura tomada de Cantarelli et al. 2022²⁰¹ y creada por los autores con BioRender.com.

Estudios realizados al comienzo de la pandemia mostraron que los TR eran capaces de generar niveles totales normales de IgG anti-SARS-CoV-2 en suero luego la infección^{193,202–205}. Sin embargo, la cinética de generación de anticuerpos estaba retrasada y los niveles de anticuerpos séricos disminuían más rápidamente que en individuos inmunocompetentes^{204–208}. El primer estudio comparando la respuesta humoral a SARS-CoV-2 entre TR y no trasplantados mostró que la mayoría de los TR con COVID-19 presentaba una amplia activación de distintos grupos de linfocitos B pero no de células Thf comparado con los controles, así como una respuesta robusta de anticuerpos IgM e IgG contra nucleocápside. Resultados similares fueron observados también en pacientes con COVID-19 no trasplantados²⁰⁴, y la severidad de la enfermedad se correlacionó con la entidad de la respuesta de anticuerpos a diferentes tiempos en ambos grupos, con un impacto mayor que otros factores como edad, sexo y tipo de inmunosupresión^{198,209}. La suspensión de agentes antiproliferativos como el

micofenolato de mofetilo al momento del diagnóstico no parece impactar la magnitud de la respuesta inmune²⁰⁴. En un estudio transversal multicéntrico mostraron que pacientes trasplantados en etapas iniciales de la infección tenían niveles menores de IgG específicas contra cuatro epítomos de la proteína S comparado con individuos no trasplantados, sin embargo, esta diferencia se perdía a tiempos más tardíos, sugiriendo una evolución normal pero retrasada de la respuesta²¹⁰. La cinética de evolución de IgA e IgM específicas para la proteína S fue igual en todos los tiempos²¹⁰. El hecho de que la producción de IgG estuviera impedida durante la fase aguda de la enfermedad podría explicar en parte el porqué del peor desenlace de la infección en TR. En la mayoría de los pacientes considerados en este estudio se suspendió o redujo el uso de micofenolato mofetilo luego de la infección, lo que podría explicar los valores de IgG normales a puntos de tiempo más tardíos. El impacto de la inmunosupresión en la respuesta antiviral en TR con SARS-CoV-2 no ha sido demostrado profundamente²¹¹. A pesar de disminuir el régimen de inmunosupresión durante la infección no se observó un aumento en las tasas de rechazo agudo, así como en la incidencia de anticuerpos anti-HLA^{212,213}, salvo en un estudio²¹⁴.

Los pacientes en diálisis se caracterizan por tener una respuesta inmune disminuida y presentar un estado de inflamación crónica de bajo grado, asociado a la presencia de un medio urémico (Figura 11). Aunque aún no se comprenden del todo las alteraciones inmunológicas asociadas al fallo renal, en particular en lo que respecta a la inmunidad innata, se ha reportado que estos pacientes presentan una disminución en la presentación de antígenos por células dendríticas, una hiporreactividad de monocitos y neutrófilos, así como un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ exhaustos y anérgicos²¹⁵, lo que afecta su respuesta a un amplio espectro de patógenos (Figura 11). Por otra parte, los pacientes con fallo renal suelen presentar altos niveles basales de citoquinas proinflamatorias, lo que se da como resultado de una eliminación renal disminuida y una generación aumentada de estas moléculas debido al estrés oxidativo y el efecto de las toxinas urémicas. En este sentido, se encontró que los PD con COVID-19 presentaban niveles significativamente más altos de IL-6 y proteína C reactiva (PCR) comparado con individuos que no se encontraban en diálisis, y que estos valores se correlacionaban con la severidad y el desenlace de la enfermedad^{216,217}. Análisis proteómicos del suero de PD con COVID-19 identificaron, a su vez, niveles elevados de CCL2 y CCL7 en formas graves de la enfermedad, los que se asociaron a un aumento de marcadores inflamatorios y a un recuento menor de

monocitos en sangre, sugiriendo que estas células se podían estar reclutando a los tejidos inflamados²¹⁸.

La información disponible con respecto a la respuesta de células T en pacientes en hemodiálisis, aunque limitada, sugiere que estos preservan la habilidad de generar una respuesta celular eficiente, con porcentajes de células T específicas capaces de producir citoquinas similares a los encontrados en individuos sin fallo renal^{196,219,220}. En este sentido, se observó la secreción de IFN- γ frente a la exposición a antígenos del SARS-CoV-2 en 8 de 11 PD que superaron la enfermedad a pesar de no presentar niveles detectables de anticuerpos²²¹. Sin embargo, en un trabajo con 36 pacientes en hemodiálisis no encontraron correlación entre la respuesta de células T y protección contra la reinfección²²².

Luego de la infección por SARS-CoV-2 la gran mayoría de los PD desarrollan una respuesta inmune humoral robusta²²³. Solo entre un 5% y 10% de los PD no presentan anticuerpos luego de la infección²²⁴, lo que se asoció al uso de drogas inmunosupresoras o quimioterapia²²⁵. Similar a lo que se observa en la población general, el título de anticuerpos generado luego de la infección por SARS-CoV-2 en los PD se correlacionó con la severidad de la enfermedad, siendo más alto en los pacientes sintomáticos que en los asintomáticos. La mayoría de los estudios muestran que esta respuesta humoral es durable con una caída lenta en el tiempo y una duración similar a lo que se observa en la población general. Se ha reportado la detección de anticuerpos más de un año luego de la infección, con una disminución más rápida de las IgG anti-N comparado con las IgG anti-S²²⁶. A pesar de esto, los pacientes que generan anticuerpos en respuesta a la infección natural con SARS-CoV-2 se encontrarían menos protegidos de la reinfección que los individuos sanos que desarrollan anticuerpos^{221,227,228}. Por ejemplo, un estudio observacional con 2337 pacientes en hemodiálisis reveló que la evidencia serológica de una infección previa por SARS-CoV-2 se asoció con una reducción del 45% y 79% en el riesgo de reinfección y desarrollo de formas graves de la enfermedad, respectivamente²²⁷. A modo de referencia, en una cohorte de trabajadores de la salud este porcentaje de reducción del riesgo de reinfección asciende a un 90%²²⁹.

1.3. VACUNAS CONTRA COVID-19

La evolución de la pandemia estuvo acompañada por un rápido y sin precedentes desarrollo de vacunas contra COVID-19, algunas basadas en plataformas tradicionales y otras en tecnologías relativamente nuevas. Las vacunas pioneras contra COVID-19 (Comirnaty, Spikevax y Vazzevria) fueron autorizadas para su uso de emergencia en diciembre de 2020, menos de un año después de declarado el inicio de la pandemia. Al 2 de diciembre de 2022, había 242 candidatos vacunales en ensayos clínicos de fase I a fase III, y 50 vacunas aprobadas en al menos un país del mundo, de las cuales 11 se encontraban listadas para su uso de emergencia por la OMS^{230,231}. Entre estas 11 vacunas se incluyen: dos vacunas a ARN mensajero (Comirnaty y Spikevax), cuatro vacunas a vectores virales no replicativos (Vaxzevria, Covishield, Ad26.COVS.2.S y Convidecia), tres vacunas a virus inactivado (Covilo, CoronaVac y Covaxin), y dos vacunas a subunidad proteica (Nuvaxovid y Covovax)²³¹. En la Tabla 1 y la Figura 12 se resumen las principales características de estas vacunas, así como su eficacia reportada²³². Es necesario destacar que la eficacia se refiere al comportamiento de las vacunas en ensayos clínicos controlados, mientras que la efectividad se desprende de observaciones del mundo real. La eficacia de diferentes vacunas no puede ser comparada ya que depende de diversos factores, como ser: la vacuna en si misma (tipo de vacuna, dosis, número de dosis, etc.), el virus (por ej. virulencia de la variante en circulación al momento del ensayo), y los participantes (diferentes edades, condiciones de salud y características demográficas, entre otras).

Tabla 1 Lista de vacunas aprobadas para su uso de emergencia por la OMS y su eficacia (al 2 de diciembre de 2022). Adaptada de Chi, Li, Huang, Chan et al.²³²

	Fabricante	Vacuna	Plataforma	Nro. De países en uso	Eficacia (Infección)	Eficacia (Enfermedad severa)	Referencias
1	Moderna	Spikevac (mRNA-1273)	ARN	87	93.2%	98.2%	233
2	Pfizer/BioNTech	Comirnaty (BNT162b2)	ARN	146	91.3%	96.7%	234
3	Janssen (Johnson & Johnson)	Ad26.COVS.2.S	Vector viral	111	52.4%	74.6%	235
4	Oxford/AstraZeneca	Vaxzevria (ChAdOx1 nCoV-19, AZD1222)	Vector viral	141	74.0%	100%	
5	Serum Institute of India	Covishield (Oxford/	Vector viral	49			

		AstraZeneca formulation)					
6	Bharat Biotech	Covaxin (BBV152)	Inactivada	14	77.8% (sintomático) , 63.6% (asintomático)	93.4%	236
7	Beijing Institute of Biological Products/ Sinopharm	Covilo (BBIBP-CorV)	Inactivada	91	78.1%	100%	237
8	Sinovac Biotech	CoronaVac (PiCoVacc)	Inactivada	56	50.7% (Brasil) 65.3% (Indonesia) 83.5% (Turquía)	100% (Brasil)	238–240
9	Novavax	Nuvaxovid (NVX-CoV2373)	Subunidad proteica	38	89.7% (UK) 90.4% (US & México)	100%	241,242
10	Serum Institute of India	COVOVAX (Novavax formulation)	Subunidad proteica	5			
11	CanSino Biologics	Convidecia (AD5-nCoV)	Vector viral	10	57.5%	91.7%	243

1.3.1. Principales vacunas empleadas contra COVID-19

- Vacunas a ARN

Las vacunas de ARN consisten en moléculas de ARN mensajero, codificante para un antígeno viral, encapsuladas y estabilizadas en nanopartículas lipídicas. Una vez entregado a las células, este ARN dirige la expresión transitoria de antígenos virales que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario. Este tipo de vacunas tienen como ventajas que son de fácil diseño, rápida producción masiva y que inducen respuestas inmunes tanto humorales como celulares²⁴⁴. A pesar de ser una tecnología relativamente nueva, no aprobada para ningún uso previamente, las vacunas de ARN fueron rápidamente desarrolladas, convirtiéndose en las primeras autorizadas para su uso, y siendo ampliamente utilizadas como vacunas contra el COVID-19.

BNT162b2 (tozinameran, comirnaty) es una vacuna a ARN co-desarrollada por BioNTech (BioNTech SE, Germany) y Pfizer (Pfizer Inc., USA). Consiste en un ARNm modificado con N1-metilpseudouridina (m1Ψ) que codifica para la totalidad de la

proteína transmembrana S con dos sustituciones de prolina en los residuos K986 y V987 (S-2P), que estabilizan la proteína en estado de prefusión, formulado en nanopartículas lipídicas^{245–248}. La eficacia de la vacuna fue de 93,1% contra la infección de COVID-19 y de 96,7% contra enfermedad grave, en un ensayo clínico de gran escala con seis meses de seguimiento (NCT04368728)²³⁴. BNT162b2 es una de las vacunas más ampliamente utilizadas a nivel global, contando con autorización para su uso en 149 países al 2 de diciembre de 2022.

Debido a la preocupación generada por la disminución en la protección observada en EE. UU. e Israel^{249,250}, la FDA autorizó una dosis de refuerzo con esta vacuna en diciembre de 2021. Los datos de inmunogenicidad mostraron un aumento de 3,3 veces en la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes un mes después de la dosis de refuerzo, comparado con lo observado un mes luego de la inmunización primaria (NCT04368728)²⁵¹. BNT162b2 también ha sido autorizada por la FDA en EE. UU. para su uso en adolescentes y niños mayores a 6 meses de edad a dosis menores (10 µg para 5–11 años y 3 µg para 6 meses–4 años, comparado con la dosis regular de 30 µg), basado en ensayos clínicos donde se mostró un 90% de eficacia contra la infección en estos grupos^{252–254}.

mRNA-1273 (elasomeran, spikevax), desarrollada por Moderna en asociación con los *National Institutes of Health* (NIH) de EE. UU., es la otra vacuna de ARNm que ha dominado la escena global. Consiste en un ARNm modificado con m1Ψ codificante para el antígeno S-2P formulado en nanopartículas lipídicas²⁵⁵. En ensayos clínicos, la vacuna mostró un 93.2% de efectividad en prevenir el COVID-19 y 98.2% de efectividad en prevenir la enfermedad severa²³³. mRNA-1273 fue autorizada para su uso en 88 países al 2 de diciembre de 2022.

- Vacunas de vectores virales

Las vacunas a vectores virales emplean virus modificados, no relacionados, como vectores vacunales para llevar genes codificantes de antígenos del patógeno a combatir al interior de las células del hospedero, y de esta manera estimular la respuesta inmune. Dado que el modo de acción emula una infección natural, estas vacunas inducen una respuesta de anticuerpos y células T potente. Los vectores virales se han convertido en una plataforma tecnológica versátil para el desarrollo de vacunas debido a que el

genoma viral puede ser fácilmente manipulado para expresar cualquier antígeno de interés. Dentro de este tipo de vacunas, entre las autorizadas por la OMS para su uso contra el SARS-CoV-2, se incluyen: la ChAdOx1 nCoV-19 o ChAdOx1 (Vaxzevria, AZD122) diseñada por la Universidad de Oxford y producida por AstraZeneca (AstraZeneca, UK), la Ad26.COV2.S desarrollada por Johnson & Johnson (Johnson & Johnson Services, Inc., USA) y el Beth Israel Deaconess Medical Center, y la Convidecia (Ad5-nCoV) fabricada por CanSino Biologics (CanSinoBIO, China).

- Vacunas a virus inactivado

Las vacunas a virus inactivado consisten en partículas virales obtenidas en cultivo que son inactivadas mediante sustancias químicas o radiación. Estas vacunas tienen la ventaja de contener todo el repertorio de antígenos del patógeno inactivado, sin embargo, típicamente producen respuestas inmunitarias débiles, con poca inmunidad celular, y por lo tanto requieren del uso de adyuvantes. A pesar de esto, gracias a su desarrollo relativamente simple y rápido, este tipo de vacunas han sido ampliamente utilizadas contra el SARS-CoV-2.

CoronaVac (PiCoVacc) es una vacuna totalmente inactivada desarrollada por Sinovac Biotech (Sinovac Biotech, China). Las partículas virales son propagadas en la línea celular Vero (African green monkey kidney epithelial cells), inactivadas con beta-propiolactona y formuladas utilizando alúmina como adyuvante. Un ensayo clínico de fase III en Brasil (NCT04456595) mostró un 50.7% de efectividad contra el COVID-19 sintomático²³⁸. A su vez, los análisis interinos de ensayos clínicos de fase III en Turquía (NCT04582344) e Indonesia, mostraron una efectividad de 83.5% y 65.3% contra la infección sintomática, respectivamente^{239,240}. Adicionalmente, en un ensayo de fase I/II se reportó la seguridad e inmunogenicidad de CoronaVac en individuos de 3-17 años⁷⁴. Algunos trabajos encontraron que CoronaVac induce una respuesta de anticuerpos menor comparado con las vacunas de ARN o de vectores virales. En particular, CoronaVac genera niveles más bajos de anticuerpos neutralizantes que BNT162b2 con una media geométrica en PRNT50 (*Plaque Reduction Neutralization Test, 50%*) de 69,45 contra 251,6²⁵⁷, y los anticuerpos neutralizantes disminuyen más rápidamente que con ChAdOx1²⁵⁸. Aunque una tercera dosis de la misma vacuna mostró ser capaz de restaurar los niveles de anticuerpos neutralizantes²⁵⁹, no parece proveer de niveles suficientes para la protección contra la variante Omicron, cuando se compara con un

refuerzo heterólogo con BNT162b2²⁶⁰. Covilo (BBIBP-CorV) y Covaxin

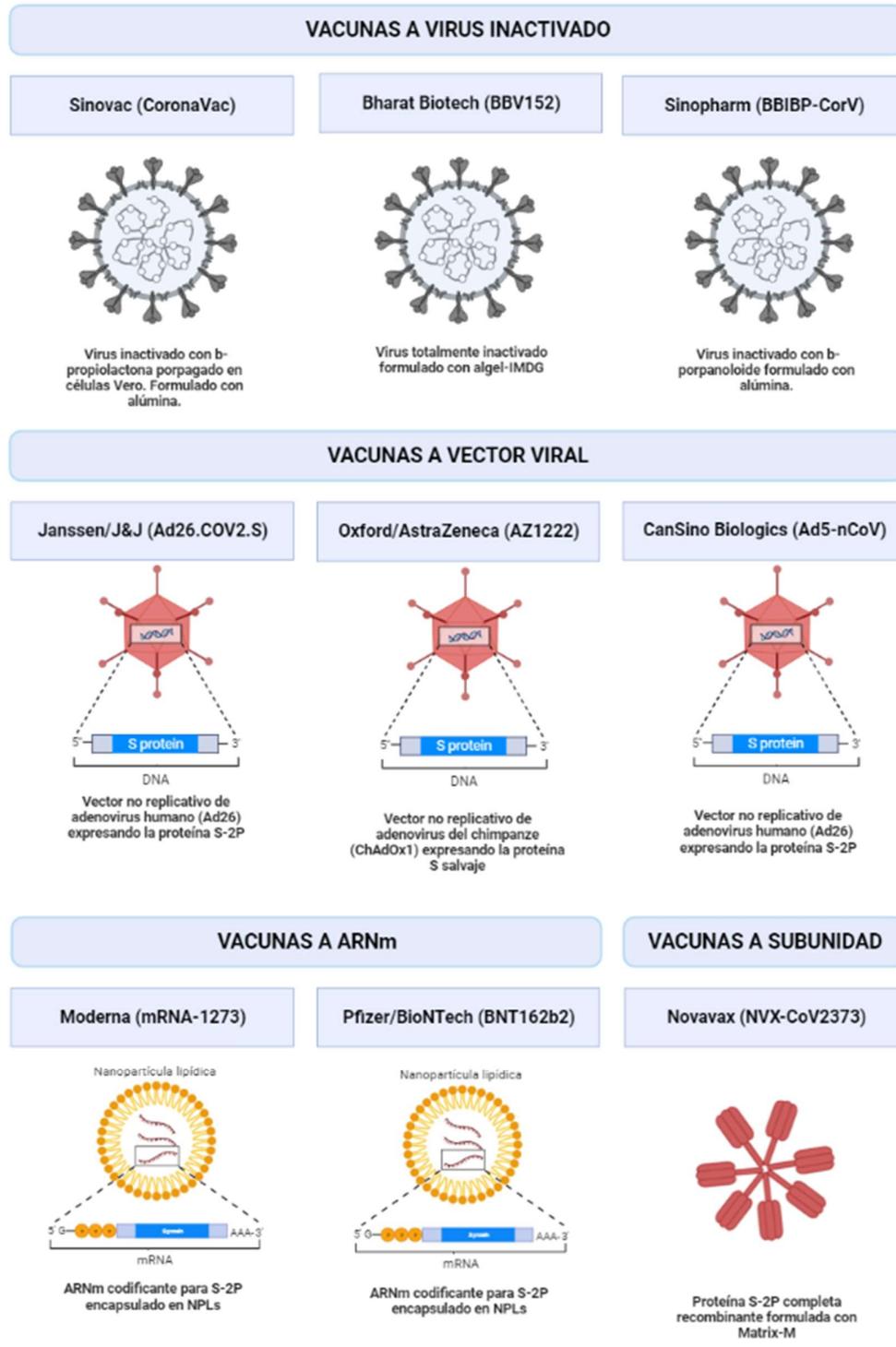


Figura 12. Componentes principales de las vacunas contra COVID-19 listadas para uso de emergencia por la OMS. Las vacunas se clasifican en cuatro grupos de acuerdo con el componente principal de cada una: ARNm, virus inactivado, vectores virales, subunidades proteicas. Imagen creada con BioRender.com adaptada de Chi, Li, Huang, Chan et al.²³²

(BBV15), son las otras dos vacunas a virus inactivado listadas para su uso de emergencia por la OMS, cuyas características principales se resumen en la Tabla 1 y la Figura 12.

- Vacunas a subunidad proteica

Las vacunas basadas en proteínas combinan partes de las proteínas del patógeno con un adyuvante con el objetivo de estimular la respuesta inmune. Son relativamente más seguras que las vacunas a virus inactivado y mejor toleradas que las basadas en nuevas tecnologías, como las de ARN mensajero y vectores virales. La vacuna Novavax (NVX-CoV2373), distribuida como Nuvaxovid por Novavax (Novavax, USA) o como Covovax por el *Serum Institute of India*, es la primera vacuna contra COVID-19 basada en proteína recombinante autorizada por la OMS. Consiste en la totalidad de la proteína S con la modificación 2P y una mutación en el sitio de clivado por furina, formulada dentro de nanopartículas y usando un adyuvante basado en saponina (Matrix-M). La efectividad de la vacuna fue de 89,7% en un ensayo clínico fase III en Gran Bretaña y de 90,4% en uno llevado a cabo en EE. UU. y México (NCT04611802)^{57,74}. Este último fue extendido para evaluar la aplicación de una dosis de refuerzo de la vacuna²⁶¹.

A pesar del increíble logro que significó disponer tan rápidamente de vacunas efectivas, han surgido nuevos problemas que desafían el control de la pandemia a largo plazo, como el surgimiento de variantes virales con mayor transmisibilidad y escape inmunológico, el declive de la inmunidad con el tiempo en los individuos vacunados, y muy raros, pero potencialmente graves efectos adversos asociados a la vacunación. A esto se le suma, que algunos grupos poblacionales con distintos grados de inmunosupresión natural o inducida muestran una respuesta inmune disminuida a los regímenes de vacunación utilizados inicialmente.

1.3.2. Refuerzos vacunales contra COVID-19

Se entiende como dosis de refuerzo una dosis de vacuna que es administrada luego de una serie de vacunación primaria, esto sería, en el contexto de la vacunación contra COVID-19, la administración de cualquier dosis de vacuna luego de una dosis de Ad26.COVS o luego de dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2, mRNA-1273 o

CoronaVac. A nivel mundial se han explorado esquemas de vacunación de refuerzo homólogos, empleando la misma vacuna que en la inmunización primaria, y heterólogos, empleando una dosis de una vacuna diferente a las usadas inicialmente.

Varios estudios mostraron que las variantes emergentes, como las variantes Delta u Omicron, son capaces de evadir de manera notoria los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación primaria, o por infecciones previas con otra variante²⁶², y que, a su vez, el efecto protector de las vacunas disminuye en el tiempo^{263,264}. Esto llevó a un aumento de casos de COVID-19 en individuos completamente vacunados²⁶⁵. Como ejemplo, se observó que la efectividad para prevenir enfermedad de la vacuna BNT162b2 disminuyó de un 90% inicial a un 60% luego de 6 meses de seguimiento post vacunación²³⁴. La duración de la protección inducida por la vacunación y la necesidad de refuerzos periódicos se han convertido en uno de los centros de discusión respecto a la infección por SARS-CoV-2. La utilización de una dosis de refuerzo ofrece una mejora en la protección contra COVID-19. Un ensayo clínico de fase III (NCT04955626) mostró que una tercera dosis de la vacuna BNT162b2 proporcionaba un 95,3% de eficacia relativa contra el COVID-19, comparado con dos dosis de esta vacuna²⁶⁶. Frente a la evidencia y la preocupación por las nuevas variantes virales, varios países comenzaron a ofrecer dosis de refuerzo en el último cuatrimestre de 2021, cuando Delta se convertía en la variante predominante a nivel global. Mientras que este refuerzo proveía una protección efectiva contra la enfermedad severa y las hospitalizaciones causadas por la variante Delta, la aparición de Ómicron implicó un nuevo desafío, con un aumento drástico en el mundo del número de casos a finales del 2021, del cual Uruguay no fue la excepción. En este sentido, se demostró que la administración de dosis de refuerzo con vacunas a ARNm aumentó los niveles de anticuerpos séricos contra la proteína S y el título de anticuerpos neutralizantes contra Omicron^{85–91}. Además, el refuerzo tanto con CoronaVac²⁷⁴ como con vacunas a ARNm²⁷⁵ provocó un incremento en las células B memoria específicas para el RBD y en los niveles de anticuerpos dirigidos contra diversas variantes, incluida Ómicron. Aunque se ha observado la ocurrencia de infecciones por Delta y Ómicron en individuos vacunados con una dosis de refuerzo, la carga viral en ellos tiende a ser más baja y los síntomas más leves^{276,277}.

La utilización de dosis de refuerzo es especialmente importante en grupos vulnerables de alto riesgo. Estudios mostraron que pacientes oncológicos en tratamiento^{278,279},

receptores de trasplantes de órganos sólidos²⁸⁰, y ancianos²⁸¹ necesitan refuerzos adicionales con BNT162b2 o mRNA-1273 para alcanzar una protección suficiente contra Delta y Ómicron^{282,283}. En este sentido, en enero de 2022 Israel comenzó a ofrecer una segunda dosis de refuerzo con vacuna a ARNm a los adultos mayores e individuos inmunocomprometidos, y EE. UU. hizo lo mismo en marzo de ese año. Un estudio retrospectivo realizado en Israel mostró que esa segunda dosis de refuerzo disminuía las hospitalizaciones y muertes asociadas a COVID-19 en individuos mayores de 60 años, comparado con los que habían recibido solo una dosis de refuerzo²⁸⁴.

1.3.3. Efectos adversos reportados para las vacunas contra COVID-19

Dado que muchas de las vacunas contra la COVID-19 fueron utilizadas inmediatamente luego de su autorización para uso de emergencia, y no existían previamente vacunas a ARNm aprobadas, se realizó un monitoreo exhaustivo del reporte de efectos adversos luego de la inmunización. Los efectos adversos más comunes reportados luego de la vacunación contra la COVID-19 incluyeron: dolor o sensibilidad en el sitio de inyección, fatiga, dolor de cabeza, rash cutáneo, escalofríos, fiebre, y dolor muscular y articular. Estos efectos adversos son similares a los observados con otras vacunas y generalmente se presentaron de forma leve y autolimitada. Sin embargo, aunque muy raros, también se han reportado efectos adversos severos luego de la vacunación, como trombosis y trombocitopenia, miocarditis o pericarditis, miositis inflamatoria, enfermedades autoinmunes como el síndrome de Guillain-Barré y reacciones anafilácticas severas^{285,286}. La anafilaxis puede ocurrir con cualquier tipo de vacuna y por lo tanto no es específica de las vacunas contra la COVID-19. El síndrome de Guillain-Barré es un desorden neurológico raro asociado a infecciones bacterianas, virales y la vacunación contra influenza. Se ha reportado que es más frecuente en los individuos inmunizados con la vacuna Ad26.COV2.S pero no en aquellos que recibieron otras vacunas contra la COVID-19²⁸⁷. Los efectos adversos severos asociados a la vacunación contra la COVID-19 que han suscitado una mayor atención son la trombocitopenia trombótica inmunitaria inducida por vacuna (VITT, por sus siglas en inglés) y la miocarditis/pericarditis.

Luego de la inyección de vacunas basadas en adenovirus, incluidas ChAdOx1 y Ad26.COV2.S, se reportaron eventos adversos severos raros de trombosis y trombocitopenia (VITT)²⁸⁸. La frecuencia de estos luego de la primera dosis de ChAdOx1

fue estimada en 8 a 38 casos por millón de dosis²⁸⁹, ocurriendo comúnmente de 10 a 16 días luego de la vacunación²⁹⁰. Si bien el mecanismo por el que se desarrolla la VITT no está aún del todo elucidado, la evidencia sugiere que hay un primer paso donde las proteínas virales que componen la vacuna forman complejos con el factor plaquetario 4 (PF4) y se forman epítomos que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, provocando la generación de anticuerpos anti-PF4 que formarían complejos inmunes con la proteína y se unirían con receptores Fc presentes en la superficie de las plaquetas, lo que finalmente conduciría a la activación plaquetaria, su agregación y la VITT.

Por otra parte, las vacunas a ARNm como BNT16b2 y mRNA-1273 se han asociado a un riesgo mayor de miocarditis o pericarditis²⁹¹⁻²⁹⁴, estimado en 2,7 (1 a 4,6) eventos por cada 100.000 personas. Cabe destacar que la infección por SARS-CoV-2 provoca aproximadamente 11 (5,6 a 15,8) eventos de miocarditis cada 100.000 personas, representando un riesgo mucho mayor para esta afección que la vacunación, además de otros riesgos que conlleva la enfermedad²⁹¹. La ocurrencia de miocarditis luego de la vacunación es más frecuente en hombres adolescentes y adultos jóvenes, y usualmente es autolimitada y sin consecuencias notables. Normalmente ocurre dentro de la semana luego de la inyección, siendo más común luego de la administración de la segunda dosis de vacuna a ARNm^{292,294}.

1.3.4. Vacunación contra la COVID-19 en Uruguay

Al 6 de febrero de 2023 el 69,4% de la población mundial había recibido al menos una dosis de vacuna contra la COVID-19, con 13,26 billones de dosis administradas globalmente. Sin embargo, este porcentaje desciende a 26,4% de la población en países de bajos ingresos^{295,296}. En este sentido, la distribución de vacunas ha estado marcada por la inequidad en su acceso, como se puede observar en la Figura 13, habiendo países donde ya se administraban dosis de refuerzo mientras otros tenían aún niveles muy bajos de vacunación primaria. A esa fecha en Uruguay, un 85% de la población había completado el protocolo inicial de vacunación, ascendiendo a 88% si se consideran los individuos parcialmente vacunados, lo que implica unos 3,01 millones de personas²⁹⁷. En nuestro país se utilizaron las vacunas BNT162b2, CoronaVac y en menor medida ChAdOx1, con 2,56, 3,25 y 0,09 millones de dosis aplicadas al 26 de noviembre de 2022, respectivamente²⁹⁵.

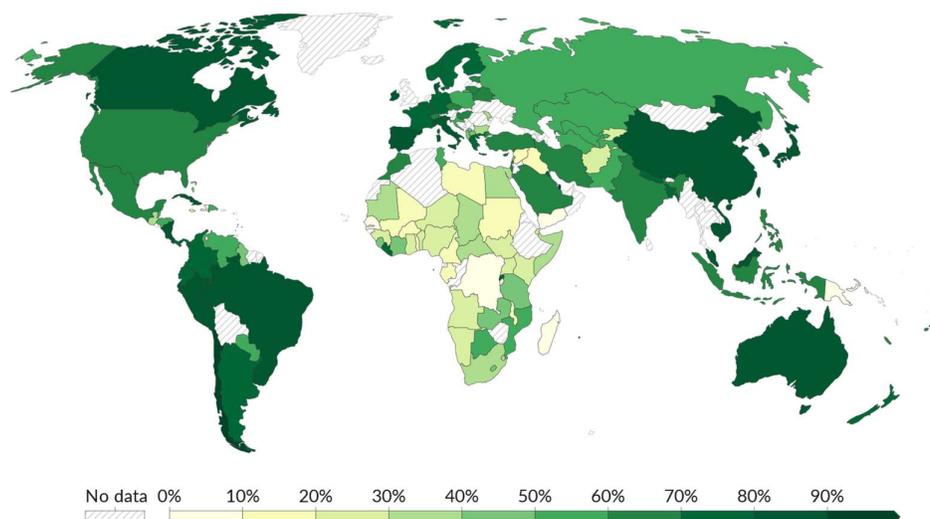


Figura 13. Porcentaje de personas que completaron el protocolo de vacunación inicial contra COVID-19. Número total de personas que recibieron todas las dosis indicadas en el protocolo inicial de vacunación dividido por el total de la población del país. Fuente: Datos oficiales colectados por “Our World in Data”, actualizado al 8 de Feb. de 23. [OurWorldInData.org/coronavirus](https://ourworldindata.org/coronavirus).

La primera etapa del plan de vacunación contra la COVID-19 en Uruguay comenzó el 1 de marzo de 2021, con una estrategia de vacunación ordenada en la que se priorizó la vacunación de los grupos de personas más susceptibles de padecer cuadros graves de la enfermedad en caso de contagiarse, o aquellos que por las tareas que desempeñan estuvieran más expuestos al virus SARS-CoV-2. La primera vacuna en llegar al país fue CoronaVac seguida de BNT162b2, ambas se aplicaron en un esquema inicial de dos dosis separadas por 28 días entre sí. CoronaVac fue utilizada inicialmente para la vacunación primaria de grupos prioritarios por su ocupación y que fueran menores de 60 años, incluyendo trabajadores de la educación, del INAU (Instituto del Niño y Adolescente del Uruguay), policías, militares, bomberos y funcionarios aduaneros de la primera línea de control, para luego ser extendida a toda la población entre 18 y 65 años. Por su parte, BNT16b2 fue en una primera instancia empleada para los trabajadores de la salud y la población mayor de 65 años. Algunas dosis de la vacuna ChAdOx1 (llegadas en el marco del Mecanismo COVAX) fueron utilizadas para la vacunación en la frontera con Brasil, pero las siguientes partidas fueron donadas a otros países ya que se contaba con un stock de vacunas suficiente. Si bien las primeras dosis de vacuna se suministraron más tardíamente que en otros países, la campaña de vacunación se desarrolló rápidamente de manera masiva y con una muy buena aceptación por parte

de la población, llegando a un porcentaje de personas completamente vacunados muy alto en pocos meses (Figura 14).

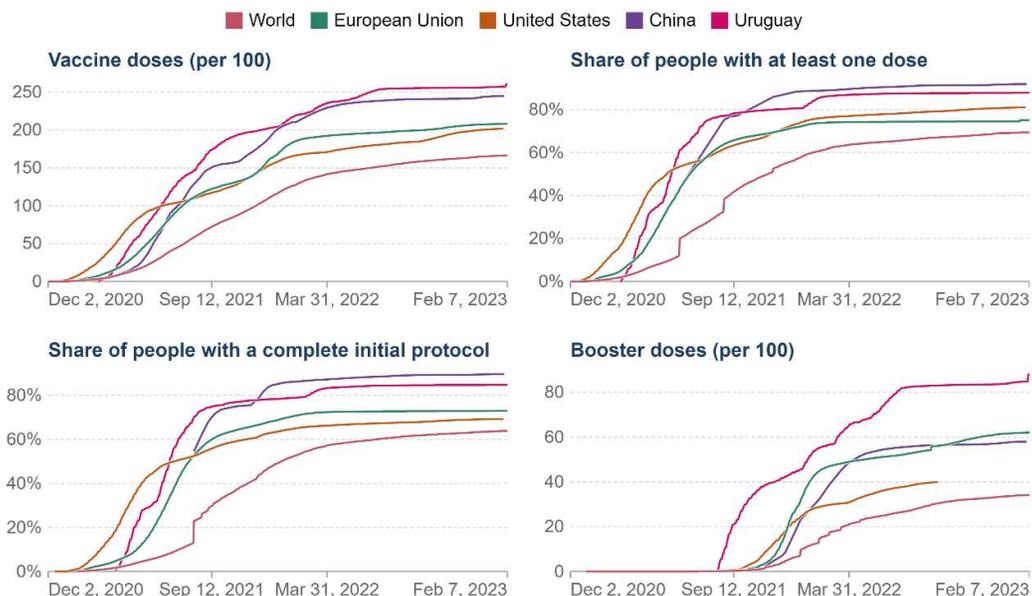


Figura 14. Evolución de las dosis de vacuna totales, dosis de refuerzo y porcentaje de personas parcial y totalmente vacunadas. Se muestra la evolución en número de dosis de vacuna administradas cada 100 habitantes (arriba-izquierda), la tasa de población con al menos una dosis de vacuna (arriba-derecha), la tasa de población totalmente vacunada (abajo-izquierda), y el número de dosis de refuerzo cada 100 habitantes (abajo-derecha), en Uruguay, comparado con la Unión Europea, Estados Unidos, China, y a nivel global.

En el marco de la evidencia internacional y nacional disponible, a finales de julio de 2021 se aprobó un esquema de vacunación de refuerzo en individuos inmunocomprometidos, con la administración de una dosis de BNT16b2 en aquellos vacunados inicialmente con BNT16b2 o ChAdOx1 nCoV-19, y un esquema completo con BNT162b2 en los que recibieron una vacunación primaria con CoronaVac. A continuación, se amplió la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 a toda la población inmunizada con CoronaVac, en un esquema de vacunación heteróloga, y más adelante a la población general vacunada inicialmente con BNT162b2. Con el transcurso del tiempo se fue aprobando la administración de dosis de refuerzo con BNT162b2 espaciadas entre sí para población de riesgo y población general, hasta llegar al esquema de vacunación vigente al momento. Al 5 de febrero de 2023, un 58,14% (2.073.498 individuos) de la población contaba con tres dosis de vacuna contra la COVID-19, un 23,32% (831.550 individuos) con cuatro dosis y un 2,98% (106.110 individuos) con 5 o más dosis²⁹⁷. Uruguay también fue pionero a nivel mundial en la administración de dosis

de refuerzo de manera masiva, como se puede observar en la Figura 14. El último hito en la historia de la vacunación contra la COVID-19 en Uruguay fue el inicio de la vacunación en niños entre 5 y 11 años y adolescentes de 12 a 18 años, con la vacuna BNT162b2 adecuada para cada franja etaria, en diciembre de 2021.

1.4 RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LAS VACUNAS CONTRA EL SARS-COV-2

El estudio de la respuesta inmune generada frente a la administración de una vacuna es clave para encontrar correlatos de protección inmunológica. Se define como correlato de protección inmunológica una función inmunológica que es responsable por la protección inducida por la vacuna. La idea detrás de la búsqueda de correlatos de protección inmunológicos es usar una medida inmunológica como marcador predictivo de la protección provista por una vacuna contra una enfermedad infecciosa. Esta relación permite establecer un puente inmunológico, por ejemplo, para predecir la eficacia de un candidato vacunal, y facilitar la aprobación de una vacuna nueva o actualizada basado en los datos de inmunogenicidad, sin la necesidad de realizar ensayos clínicos de fase III, los cuales pueden llevar mucho tiempo y presentar consideraciones éticas. Esta estrategia es utilizada para las vacunas estacionales contra influenza en la Unión Europea y EE. UU., reduciendo los costos y el tiempo necesarios para el desarrollo de estas. Además, definir los niveles de inmunidad requeridos para la protección contra variantes nuevas de SARS-CoV-2 puede ser útil para predecir la inmunidad a nivel poblacional y guiar políticas públicas de vacunación y administración de dosis de refuerzo. En algunos casos los correlatos de protección también pueden ser empleados para predecir el grado de protección a nivel individual. Existen numerosos ejemplos de correlatos inmunológicos de protección conocidos frente a diversas vacunas empleadas, donde se especifica el ensayo empleado y los niveles requeridos²⁹⁸. En algunos casos donde se desconoce cuál es el correlato de protección, o el mismo es difícil de medir, se pueden emplear medidas sustitutas de un parámetro inmunológico que no es responsable de la protección *per se*, pero sirve de indicador de una inmunidad protectora y es más simple de determinar.

Al momento, los estudios de correlatos inmunológicos para SARS-CoV-2 continúan siendo limitados. A pesar de las dificultades en torno a este tema, se ha llegado a la conclusión de que en el caso de las vacunas contra COVID-19, por una parte, no habría un umbral por encima del cual el individuo estaría protegido de la enfermedad y por debajo vulnerable, sino que se trataría de un gradiente. Y, por otro lado, el correlato de protección contra la infección no sería exactamente el mismo que para la enfermedad severa. Hay además acuerdo entre los diversos estudios, sobre la relación entre los anticuerpos neutralizantes y la eficacia de las vacunas contra la COVID-19. En la Figura

15 se esquematizan algunas de las funciones inmunológicas propuesta como posibles correlatos de protección.

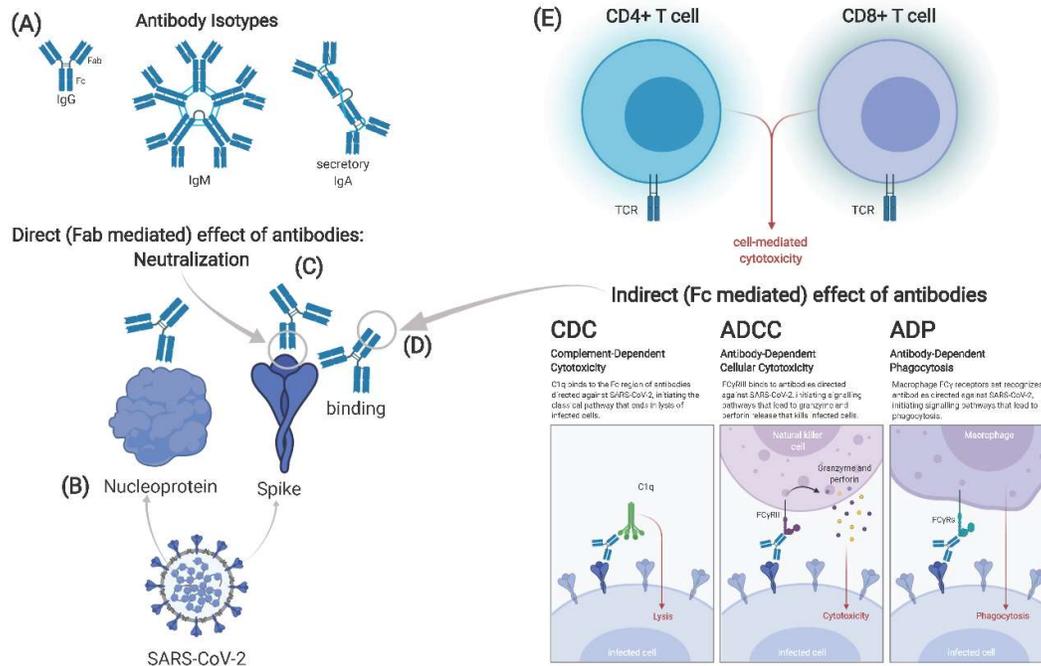


Figura 15. Posibles correlatos de protección contra el SARS-CoV-2. Se pueden identificar diferentes isotipos de anticuerpos después de la vacunación o la infección. La IgG y la IgM se encuentran en el suero, mientras que la IgA secretora en su forma dimérica se encuentra en las membranas mucosas. Los anticuerpos pueden estar dirigidos contra la proteína S u otras proteínas virales, por ejemplo, la proteína N. El efecto de los anticuerpos puede ser directo, mediado a través del fragmento de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo, o indirecto, mediado por el fragmento cristalizante (Fc). Este último incluye la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADP). Las respuestas inmunitarias celulares se pueden dividir en respuestas de células T CD4+ y CD8+ las cuales parecen ser relevantes para la protección contra formas graves de la enfermedad. Las correlaciones de protección pueden diferir en la infección y la vacunación, tal vez incluso entre diferentes tipos de vacunas. Figura tomada de Koch et al. 2021¹⁶⁶.

1.4.1. Respuesta inmune humoral y celular inducida por las vacunas contra SARS-CoV-2

Las vacunas contra COVID-19 tienen como objetivo principal inducir anticuerpos neutralizantes potentes específicos de la proteína S (Figura 16). La mayoría de las personas que recibieron vacunas a ARNm contra la COVID-19 desarrollaron linfocitos B y niveles elevados de anticuerpos IgM e IgG que podían ser detectados después de la segunda dosis²⁹⁹. Además, los niveles de linfocitos B memoria específicos para el RBD fueron equivalentes a los encontrados en personas que habían adquirido anticuerpos a partir de una infección natural por SARS-CoV-2²⁹⁹. Al igual que las

vacunas a ARNm, la vacuna Sputnik V indujo respuestas celulares y humorales específicas de la proteína S sólidas durante los ensayos de fase III³⁰⁰.

Las vacunas ChAdOx1 y Sputnik V provocaron respuestas de IgG específica de RBD y de anticuerpos neutralizantes detectables 20 días después de la primera dosis^{300,301}. Estas respuestas se reforzaron después de la administración de una segunda dosis de vacuna^{300,301}. Las formulaciones de la vacuna de ARNm contra la COVID-19 han optimizado la estructura de la proteína S nativa para permitir una exposición prolongada de las regiones inmunogénicas. Este inmunógeno diseñado, denominado S-2P, se ha incorporado a las vacunas a ARNm contra la COVID-19 para mejorar la inmunogenicidad^{302,303}. En este sentido, las vacunas a ARNm contra la COVID-19 estimulan respuestas robustas y persistentes de células Thf específicas de la proteína S del SARS-CoV-2, que se correlacionan fuertemente con la producción de anticuerpos neutralizantes³⁰⁴. También se ha demostrado que las vacunas a ARNm provocaban el desarrollo de anticuerpos IgA anti-S³⁰⁵. Pocos estudios comparan entre sí la respuesta inmune inducida por las diversas vacunas disponibles. En un trabajo en el que comparan la capacidad de distintas vacunas contra COVID-19 de estimular el desarrollo de anticuerpos neutralizante encuentran que todas ellas cumplen con esta función en mayor o menor medida³⁰⁶. (Figura 16)

La mayoría de los datos de inmunogenicidad se centran en las vacunas basadas en ARNm o vectores virales. Con respecto a las vacunas a virus inactivado, en el ensayo de fase 3 en adultos de 18 a 59 años en Turquía, dos dosis de CoronaVac indujeron anticuerpos anti-RBD en el 89,7% de los vacunados, mientras que se observó un 4,4% en el grupo de placebo³⁰⁷. En Indonesia, la seroconversión de anticuerpos neutralizantes se definió como el pasaje de un título <1:8 a un título ≥1:8, o un aumento de 4 veces si el título inicial era ≥1:8 a los 14 días después de la segunda dosis. La tasa de seroconversión en el grupo de la vacuna fue mayor que en el grupo de placebo (87,15 % [IC del 95 %, 83,50–90,09] versus 0,00 % [IC del 95 %, 0,00–2,81]) con un título medio geométrico (GMT) de 15,76 (IC del 95 %, 14,57–17,04) versus 2,02 (IC del 95 %, 1,98–2,05)³⁰⁸.

Las personas con infección previa por SARS-CoV-2, independientemente de la gravedad de la enfermedad, desarrollaron un título de anticuerpos neutralizantes de 10

a 45 veces mayor que los vacunados sin antecedentes de infección después de una sola dosis de las vacunas BNT162b2 o mRNA-1273^{309,310}. La administración de una segunda dosis no alteró este título, lo que sugiere que una dosis única de vacuna de ARNm es suficiente para obtener niveles máximos de anticuerpos y linfocitos B de memoria en personas con antecedentes de infección por COVID-19^{310,311}. Por lo tanto, las vacunas contra la COVID-19 no sólo median en la producción de anticuerpos neutralizantes, sino que también pueden mantener y aumentar sus títulos en personas con antecedentes de infección. La administración de dosis vacunales de refuerzo aumenta significativamente los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos y la evidencia sugiere que la inmunización heteróloga induce una mayor inmunidad de células B y T que la inmunización homóloga³¹².

En la mayoría de los estudios de registro de vacunas contra SARS-CoV-2 basadas en la proteína S se midió la respuesta celular específica contra este antígeno, aunque solamente en una parte de los participantes³¹³. En general se observa un efecto clínico protector dentro de los 11 días posteriores a la primera vacunación, que es concomitante con una sólida respuesta de las células T CD8+ en este período, lo que sugiere que esta población podría ser al menos en parte responsable de efecto³¹⁴. La respuesta de células T también es necesaria para sostener la generación y el mantenimiento de anticuerpos de alta afinidad, demostrándose que la vacunación con dos dosis de BNT162b2 conduce al desarrollo de células T CD4+ específicas del virus³¹⁵. Estas células T CD4+ exhiben un perfil Th1 y normalmente son detectables al día 8 después de la administración de la primera dosis de vacuna, alcanzan su punto máximo poco después de la segunda dosis y luego caen a los niveles previos a los 4 meses³¹⁶. La respuesta de las células T desarrollada luego de la vacunación tiene una magnitud similar a la observada después de la infección natural, aunque estas células T parecen estar algo más diferenciadas.

La magnitud de la inducción de células T específicas de la proteína S varía según el subtipo de vacuna utilizada, en algunos estudios se ha evidenciado que las plataformas basadas en adenovirus generan respuestas celulares algo más fuertes^{317,318}, mientras que las vacunas a ARNm estimularían la generación de títulos más altos de anticuerpos (Figura 16). Esto ha llevado a cierto interés en el uso de esquemas de vacunación heteróloga que puedan potenciar ambos tipos de respuesta^{319,320}, así como el empleo de vacunas basadas en péptidos³²¹. La respuesta celular inducida por la vacunación en

aquellos individuos con antecedentes de infección natural previa es notablemente mayor, alcanzando su punto máximo después de una sola dosis de vacuna, y mostrando también diferencias cualitativas como una localización mayor en los tejidos^{322,323}. Las vacunas intranasales han mostrado que favorecen el desarrollo de respuestas celulares y podrían mejorar la protección clínica a largo plazo³²⁴.

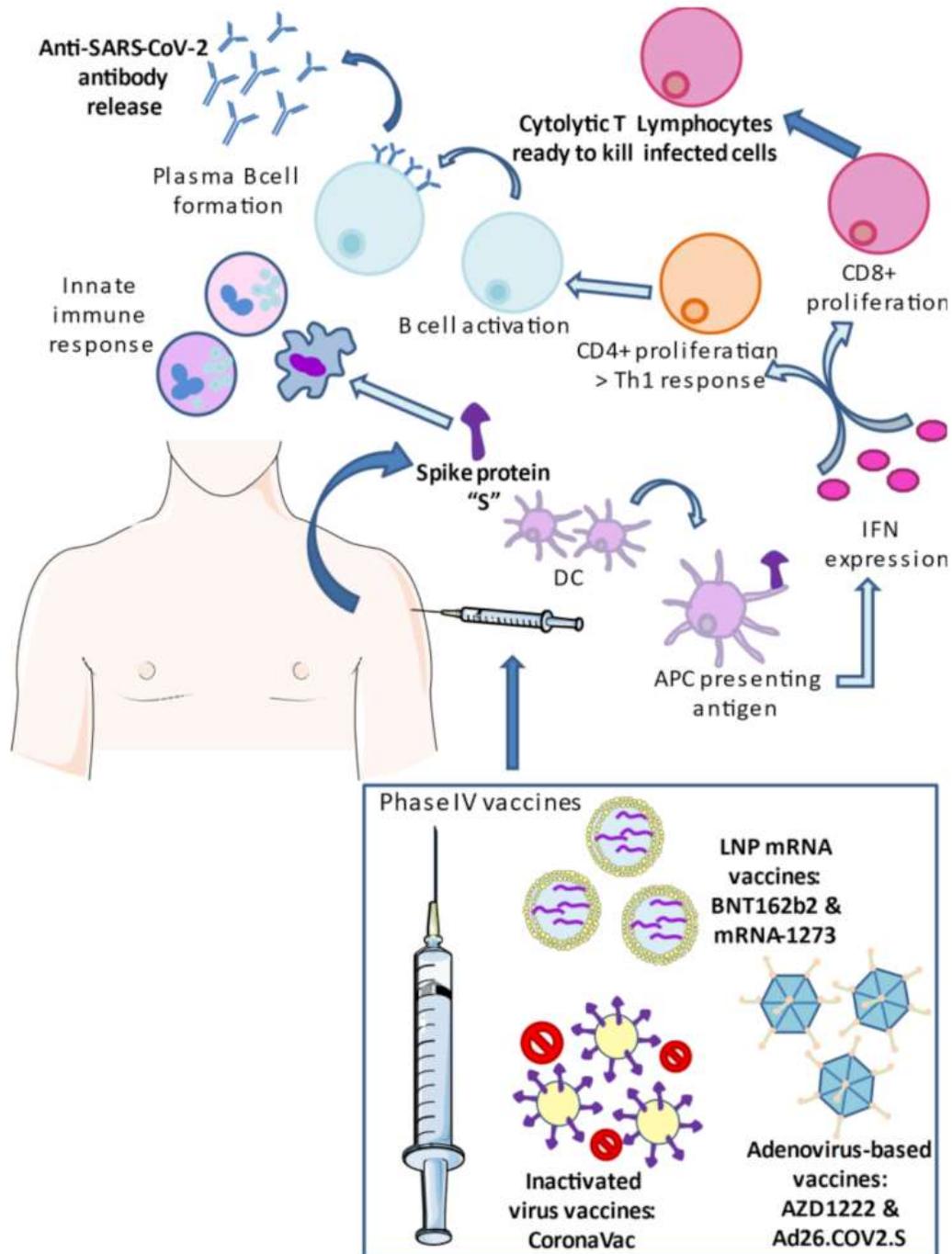


Figura 16. Respuesta inmune promovida por las vacunas contra la COVID-19. Las vacunas basadas en vectores adenovirales, ARNm o a virus inactivado pueden inducir una respuesta innata y adaptativa

coordinada, limitando de manera destacada el daño causado por la infección debido SARS-CoV-2. En todos los casos, el reconocimiento de la proteína S activa el sistema inmunológico innato y las vías del interferón, y promueve respuestas de células T y B, llevando a un aumento de células T citotóxicas y anticuerpos secretados específicos contra el SARS-CoV-2. Figura tomada de García-Montero et al. 2021³²⁵.

Si bien la disminución de anticuerpos después de la vacunación sigue siendo una preocupación, la generación de una respuesta de células T memoria trae consigo la esperanza de que la respuesta celular inducida sea más robusta. Un rasgo característico de las vacunas contra la COVID-19 es que presentan una mayor capacidad para proteger contra la enfermedad grave en comparación con la protección frente a la infección asintomática o leve. Esto puede indicar cierta limitación en la capacidad de los anticuerpos para prevenir la infección inicial, y se podría especular que las respuestas celulares son responsables de controlar que no se genere un daño tisular grave. A su vez, aunque algunas variantes virales pueden evadir fuertemente la inmunidad humoral, las respuestas celulares inducidas por las vacunas muestran una fuerte protección cruzada contra estas y respaldan el concepto de que las respuestas celulares contribuirían sustancialmente al control de la enfermedad³¹⁶.

En lo que respecta a la búsqueda de correlatos de protección inmunológica, un estudio de larga escala en trabajadores de la salud mostró que la positividad para la presencia de anticuerpos sería un buen predictor de un menor riesgo de infección, sugiriendo que el nivel de anticuerpos podría usarse como marcador de protección³²⁶. Sin embargo, en este trabajo no comparaban los niveles de anticuerpos entre infectados y no infectados, por lo que no se puede deducir información cuantitativa. Otros dos estudios compararon 7 vacunas contra COVID-19 y encontraron que los anticuerpos neutralizantes mostraban una correlación fuerte con la protección provista por las vacunas en los ensayos clínicos de fase III^{327,328}. Como limitaciones estos trabajos no utilizaban un método estándar para la cuantificación de anticuerpos por lo que debían normalizarlos a los niveles de anticuerpos presentes en los individuos convalecientes participantes de los estudios. Además, los ensayos clínicos fueron llevados adelante en diferentes países y momentos, por lo que las características demográficas de la población y la variante viral circulante podrían generar confusión en los resultados.

Por su parte, Moderna y AstraZeneca han publicado estudios de correlatos de protección inmunológicos llevados adelante durante el seguimiento de los receptores de sus vacunas^{329,330}. Ambos encontraron que los anticuerpos anti-S y neutralizantes

inducidos por las vacunas mRNA-1273 y ChAdOx1 son buenos predictores de protección contra la COVID-19 sintomática. Incluso sus datos proporcionan niveles absolutos de anticuerpos que podrían ser usados para predecir la eficacia de la vacuna y guiar la necesidad de dosis de refuerzo. Sin embargo, quedan dudas en cuanto a qué tan generalizables son estos datos para otras vacunas o regímenes de vacunación, y nuevas variantes virales. Actualmente, el umbral de 264 BAU/ml se asocia con una protección del 80% contra el COVID-19 sintomático causado por la variante Alfa³³¹. Un trabajo reciente indica que concentraciones de anticuerpos IgG específicos superiores a 500 BAU/mL o títulos de anticuerpos neutralizantes de 1024 o más protegen en gran medida contra la infección por la variante delta del SARS-CoV-2³³².

1.4.2. Respuesta inmune a las vacunas contra SARS-CoV-2 en RTOS

Las publicaciones evaluando la efectividad de las vacunas contra COVID-19 en RTOS aumentaron significativamente en el año 2022, incluyendo numerosas revisiones sistemáticas y metaanálisis. Se ha reportado de manera consistente una respuesta inmunitaria disminuida en esta población, la cual se ha asociado a diversos factores de riesgo. Una edad mayor a 65 años se ha asociado a tasas menores de seroconversión en prácticamente todos los trabajos, también tener patologías de base como diabetes o una función renal disminuida, haber recibido el órgano de un donante fallecido, y determinados tratamientos inmunosupresores (principalmente micofenolato mofetil, pero también corticoesteroides, inhibidores de calcineurina y betalecept, así como estar bajo un régimen de inmunosupresión múltiple), o la exposición reciente a rituximab o timoglobulina³³³. Algunos estudios compararon la respuesta de anticuerpos frente a las vacunas contra COVID-19 por tipo de órgano trasplantado estableciendo el siguiente gradiente de mejor a peor respuesta: hígado, corazón, riñón, riñón-páncreas, y pulmón³³³. También varios trabajos resaltan la utilidad de dosis de vacuna extra, incluido múltiples dosis de refuerzo³³⁴⁻³³⁶.

En una revisión sistemática, incluyendo a 11.713 RTOS, el rango medio sopesado de respuesta humoral positiva para la presencia de anticuerpos anti-S luego de la vacunación contra COVID-19 empleando vacunas a ARNm fue de 10.4% (0-37.9%) para 1 dosis, 44.9% (0-79.1%) para 2 dosis, y 63.1% (49.1-69.1%) para 3 dosis³³⁷. En dos de los estudios incluidos, el 50% de los pacientes no tenían o tenían una respuesta mínima de anticuerpos luego de 3 dosis, generando respuesta recién después de la cuarta

dosis³³⁷. En otra revisión incluyendo 85 trabajos de respuesta de anticuerpos en RTOS luego de dos dosis de vacuna contra COVID-19 (Pfizer/BioNTech, Moderna, AstraZeneca y CoronaVac), la tasa de seroconversión pooleda fue de 49% (IC95%, 44-55%) en pacientes trasplantados, significativamente menor que en los controles (99%)³³⁶. La clasificación por tipo de órgano mostró que los receptores de trasplante de pulmón mostraban la tasa más baja de seroconversión (29% [95%CI, 21%-36%]), seguido por riñón (37% [IC 95%, 30%-43%]) y corazón (37% [IC 95%, 23%-51%]); los TH presentaron la mayor tasa de seroconversión 65% [IC 95%, 58%-72%]³³⁶.

En este sentido, se ha demostrado que los TR generan una respuesta inmune menos robusta que la población general y que otros RTOS luego de la vacunación contra SARS-CoV-2. En un estudio observacional prospectivo multicéntrico incluyendo 368 pacientes, la tasa de seroconversión fue de 8% luego de dos dosis y de 42% luego de una tercera dosis³³⁸. Se demostró además un retraso en la cinética de aparición de células T CD4+ específicas para la proteína S, con un aumento significativo sólo luego de la administración de una dosis de refuerzo. La inmunosupresión y el tipo de vacuna fueron identificados como los factores de riesgo independientes principales para no generar anticuerpos³³⁸. El Belatacept, agentes antiproliferativos e inhibidores de calcineurina fueron asociados a una menor tasa de generación de anticuerpos comparado con inhibidores de mTOR y glucocorticoides³³⁸. Además, la tasa de seroconversión fue casi el doble con la vacuna a ARNm mRNA-1273 (49%) comparado con la vacuna BNT162b2 (26%)³³⁸.

En otro trabajo se reportó una seroconversión del 40% luego de dos dosis en TR comparado con un 98% en el grupo control no trasplantado³³⁹. La respuesta aumentó al 76% luego de la tercera dosis³³⁹. Cada año más de edad aumentaba el riesgo de tener una serología negativa en un 5%³³⁹. En cuanto a la respuesta celular, los niveles de células T CD4+TNF- α y T CD4+IFN- γ anti-S antes de la tercera dosis fueron menores en los pacientes trasplantados³³⁹. Otros estudios describieron una reducción significativa en la frecuencia de células T totales y T CD4+ post vacunación, pero un incremento en el porcentaje de Tregs y células T CD8+³⁴⁰. Los TR tienen un impedimento en la respuesta inmune humoral y celular frente a la vacunación contra SARS-CoV-2 que es única comparada con otros receptores de órganos sólidos, este fenómeno no sería enteramente explicado por diferentes niveles de inmunosupresión, y podría estar relacionado también a anomalías inmunológicas asociadas a la

uremia³⁴¹. La infección previa con SARS-CoV-2 favorece que se genere una respuesta inmune más efectiva. Luego de dos dosis de vacuna, la conversión serológica y la respuesta de células T específicas fue significativamente mayor en TR previamente infectados comparado con no infectados (97.1% contra 40.1% respectivamente para respuesta humoral, y 90% contra 9.4%, respectivamente, de células T)³⁴².

Esta falta de respuesta luego de la vacunación con dos dosis es responsable de numerosos casos de infección y pobres desenlaces de la enfermedad, que son similares a pacientes trasplantados no vacunados^{343,344}. Luego de tres dosis, aunque el riesgo de infección continúe siendo alto, los casos críticos son significativamente menos frecuentes, lo que se evidencia en una reducción de las admisiones a UCI, necesidad de soporte ventilatorio y muertes³⁴⁵. La información disponible converge para indicar una respuesta inmune aumentada en TR luego de la administración de una tercera dosis de vacuna, así como un aumento en los títulos de anticuerpos de los pacientes que ya habían respondido a la segunda dosis^{280,346-348}. Sin embargo, comparado con la población general, el riesgo de enfermedad grave y muerte continúa siendo desproporcionadamente más alto^{345,349,350}.

A esto se le suma que las variantes virales más recientes, como ser delta y ómicron, se caracterizan por su capacidad de evadir parcialmente la respuesta inmune, desplazar rápidamente otras variantes circulantes, y llevar a infecciones. En un estudio observacional, se encontraron anticuerpos neutralizantes contra la variante delta solamente en un 59% de los pacientes luego de la tercera dosis, y contra ómicron en un 43% de los casos³⁵¹. En un trabajo similar, determinaron que, si bien un 67% de los pacientes desarrollan anticuerpos luego de la tercera dosis, la frecuencia de pacientes que generan anticuerpos neutralizantes contra la variante ómicron aumenta de 0 a 12%³⁵². Entonces, si bien la administración de una tercera dosis aumenta significativamente la inmunidad en TR, la actividad de anticuerpos neutralizante contra variantes puede ser subóptima incluso en aquellos que desarrollan una respuesta humoral. Esto pone de manifiesto la necesidad de optimizar la vacunación en esta población vulnerable.

Consistente con lo que se ha observado para otros RTOS, los TH tienden de manera significativa a mostrar una respuesta inmune humoral disminuida frente a la vacunación

contra COVID-19, aunque se encuentran dentro de los más respondedores cuando se los compara con los receptores de otros órganos sólidos. Se ha encontrado que la tasa de seropositividad para anticuerpos específicos luego de dos dosis de vacunas en TH se encuentra entre un 38.7% y 71%³⁵³. Además, se ha demostrado que una tercera dosis de vacuna a ARNm aumenta los niveles de anticuerpos y la respuesta de células T en esta población.

Como estrategia terapéutica, se ha propuesto una interrupción en el uso de agentes antiproliferativos por unas pocas semanas para aumentar la respuesta a una tercera o cuarta dosis en aquellos RTOS que no generaron una respuesta inmune frente a dosis previas³⁵⁴.

1.4.3 Respuesta inmune a las vacunas contra SARS-CoV-2 en pacientes en diálisis crónica

Dadas las alteraciones inmunológicas mencionadas anteriormente contar con estrategias de vacunación efectiva son de particular importancia para proteger a los pacientes con enfermedad renal crónica, especialmente aquellos con fallo renal. Similar a lo que ocurre frente a la infección natural, los pacientes con ERC generan respuestas inmunológicas disminuidas frente a la vacunación, cuando se los compara con individuos sanos. Esto ha llevado a que se ajusten los regímenes de vacunación en esta población, especialmente en el caso de las vacunas contra el virus de la hepatitis B e influenza A H1N1.

Las revisiones bibliográficas disponibles con respecto a la vacunación contra COVID-19 en PD se concentran principalmente en la respuesta a vacunas basadas en ARNm. En líneas generales las tasas de seroconversión son altas en PDC frente al esquema de vacunación primario^{338,355,356}, cuando se compara con otros grupos de pacientes inmunosuprimidos como podrían ser los TR. La tasa estimada de detección de anticuerpos para pacientes en HD fue de 45% luego de la primera dosis y 89% luego de la segunda dosis, comparado con 95% y 100% en controles sanos³⁵⁶. Sin embargo, los niveles de anticuerpos alcanzados fueron significativamente menores en los pacientes en HD comparado con los controles^{355,357-362}. A modo de ejemplo, en un análisis realizado 8 semanas luego de la vacunación con BNT162b2 sólo un 26% de los

pacientes en HD habían pasado el umbral de las 590 BAU/ml, comparado con un 84% en el grupo control³⁵⁵. La infección previa por SARS-CoV-2 indujo una respuesta más potente luego de la vacunación, alcanzando, en líneas generales, los mismos niveles de anticuerpos que los controles sanos sin infección previa. Los niveles de anticuerpos muestran una disminución en el tiempo a una velocidad similar a lo observado en la población general, las respuestas más perdurables fueron detectadas en aquellos individuos que presentaban niveles más altos de anticuerpos inicialmente, como era esperable.

En análisis multivariados se identificaron como predictores independientes de una pobre respuesta de anticuerpos los siguientes factores: uso de drogas inmunosupresoras, niveles bajos de albúmina sérica, bajo conteo linfocitario, estatus de no respuesta a la vacunación contra hepatitis B, bajos niveles de IgG, mayor tiempo en diálisis, y una dosis mayor de hierro i.v. La edad aparece como predictor independiente en algunos estudios, pero no en otros, siendo probable que la “edad inmunológica” sea mejor predictor que la edad numérica per se. En un grupo de trabajos los niveles de anticuerpos parecen ser numéricamente superiores en los pacientes en DP comparado con aquellos en HD. Dosis vacunales de refuerzo incrementan significativamente los niveles de anticuerpos en la mayoría de los PDC, siendo los pacientes con una respuesta inicial más pobre los que obtienen un beneficio relativo mayor.

1.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE AL SARS-COV-2

El desarrollo de ensayos diagnósticos específicos y sensibles ha sido un componente crítico para la detección de individuos infectados y el manejo de la pandemia por SARS-CoV-2. Mientras que los ensayos de PCR y de detección de antígenos virales han permitido la identificación de individuos cursando la infección, los ensayos serológicos proporcionan evidencia sobre la exposición previa al virus y la dinámica de la respuesta inmune humoral al SARS-CoV-2³⁶³. Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos producidos por el sistema inmunitario del hospedero en respuesta a la infección viral, y pueden ayudar a estimar la prevalencia de la infección en la población y a evaluar la eficacia de las intervenciones realizadas para el control de la pandemia, como ser la aplicación de vacunas. Además, los ensayos serológicos pueden ser útiles en la investigación de la respuesta inmunológica al virus, incluyendo su duración y magnitud, así como la capacidad de los anticuerpos presentes para neutralizar la interacción del virus con su célula blanco y eliminar células infectadas. Estos ensayos se complementan con los que permiten detectar y cuantificar la respuesta de células T generada contra el virus. Si bien la respuesta inmune celular ha mostrado ser importante para la resolución de la infección por el SARS-CoV-2³⁶⁴, es más compleja de analizar, por lo que la respuesta de anticuerpos se ha posicionado como un buen indicador de respuesta protectora tanto en contexto de infección como de vacunación.

Existen varios tipos de ensayos serológicos disponibles para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 (Figura 17). Cada tipo de ensayo tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección de la prueba dependerá de factores como la sensibilidad y especificidad, el costo y la disponibilidad. Al 16 de febrero de 2023, la FDA había concedido una autorización de uso de emergencia a 84 ensayos serológicos o ensayos de evaluación de la respuesta inmune adaptativa³⁶⁵, incluidos 4 ensayos “*in house*” para la detección de anticuerpos llevados adelante en laboratorios de instituciones académicas y de salud pública. Los ensayos se pueden clasificar de acuerdo con la plataforma que se utiliza para evidenciar la presencia de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2³⁶⁶. Algunos autores también hacen la distinción entre los ensayos de diagnóstico rápido, como los que emplean un formato de tira reactiva, y los ensayos no rápidos³⁶⁷. Dentro de los ensayos serológicos se incluyen los ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT), utilizados como técnica patrón para la detección de anticuerpos con capacidad neutralizante en suero; e inmunoensayos, como el ensayo

de inmuoadsorción ligado a enzima (ELISA), el inmunoensayo de flujo lateral (LFIA)³⁶⁸, el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), el inmunoensayo de electro quimioluminiscencia (ECLIA); y el Biosensor.

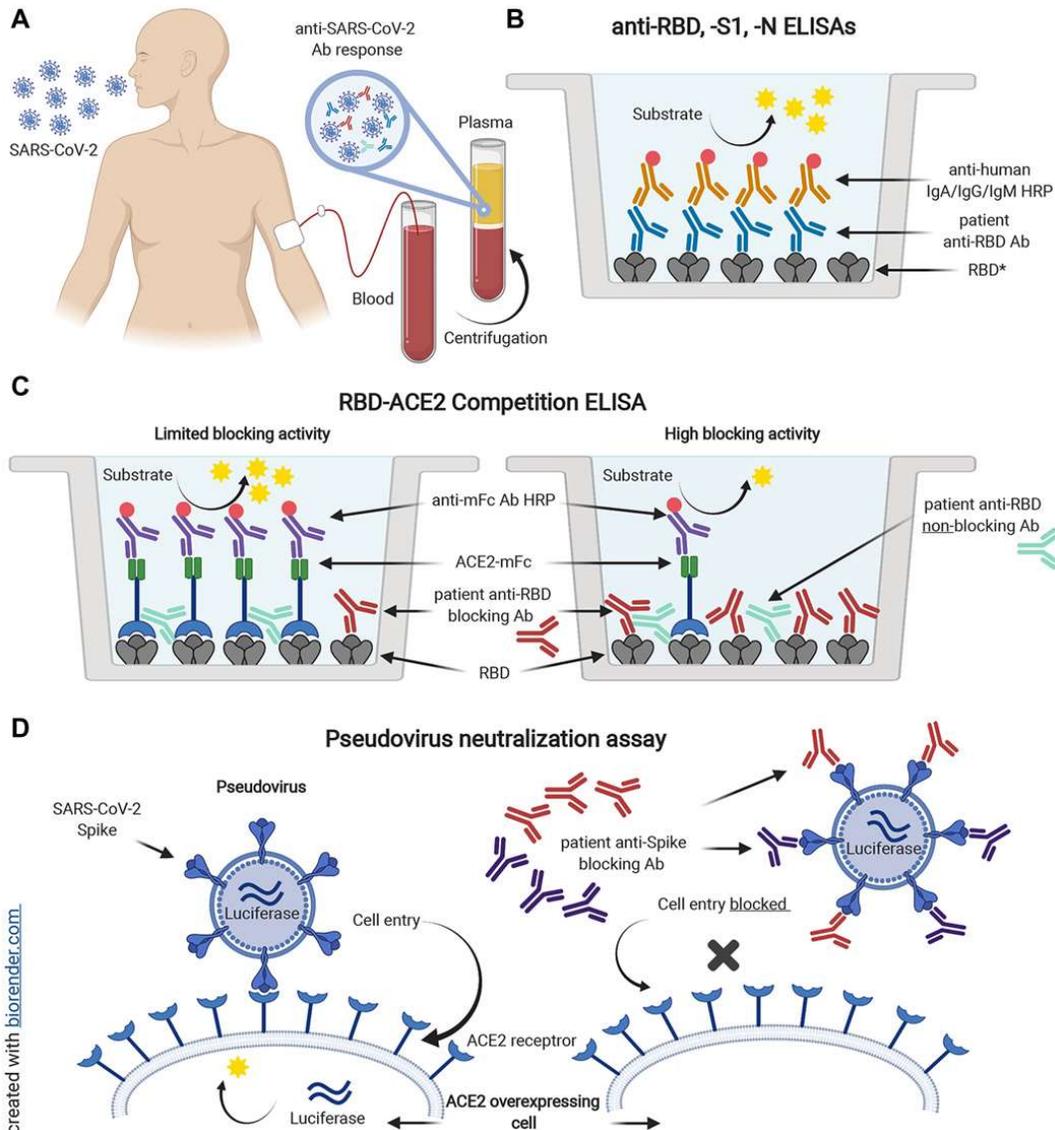


Figura 17. Ensayos serológicos para la evaluación de la respuesta de anticuerpos específica contra el SARS-CoV-2. **A-** Los individuos infectados con el SARS-CoV-2 o vacunados contra el este generan anticuerpos específicos que pueden ser detectados a nivel sérico. **B-** Los ensayos de tipo ELISA indirecto permiten la detección de anticuerpos específicos (IgM, IgA y/o IgG) dirigidos contra diferentes antígenos virales, la mayoría de los ensayos de ELISA disponibles utilizan S1, RBD o N como antígenos. **C-** Ensayos de ELISA de tipo competitivo han sido adaptados para su utilización como ensayos sustitutos de neutralización (sVNT) permitiendo evidenciar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el RBD capaces de cloquear la interacción de este con el receptor celular ACE2. **D-** Los ensayos de neutralización empleando pseudovirus son una alternativa interesante a los PRNT ya que tienen menores requerimientos de bioseguridad y son más accesibles.

1.5.1. Ensayo de inmuoadsorción ligado a enzima (ELISA)

El ELISA es un método bioquímico que combina el inmunoensayo con el ensayo enzimático. Se sustenta en el principio inmunológico básico de la unión específica antígeno-anticuerpo, para detectar uno u otro en una muestra de interés. En el ELISA se utilizan antígenos o anticuerpos conjugados a una enzima para detectar la presencia del inmunocomplejo. Existen diversos formatos de esta técnica, dependiendo de cuál es el propósito del ensayo y la muestra a analizar, destacándose: el ELISA directo, el ELISA indirecto, el ELISA sándwich, y el ELISA competitivo³⁶⁹.

El ELISA directo es utilizado para determinar y/o cuantificar la presencia de un antígeno en una muestra a partir de la utilización de un anticuerpo específico que ya está conjugado de manera directa a una enzima. En el ELISA indirecto, se inmoviliza un antígeno y se agrega un anticuerpo primario específico no conjugado, luego se adiciona un anticuerpo secundario, dirigido contra los anticuerpos primarios, que se encuentra conjugado a una enzima. En ambos casos, luego del agregado del anticuerpo conjugado se adiciona el sustrato de la enzima, y se permite que se desarrolle color, siendo la intensidad del color proporcional a la presencia del analito en la muestra. Si bien el ELISA directo es una herramienta diagnóstica más rápida no permite la amplificación de la señal y suele presentar por tanto una baja sensibilidad, siendo empleado en escenarios donde hay abundancia del analito en la muestra. Además, es necesario disponer de anticuerpos primarios específicos contra el antígeno ya conjugados a una enzima. El ELISA indirecto permite más versatilidad en este sentido, ya que múltiples anticuerpos primarios de la misma especie pueden ser detectados utilizando anticuerpos secundarios conjugados a enzima que se encuentran disponibles comercialmente. Este formato de ensayos es ampliamente utilizado para la detección de anticuerpos específicos contra antígenos en muestras biológicas, un ejemplo es su utilización para el diagnóstico serológico de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)³⁷⁰.

Soluciones más complejas pueden ser analizadas utilizando un ELISA en formato sándwich, su nombre deriva de que el analito se captura entre dos anticuerpos para su detección. En un primer paso uno de los anticuerpos, llamado anticuerpo de captura se inmoviliza a la placa, luego se agrega la muestra a analizar y por último se coloca un segundo anticuerpo específico para el analito, llamado anticuerpo de detección. Si este anticuerpo de detección ya se encuentra conjugado a una enzima decimos que se trata de un ELISA sándwich directo, y si es necesario agregar un anticuerpo secundario

conjugado, dirigido contra el anticuerpo de detección, sería un formato indirecto. La ventaja de este tipo de ELISA es la alta especificidad que presenta para la detección de analitos, además el anticuerpo de captura inmoviliza el antígeno presente en la muestra de manera específica por lo que no son necesarios pasos extra de purificación. Como desventaja, para realizar este ensayo se requiere de dos anticuerpos específicos para el antígeno que reconozcan epítomos diferentes entre sí y funcionen bien en conjunto, el ensayo lleva además más tiempo de ejecución y es más costoso que los ELISA directo e indirecto.

Por último, el ELISA competitivo es diferente a los anteriores ya que se basa en el proceso de unión competitiva. El anticuerpo primario se incuba con la muestra sin purificar, dejando que se una a todo el antígeno presente en la misma, luego esta muestra se agrega a una placa donde se encuentra inmovilizado el antígeno. Cuanto más antígeno estuviese presente en la muestra mayor número de complejos antígeno-anticuerpo se habrán formado y menos anticuerpo estará libre para interactuar con el antígeno inmovilizado en la placa. Hay por tanto una competencia por la unión al anticuerpo entre el antígeno presente en la muestra y el inmovilizado en la placa. Finalmente, se agrega un anticuerpo secundario conjugado dirigido contra el anticuerpo primario y la presencia de este se revela mediante el agregado de sustrato. En el ELISA competitivo se genera una curva inversa, donde cuanto más antígeno esté presente en la muestra original menor será la señal generada. Algunos ensayos de neutralización viral sustituta que permiten detectar la presencia de anticuerpos con capacidad de inhibir la interacción entre ACE2 y el RBD del SARS-CoV-2 se basan en este principio, como veremos más adelante (Figura 17-C).

Con el comienzo de la epidemia por SARS-CoV-2 en diversas partes del mundo se comenzaron a desarrollar ensayos para la detección de anticuerpos específicos contra este patógeno. En este sentido, uno de los trabajos pioneros fue el de Amanat et al.³⁷¹ en el cual describieron la producción de manera recombinante en células de mamífero de la proteína S (en forma de trímero estabilizado) y de su RBD, y su utilización como antígenos para el desarrollo de un ensayo “in house” de tipo ELISA indirecto que permitía la detección de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 en suero, demostrando que este método era capaz de distinguir individuos previamente infectados de aquellos que no habían cursado la infección, y dando indicios de una buena correlación entre el título de anticuerpos determinado mediante ELISA y la capacidad

neutralizante de los mismos³⁷¹. A este primer método descrito le siguieron numerosos ensayos serológicos basados en el método de ELISA desarrollados temprano en la pandemia que permitieron la detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 para determinar seroconversión luego de la infección (Figura 17-B).

Disponer de antígenos que puedan ser reconocidos por los anticuerpos es un punto crucial para el desarrollo de métodos serológicos precisos. La proteína N y la proteína S son los principales inmunógenos del SARS-CoV-2³⁷², dentro de la proteína S la subunidad S1 es la que más difiere con otros coronavirus similares, por lo que esta subunidad o incluso el RBD son utilizadas como base para el desarrollo de ensayos de ELISA. El nivel de la respuesta de anticuerpos frente a la infección por SARS-CoV-2 puede variar de acuerdo con la edad, sexo, y la presencia de comorbilidades. La presencia de IgM e IgG específicas son comúnmente utilizadas como indicadores de infección pasada³⁷². Actualmente existe un amplio número de ensayos de ELISA que permiten detectar la presencia de anticuerpos IgM y/o IgG específicos contra N, S, S1 o RBD de SARS-CoV-2, tanto comerciales como “in house”, a partir de muestras de suero, plasma o sangre³⁷³ (Figura 17-B). También se ha incursionado en la detección de IgA específicas a partir de otras muestras biológicas relevantes como ser saliva³⁷⁴. El antígeno que se utiliza en el ensayo, la muestra biológica, el isotipo de anticuerpo detectado, el momento en el que se realiza el ensayo y sus características determinarán los usos de este.

Por ejemplo, los ensayos que determinan la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína N del SARS-CoV-2 son útiles para indicar una exposición pasada al virus, pero en principio los anticuerpos anti-N no estarían involucrados de manera directa en la neutralización viral^{375,376}. Por el contrario, la respuesta de anticuerpos dirigida contra la proteína S y en particular contra el RBD podría ser considerada como un indicador sustituto de una respuesta de anticuerpos protectora ya que la mayor parte de los anticuerpos con capacidad neutralizante se dirigen contra esta región^{377,378}. Sin embargo, no todos los anticuerpos dirigidos contra el RBD tienen capacidad neutralizante, y no todos los anticuerpos con capacidad neutralizante están dirigidos contra el RBD, por lo que es útil complementar estos ensayos con otros que permitan evaluar de manera más directa la capacidad neutralizante.

1.5.2 Ensayos de neutralización

Dentro de los ensayos serológicos de neutralización el más utilizado es el PRNT, considerado como el ensayo de referencia para medir la actividad neutralizante anti-SARS-CoV-2^{379,380}. El suero del paciente se diluye e incuba con el virus para luego agregarlo a un cultivo de células buscando su infección. Estos ensayos se basan en el principio de que los anticuerpos neutralizantes, en caso de estar presentes, van a prevenir que el virus infecte las células y esto se va a evidenciar en un descenso del número de placas. Este es un método para detectar y medir el título de anticuerpos presentes en muestras de suero calculando el porcentaje de disminución de la actividad viral, esto generalmente se determina contando cuánto disminuye el número de placas (áreas localizadas de infección evidenciadas por el efecto citopático del virus) luego de agregar el suero conteniendo anticuerpos neutralizantes comparado con el control. Para expresar el resultado normalmente se utiliza el PRNT50 definido como el título de suero que genera una reducción del 50% en el número de placas. Sin embargo, el PRNT tiene varias desventajas que lo convierten en un método que no puede ser utilizado de manera masiva: su realización conlleva varios días de trabajo, requiere de personal calificado y debe ser realizado bajo condiciones de bioseguridad nivel 3 (BSL3).

En este sentido, varios métodos alternativos han sido desarrollados para obtener resultados más rápidos y sin tantos requerimientos de infraestructura, que utilizan el PRNT como estándar. Un ejemplo de esto son los ensayos basados en pseudovirus (Figura 17-D). Un pseudovirus es un virus quimérico que comprende el esqueleto de un virus que incorpora la proteína de superficie del virus de interés. Los genes del pseudovirus son modificados para “ocultar” sus propias proteínas de superficie y no ser replicativos. Los pseudovirus pueden ser manipulados en laboratorios de bioseguridad nivel 2 (BSL2), los cuales están disponibles en múltiples lugares. Para propósitos de screening masivo los pseudovirus llevan un gen reportero (NanoLuc luciferasa o genes fluorescentes verdes) lo que permite detectar las células infectadas. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el VIH-1 son comúnmente utilizados como sistema de empaquetamiento de pseudovirus del SARS-CoV-2³⁸¹. Esto se basa en que poseen una alta eficiencia de entrega y permiten la inserción de 8 a 9 kb de genes de interés. El VSV conteniendo la proteína S se ha utilizado en múltiples ensayos de neutralización con pseudovirus para cuantificar anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2³⁸². Varias líneas celulares han sido utilizadas en ensayos de neutralización con estos pseudovirus, incluyendo: ACE2 293T (epitelio renal humano), Calu-3 (epitelio de pulmón humano),

Vero-E6 (epitelio renal), Ips-CMs (cardiomiocitos derivados de iPS), y Huh-7 (hepatoma humano), mostrando una buena eficiencia³⁸². Aunque los sistemas de pseudovirus facilitan los estudios de neutralización, permanecen algunas limitaciones al respecto, por ejemplo, en estos experimentos las líneas celulares blanco expresan de manera exógena ACE2, en algunos casos en conjunto con TMPRSS2, para facilitar la infectividad del pseudovirus. Además, la densidad de la proteína S en la superficie del pseudovirus puede influenciar la entrada de este a la célula y la habilidad de los sueros para neutralizar.

Además de los ensayos de neutralización mencionados antes, se han desarrollado métodos aún más simples para la detección de anticuerpos neutralizantes, como los ensayos de neutralización viral sustitutos (sVNT) (Figura 17-C). Los sVNT pueden ser realizados en instalaciones BSL1 o BSL2, por lo que constituyen una alternativa rápida y costo-efectiva a los ensayos con pseudovirus. Desde el comienzo de la pandemia varios inmunoensayos, entre ellos varios ELISA, han sido desarrollados para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2, especialmente anticuerpos neutralizantes^{383–385}. Estos ensayos se basan en la interacción entre el ACE2 y el RBD. Básicamente se inmoviliza el ACE2 o el RBD recombinante y se utiliza ACE2 o RBD conjugados a HRP para producir una señal que puede ser medida. La mayoría de estos ensayos son ELISA de competencia en los cuales los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero compiten con el ACE2-HRP o el ACE2 inmovilizado por unirse al RBD inmovilizado o al RBD-HRP, respectivamente. Si la muestra de suero contiene anticuerpos neutralizantes dirigidos al RBD del SARS-CoV-2, la intensidad del color producido será inversamente proporcional a la cantidad de estos anticuerpos que esté presente.

1.5.3 Estándares internacionales para ensayos serológicos contra el SARS-CoV-2

Dado el número tan alto de ensayos serológicos diferentes, existe la necesidad de contar con estándares que permitan comparar los resultados obtenidos utilizando diferentes pruebas. En diciembre de 2020 fue adoptado por el Comité Experto en Estándares Biológicos de la OMS, el primer Estándar Internacional y Panel Internacional de Referencia de la OMS de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2. El estándar internacional está constituido a partir de un conjunto de plasmas humanos de pacientes

convalecientes de SARS-CoV-2. El panel de referencia incluye la muestra F (20/150) de alto título, la muestra J (20/148) de título medio, la muestra E (20/144) de bajo título anti-S y alto título relativo anti-N, la muestra I (20/140) de bajo título, y la muestra H (20/142) negativa. Además del estándar internacional, la OMS propuso la BAU (“*binding antibody unit*”) como unidad para cuantificar la presencia de anticuerpos específicos contra un determinado antígeno en una muestra.

2. CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA

A noviembre de 2023, se han reportado a nivel mundial más de 772 millones de casos de COVID-19 y casi 7 millones de muertes asociadas a esta enfermedad⁸¹. El 13 de marzo de 2020 se reportaron los primeros casos confirmados de COVID-19 en Uruguay y ese mismo día se decretó el estado de emergencia sanitaria nacional, el cual fue levantado por el gobierno en abril de 2022. Los ensayos basados en la detección del genoma del SARS-CoV-2 y de antígenos virales han sido ampliamente empleados para el diagnóstico de la infección viral aguda. Por otro lado, los ensayos serológicos, a pesar de que han mostrado no ser adecuados para diagnosticar la infección en etapas tempranas, sí pueden ser utilizados en un número importante de otras aplicaciones. En un contexto global marcado por la escases y dificultad de acceso a recursos vinculados al diagnóstico y tratamiento de COVID-19, disponer de un ensayo serológico propio que permitiera detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2, permitía aumentar la soberanía de nuestro país generando información local rápida que sirviera de insumo para la toma de decisiones.

En primer lugar, los ensayos serológicos son una herramienta complementaria a los ensayos de diagnóstico molecular que permiten detectar infecciones pasadas no diagnosticadas oportunamente y, de esta manera, evaluar el alcance real de la epidemia a través de la realización de estudios de seroprevalencia, hecho importante para evidenciar factores de riesgo que favorezcan la propagación del virus y tomar medidas de contención más eficaces. También permiten evaluar la respuesta inmune humoral que se genera en los individuos infectados por SARS-CoV-2 y su persistencia en el tiempo, dando indicios sobre si luego de cursada la enfermedad se generaría protección frente a la reinfección y cuánto tiempo persistiría esta. En etapas tempranas de la pandemia y frente a la ausencia de tratamientos específicos contra la COVID-19 se propuso la utilización de plasma convaleciente de individuos recuperados con fines terapéuticos. Esto se basaba en la presencia de anticuerpos específicos con capacidad neutralizante en el plasma, siendo la detección y cuantificación de anticuerpos clave para esta aplicación. Además de estas aplicaciones los ensayos serológicos también sirvieron de soporte para trabajos de investigación relacionados a la infección por SARS-CoV-2 llevados adelante en nuestro país.

La evolución de la pandemia estuvo acompañada por un rápido y sin precedentes desarrollo de vacunas contra COVID-19, algunas basadas en plataformas tradicionales y otras en tecnologías relativamente nuevas. Las primeras vacunas contra COVID-19 fueron autorizadas para su uso de emergencia en diciembre de 2020, basado en ensayos de seguridad e inmunogenicidad en grupos seleccionados de individuos. La campaña de vacunación contra COVID-19 en Uruguay comenzó el primero de marzo de 2021. La información disponible respecto a la respuesta inmunológica inducida por las vacunas contra COVID-19 a ser utilizadas en nuestro país era escasa, en el caso de la vacuna BNT162b2, y prácticamente nula, en el caso de CoronaVac. En este contexto, disponer de un ensayo serológico que permitiera cuantificar la respuesta inmune humoral específica generada en la población frente a la aplicación de estas vacunas y conocer su evolución en el tiempo, surgían como elementos clave para el manejo de la epidemia en nuestro país. Desde el área clínica, tanto a nivel mundial como nacional, emergió la necesidad de saber si grupos particulares de pacientes, como aquellos en estado de inmunosupresión natural o inducida, no incluidos en los ensayos clínicos de las vacunas contra COVID-19, respondían de la misma manera que la población general o requerían de un esquema de vacunación particular contra el SARS-CoV-2. Si bien la respuesta a estas preguntas iba surgiendo de manera natural y relativamente rápida para las vacunas utilizadas en países desarrollados, como las basadas en ARNm o vectores virales, no era así para otras vacunas, como las vacunas a virus inactivado, volviéndose necesario generar información propia.

A la luz de la evidencia generada tanto a nivel nacional como internacional respecto a la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación primaria contra COVID-19 en diferentes poblaciones y su evolución en el tiempo, y en un escenario de aparición de variantes virales del SARS-CoV-2 que evadían al menos parcialmente esta respuesta, se dispuso la aplicación de dosis vacunales de refuerzo empleando la vacuna BNT162b2 en toda la población. Esto implicó que individuos que habían sido inmunizados con CoronaVac recibieran una dosis de BNT162b2, en un esquema de vacunación heteróloga pionero a nivel mundial. Esto planteó nuevamente la necesidad de generar datos propios respecto al efecto de esta intervención sobre la respuesta inmune específica contra el SARS-CoV-2, tanto en la población general como en pacientes inmunosuprimidos.

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de la presente tesis fue desarrollar y validar un ensayo serológico que permitiera la detección y cuantificación de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el SARS-CoV-2 en muestras de suero humanas, con la intención de dar respuesta a distintas preguntas relacionadas a la respuesta inmune humoral estimulada por la infección viral o la vacunación que surgieran en el transcurso de la pandemia por COVID-19 en Uruguay.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar, caracterizar y validar un ensayo serológico de tipo ELISA indirecto para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 en muestras de suero humanas.
- Aplicar este ensayo en territorio para medir la respuesta inmune humoral inducida en respuesta a la infección por SARS-CoV-2. En particular, evaluar su utilidad para detectar infecciones pasadas por SARS-CoV-2 en poblaciones de interés a través de su aplicación en estudios de seroprevalencia, y aplicarlo para la generación de un banco de plasma convaleciente de COVID-19.
- Evaluar la dinámica de generación y evolución en el tiempo de anticuerpos séricos anti-RBD de SARS-CoV-2 en una cohorte de trabajadores de un instituto de investigación uruguayo durante dos años.
- Estudiar la respuesta inmune humoral inducida por los esquemas de vacunación contra COVID-19 empleados en Uruguay en un grupo representativo de la población general y en pacientes con distintos niveles de inmunosupresión, como ser receptores de trasplantes de órganos sólidos y pacientes en diálisis crónica.

3. RESULTADOS

Este capítulo se divide en tres secciones, en la primera se describe el desarrollo, validación y aplicación en etapas temprana de la pandemia de un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en muestras de suero humanas. Esta sección se compone íntegramente de resultados no publicados. En la segunda sección se muestran los resultados no publicados de un estudio de seroprevalencia y evolución en el tiempo de anticuerpos específicos en una cohorte de trabajadores de un instituto de investigación, y los resultados contenidos en una publicación científica derivados de este ensayo que permitieron estudiar la respuesta inmune humoral inducida por un régimen de vacunación heteróloga en la población uruguaya. La última sección engloba resultados generados respecto a la respuesta inmune humoral desarrollada frente a la vacunación contra COVID-19 en RTOS, contenidos en tres publicaciones científicas, y resultados no publicados de la respuesta en PDC.

3.1 DESARROLLO A NIVEL NACIONAL DE UN ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA EL SARS-COV-2

Los ensayos basados en la detección del genoma del SARS-CoV-2 y de antígenos virales han sido ampliamente empleados para el diagnóstico de la infección viral aguda. Los ensayos serológicos, a pesar de no ser adecuados para diagnosticar la infección en etapas tempranas, sí pueden ser utilizados en un número importante de otras aplicaciones. Entre ellas, han permitido estudiar la respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2 de una manera cualitativa y cuantitativa. Los estudios de seroprevalencia han sido fundamentales para determinar la tasa de infección en un área afectada, de manera más precisa, sobre todo en escenarios donde el diagnóstico de la infección aguda pudo verse desbordado. Los ensayos serológicos también permitieron la identificación de individuos que generaron respuestas de anticuerpos robustas con altos títulos, y podían ser útiles como donantes para la generación de plasma convaleciente con fines terapéuticos. Por último, estos ensayos pueden servir para identificar respuestas de anticuerpos (ya sea inducidas por la infección *per se* o mediante vacunación) que puedan correlacionarse con protección frente a la infección

por SARS-CoV-2 o el desarrollo de formas graves de la enfermedad. En esta sección se aborda el trabajo llevado adelante para el desarrollo a nivel nacional de un ensayo de ELISA para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2, y algunos ejemplos de su aplicación en territorio en etapas tempranas de la pandemia.

3.1.1 Puesta a punto de un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2

En marzo del 2020 se conformó en nuestro país un grupo de trabajo interinstitucional con el objetivo de desarrollar ensayos serológicos para el SARS-CoV-2. Este grupo, integrado por investigadores de la UdelaR (Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias, Facultad de Química, Polo Tecnológico de Pando) y el IP Montevideo, en consorcio con la compañía ATGen, trabajó sobre el desarrollo de varias opciones de métodos serológicos para la detección de anticuerpos generados contra el SARS-CoV-2. Nos focalizaremos particularmente en el proceso de desarrollo, validación y aplicación de tres versiones de un ensayo de ELISA indirecto para la detección de inmunoglobulinas humanas de tipo IgG dirigidas contra el RBD de la proteína S de este virus. En la Figura 18 se esquematizan los principales hitos del grupo referidos a estos desarrollos.

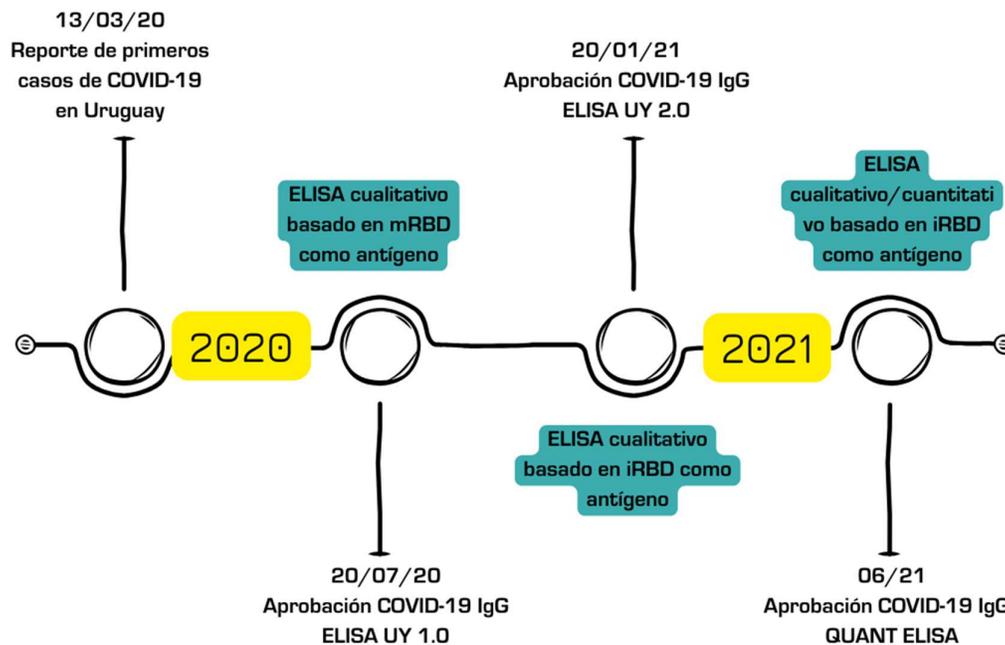


Figura 18. Esquema temporal de la aprobación de diferentes versiones de un ensayo serológico de tipo ELISA para la determinación de anticuerpos IgG específicos contra el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 en muestras de suero/plasma humano. Se indica el nombre comercial del ensayo, la fecha de aprobación por parte del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) del MSP y sus principales características.

En una primera instancia se trabajó en la conformación de una seroteca de muestras a ser empleadas para la puesta a punto y validación del ensayo. Se utilizaron como control, para determinar la reactividad basal del ensayo, muestras de suero obtenidas en el año 2018, previo a la circulación del virus SARS-CoV-2 en Uruguay. Estas muestras se componían de sueros de descarte provistos por el Servicio Nacional de Sangre (SNS), correspondientes a individuos de entre 18 y 65 años que cumplían con los requisitos iniciales para ser donantes de sangre. Por otra parte, se obtuvieron muestras de suero de donantes voluntarios que habían cursado COVID-19 con diagnóstico confirmado de la infección mediante PCR, con más de 15 días desde el diagnóstico o comienzo de síntomas, para constituir la seroteca de muestras de pacientes infectados a analizar mediante el ensayo. La población se compuso de individuos mayores de 18 años en fase de convalecencia de la enfermedad que habían presentado variedad de manifestaciones clínicas. Es de destacar que no se incluyeron para la puesta a punto del ensayo muestras de pacientes que estuvieran cursando la infección, ya sea en domicilio o internados. Las muestras se obtuvieron de donantes que concurrieron al Instituto de Higiene en abril del 2020 de manera voluntaria para contribuir específicamente con este proyecto. Esta seroteca de sueros positivos se amplió posteriormente con muestras de donantes de plasma convaleciente de COVID-19 que concurrieron a servicios nacionales de donación de sangre en el correr de los años 2020 y 2021. A partir de una colaboración también se utilizó el ensayo para analizar muestras de pacientes internados con COVID-19³⁸⁶ (Anexo I-8.1).

Inicialmente, se utilizó como antígeno el RBD producido en células de mamífero HEK293T (mRBD) a partir de la construcción pCAGGS-RBD-6His (BEI, NR-52309) provista por el grupo de Florian Krammer^{371,387}. Se ensayaron en simultáneo diversas condiciones de sensibilización e incubación de las muestras para generar un ensayo de ELISA de tipo indirecto en una versión “*in house*”, y empleando reactivos comerciales provistos por la compañía ATGen. Con respecto a la sensibilización se emplearon una solución de buffer carbonato y una solución de PBS para diluir el antígeno, no encontrándose diferencias notables entre ambos, por lo que se continuó trabajando con PBS. Se realizó una curva de sensibilización utilizando cantidades crecientes de la proteína mRBD (1 a 4 µg/ml). A la concentración de 1 µg/ml ya se detectaba señal en los sueros positivos, y tanto empleando nuestros reactivos como las soluciones comerciales, parecía haber una saturación a partir de los 2.5 µg/ml (Figura 19-A). Para optimizar el uso de antígeno se estableció en 1 µg/ml la concentración de mRBD a

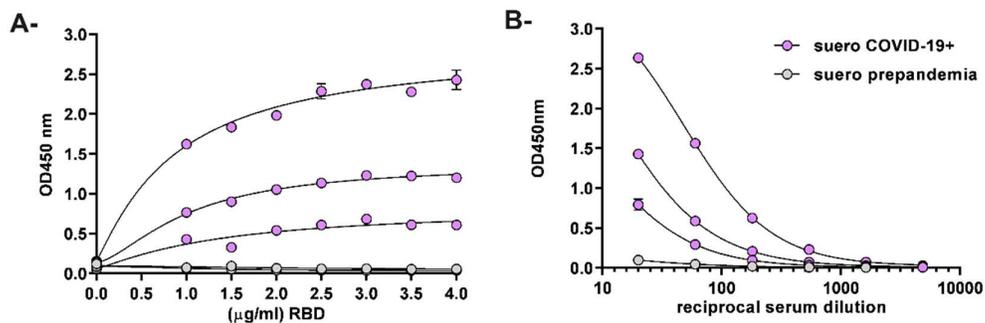


Figura 19. Puesta a punto de un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero humanas. **A-** Se sensibilizaron placas de ELISA con cantidades crecientes del antígeno mRBD y se determinó en cada condición el valor de absorbancia obtenido para una dilución 1:50 de tres sueros de individuos con diagnóstico previo de COVID-19 y de sueros control. **B-** Empleando una concentración de mRBD de 1 µg/ml en la sensibilización se ensayaron diluciones seriadas de sueros positivos y negativos para determinar la dilución de muestra a ser utilizada.

emplear en la sensibilización. Se testearon tres diluyentes de muestra comerciales diferentes (provistos por la compañía ATGen), seleccionándose aquel que mostró mejor performance. La solución de dilución de los sueros de PBS-BSA-suero normal de cabra (SNC) fue la que mostró un mejor comportamiento, al disminuir la señal de base de los sueros negativos. Con respecto a la dilución de suero, se estableció inicialmente en 1/50 (Figura 19-B). Con el pasaje a formato kit se demostró que una dilución 1/10 permitía una mejor separación de los sueros positivos sin aumentar la señal de los sueros negativos. Los sueros se analizaron con inactivación previa a 56 °C por una hora y sin inactivar, sin encontrarse diferencias destacables.

Como resultado de este trabajo inicial, se obtuvo un protocolo de ELISA indirecto versión “in house” que permitía discriminar los sueros de pacientes que cursaron COVID-19 y presentaban anticuerpos de tipo IgG específicos contra el RBD de SARS-CoV-2, de aquellos sueros negativos para la presencia de anticuerpos contra el virus obtenidos previo al inicio de la pandemia, el cual se esquematiza en la Figura 20. Además, a partir de este protocolo y el trabajo de puesta a punto y validación realizado, la compañía ATGen adaptó este ensayo una versión de kit comercial³⁸⁸. El 20 de julio de 2020 el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) del MSP validó este primer ensayo serológico llamado de COVID-19 IgG ELISA UY para su utilización en muestras de suero o plasma obtenidas a partir de 14 días desde el comienzo de síntomas. En el análisis realizado por ellos encontraron una sensibilidad del 97,56% (IC 95%: 87,40%-99,57%) y una especificidad del 90,91% (IC95%: 72.18%-99,57%) (Anexo II-9.1).

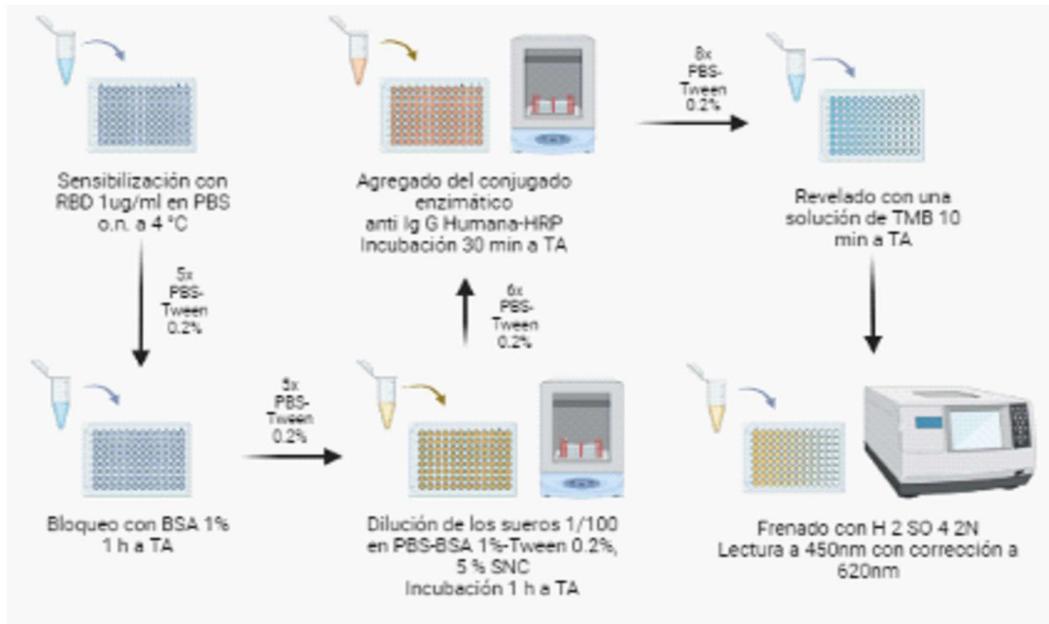


Figura 20. Esquema de la versión “in house” del ensayo de ELISA indirecto desarrollado para la detección de anticuerpos IgG específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero humanas. Se esquematiza el protocolo del ELISA para IgG anti-SARS-CoV-2 desarrollado en formato “in house”, el cual se detalla en la sección de Metodología.

Luego de este primer hito, el grupo comenzó a trabajar en la producción del antígeno RBD de manera recombinante en células S2 de *Drosophila Megaloganster* (iRBD). Esto facilitó la producción ya que la proteína se obtenía funcional y con altos rendimientos³⁸⁹ (Anexo I-8.2), manteniendo su reactividad contra sueros positivos ensayados mediante ELISA, así como su capacidad de unirse al receptor celular ACE2 expresado en la superficie de células HEK293T, como fue evidenciado mediante citometría de flujo³⁸⁹. En esta etapa se trabajó de manera directa en el formato de kit comercial, introduciendo como única modificación un aumento a 2 µg/ml de la concentración de antígeno empleada en la sensibilización. En enero de 2021 el DLSP del MSP evaluó este segundo kit, llamado COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, indicando que el mismo cumplía con los requisitos de especificidad y de sensibilidad para muestras obtenidas con posterioridad a los 8 días de iniciados los síntomas (Anexo II-9.2).

Para profundizar en la caracterización de estos ensayos, se analizaron 90 sueros control pre pandémicos y 90 sueros de individuos con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 confirmado mediante PCR, en etapa convaleciente, empleando los kits desarrollados a nivel nacional con mRBD e iRBD como antígenos (COVID-19 IgG ELISA UY y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, respectivamente). Estos mismos sueros se analizaron utilizando los ensayos comerciales: Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) que

emplea como antígeno la subunidad S1 de la proteína S (Euroimmun, Lübeck, Alemania), Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA antígeno N (DRG International, Inc., Springfield, NJ, USA) y SARS-CoV-2 Antibody Test Strip que utiliza una proteína recombinante no especificada del SARS-CoV-2, marcada con oro coloidal, para la detección de anticuerpos IgG e IgM (Sinocare, Changsha, China), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Esto permitió comparar el comportamiento de los ensayos desarrollados en nuestro país con otros ensayos serológicos empleados a nivel internacional, dos de ellos también pruebas de tipo ELISA, pero que emplean otros antígenos virales, y una prueba de tipo LFIA (*lateral flow immunoassay*).

Tabla 2. Análisis comparativo de 90 sueros control pre pandémicos (COVID-19 -) y 90 sueros de individuos con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 (COVID-19 +) empleando los ensayos COVID-19 IgG ELISA UY y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y ensayos serológicos comerciales.

	Resultado ensayo	COVID-19 + (N)	COVID-19 - (N)
Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA (DRG)	Positivo	50	4
	Negativo	30	84
	Indeterminado	10	2
Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun)	Positivo	58	0
	Negativo	26	90
	Indeterminado	6	0
COVID-19 IgG ELISA UY (mRBD)	Positivo	75	1
	Negativo	15	89
	Indeterminado	0	0
COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (iRBD)*	Positivo	75	0
	Negativo	13	90
	Indeterminado	2	0
SARS-CoV-2 Antibody Test Strip (Sinocare)	Positivo	39	0
	Negativo	48	90
	Indeterminado	0	0

*Evaluación preliminar de 90 sueros

Con respecto a los ensayos de ELISA, el Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA (DRG) identificó 4 muestras pre pandémicas como positivas (4/90) y 2 como indeterminadas (2/90), el COVID-19 IgG ELISA UY (mRBD) identificó una muestra control como positiva (1/90), mientras que los ensayos Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun) y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (iRBD) no identificaron ninguna como

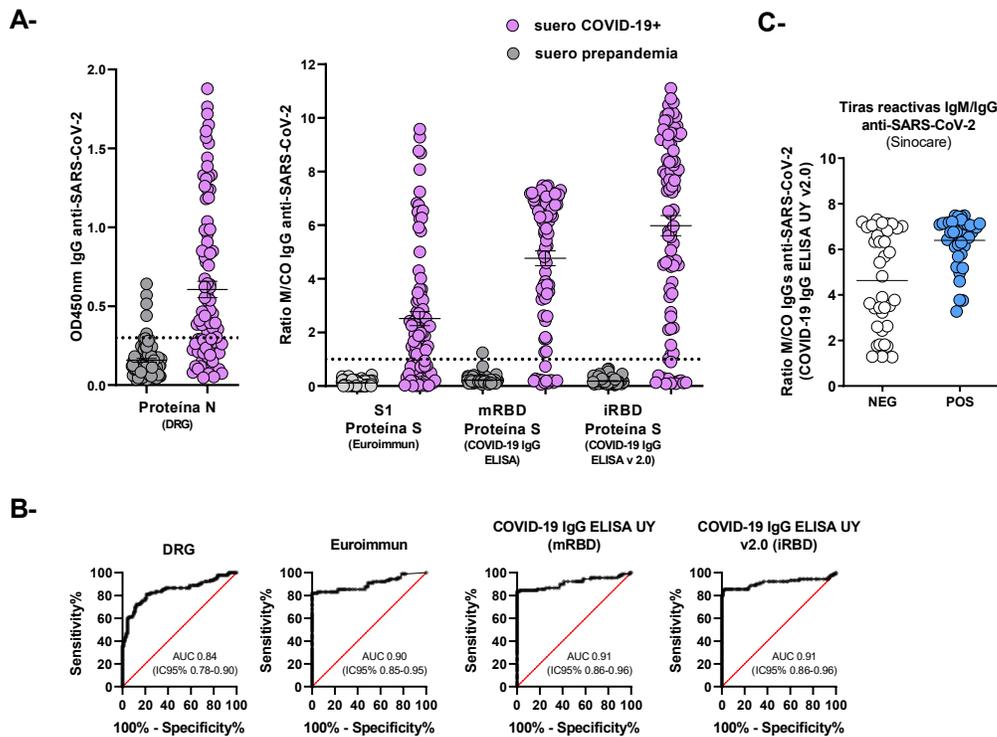


Figura 21. Comparación de los ensayos de ELISA para SARS-CoV-2 desarrollados en el país con ensayos serológicos comerciales. **A-** Se analizaron los mismos 90 sueros control (obtenidos en el año 2018 previo al inicio de la pandemia) y 90 sueros de pacientes con diagnóstico confirmado por PCR de SARS-CoV-2 en fase de convalecencia empleando los ensayos: Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA antígeno N (DRG), Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun), COVID-19 IgG ELISA UY y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, de acuerdo con los protocolos descritos por el fabricante. En línea punteada se indica el punto de corte para cada ensayo. **B-** A partir de los resultados de A- se realizó un análisis ROC (*receiver operating characteristic*) para cada uno de los ensayos. **C-** Se analizaron 77 sueros COVID-19 empleando tiras reactivas (SARS-CoV-2 Antibody Test Strip, Sinocare) para detección de anticuerpos IgM/IgG específicos contra SARS-CoV-2. El resultado con este ensayo se graficó en función del ratio M/CO (muestra/cutoff) de la muestra obtenido empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0.

positiva (0/90) (Tabla 2, Figura 21-A). En cuanto a los sueros de individuos con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2, el ELISA con mRBD identificó como positivas 75 muestras (75/90) y el ELISA con iRBD identificó las mismas 75 muestras como positivas (75/90) y 2 como indeterminadas (2/90). Cuando comparamos con los ensayos comerciales, el ELISA de Euroimmun reconoció como positivos 58 de estos sueros (58/90) y 6 como indeterminados (6/90), y el de DRG identificó solo 50 muestras como positivas (50/90) y 10 como indeterminadas (10/90) (Tabla 2). En total un 14% de las muestras con PCR positiva para SARS-CoV-2 resultaron negativas por todos los ensayos serológicos empleados. Todos los sueros COVID-19+ identificados como positivos mediante el ELISA de Euroimmun son también positivos con nuestros ensayos. Llamativamente, uno de los sueros COVID-19+ estudiados es positivo por el ensayo de DRG, que emplea proteína N, y negativo para los ensayos que utilizan S1 o RBD. De

las mismas muestras 77 se analizaron empleando tiras reactivas (SARS-CoV-2 Antibody Test Strip, Sinocare) para detección de anticuerpos IgM/IgG específicos contra SARS-CoV-2. Mediante el empleo de este ensayo todas las muestras prepandemia fueron negativas, y las tiras detectaron como positivas 40 de las 77 muestras COVID-19 analizadas (Tabla 2, Figura 21). Si bien las muestras reactivas en las tiras presentaron en el ensayo de ELISA COVID-19 IgG UY 2.0 un ratio muestra/cut off (M/CO) alto, otras muestras con un ratio similar resultaron negativas (Figura 21-C).

A partir de estos datos, se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los cinco ensayos. Las muestras que resultaron como indeterminadas se consideraron negativas para este análisis. Los resultados se muestran en la Tabla 3. A partir de este análisis, cuando se consideró la totalidad de los sueros con diagnóstico positivo de COVID-19, ambos ensayos nacionales COVID-19 IgG ELISA UY (mRBD) y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (iRBD) presentaron una sensibilidad de 83.3% (IC 95% 74.0%-90.4%), y una especificidad del 98.9% (IC 95% 93.7%-100.0%) y el 100% (IC 95% 95.9%-100.0%) para uno y otro, respectivamente. En lo que refiere a la sensibilidad, esta fue mayor que la encontrada para los ensayos comerciales, mientras que la especificidad fue similar a la del ELISA de Euroimmun. Es importante destacar que la especificidad de un ensayo de este tipo es particularmente relevante en escenarios de baja prevalencia, ya que afecta el VPP y limita por tanto su aplicación diagnóstica. Cuando se consideran solamente las muestras con diagnóstico previo de COVID-19 que además se identificaron como positivas para la presencia de anticuerpos IgG específicos, tomando como ensayo de referencia el ELISA de Euroimmun, la sensibilidad de los ensayos desarrollados en el país asciende al 100%. Esto es importante teniendo en cuenta de que se conoce que no todos los individuos que cursaron la enfermedad desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable.

Tabla 3. Parámetros descriptivos de las propiedades diagnósticas para los ensayos serológicos empleados.

	Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA (DRG)	Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun)	COVID-19 IgG ELISA UY (mRBD)	COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (iRBD)	SARS-CoV-2 Antibody Test Strip (Sinocare)
Sensibilidad	55.6% (IC 95% 44.7%-66.0%)	64.4% (IC95% 53.7%-74.3%)	83.3% (IC 95% 74.0%-90.4%)	83.3% (IC 95% 74.0%-90.4%)	44.8% (IC 95% 34.1%-55.9%)
Especificidad	95.6% (IC 95% 89.0%-98.8%)	100.0% (IC 95% 95.9%-100.0%)	98.9% (IC 95% 93.7%-100.0%)	100.0% (IC 95% 95.9%-100.0%)	100.0% (IC 95% 96.0%-100.0%)

VPP*	39.7% (IC 95% 19.9%-63.6%)	100.0%	79.8% (IC 95% 35.9%-96.5%)	100.0%	100.0%
VPN*	97.6% (IC 95% 97.0%-98.1%)	98.2% (IC 95% 97.6%-98.6%)	99.1% (IC 95%98.6%- 99.4%)	99.1% (IC 95% 98.6%-99.4%)	97.2% (IC 95% 99.6%-97.6%)
Precisión*	93.6% (IC 95% 88.9%-96.7%)	98.2% (IC 95% 95.0%-99.6%)	98.1% (IC 95% 94.9%-99.6%)	99.2% (IC 95% 96.5%-99.9%)	97.2% (IC 95% 93.6%-99.1%)
Índice de Youden (J)	0.51	0.64	0.82	0.83	-

*Estos valores están calculados para una prevalencia de COVID-19 del 5%

También se realizaron análisis ROC (*receiver operating characteristic*) para cada uno de los ensayos de ELISA a partir de los resultados obtenidos empleando los mismos grupos de sueros, y se calcularon el área bajo la curva (AUC) y el índice de Youden (J) como indicadores de la capacidad diagnóstica de los ensayos (Figura 21-B). A partir de estas curvas podemos observar que los ensayos nacionales presentan una capacidad muy similar al ensayo de Euroimmun de discriminar sueros negativos y positivos para la presencia de anticuerpos.

La evaluación del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 se complementó con el análisis de 360 muestras de individuos con diagnóstico confirmado mediante PCR de infección previa por SARS-CoV-2 obtenidas al menos 15 días luego del diagnóstico o del comienzo de los síntomas, y 303 muestras de sueros pre pandémicos (Figura 22-A). En este grupo se encontró que el ensayo detecta la presencia de anticuerpos en un 88.9% de las muestras con diagnóstico previo de infección, mientras que dos sueros pre pandémicos (2/303) fueron identificados como positivos. A partir de estos datos se realizó un análisis ROC, en el que el área bajo la curva fue de 0.95 (IC95% 0.93-0.97) y el índice de Youden fue de 0,88, siendo el punto de corte que maximiza al mismo tiempo la sensibilidad y especificidad del ensayo es un ratio M/CO >0.8 (Figura 22-B). El índice de Youden es un buen indicador del rendimiento de una prueba diagnóstica pudiendo ir de -1 a 1, siendo 1 indicador de una prueba perfecta sin falsos negativos ni falsos positivos. A partir del análisis de estas muestras, tomando como punto de corte el especificado en el kit y considerando las muestras indeterminadas como negativas, la sensibilidad del ensayo sería de 88.6% (IC 95% 84.8%-91.7%) y la especificidad 99.3%

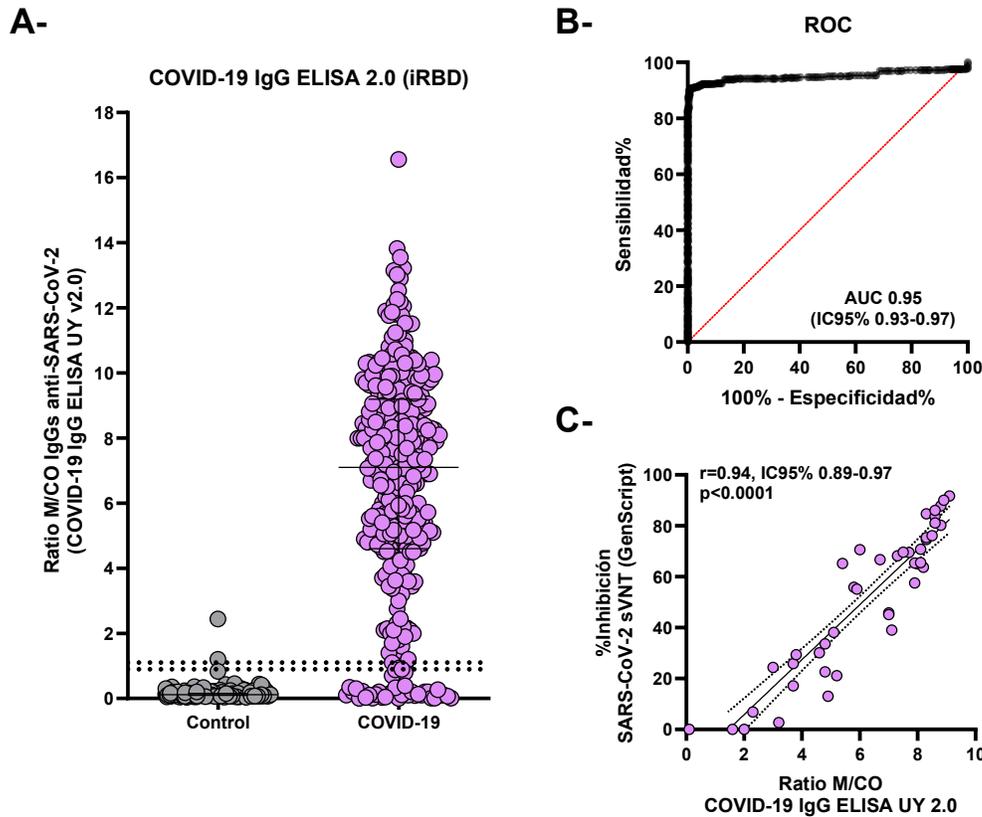


Figura 22. Caracterización del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0. **A-** Se analizaron 303 sueros control (obtenidos en el año 2018 previo al inicio de la pandemia) y 360 sueros de pacientes con diagnóstico confirmado por PCR de SARS-CoV-2 en fase de convalecencia empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, de acuerdo con los protocolos descritos por el fabricante. En línea punteada se indican los ratios M/CO de 0,9 y 1,1 punto de corte negativo y positivo del ensayo, respectivamente. **B-** A partir de los resultados de A- se realizó un análisis ROC. **C-** Se analizaron 45 sueros COVID-19 seleccionados aleatoriamente empleando el ensayo SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (sVNT) (GenScript) y se calculó la correlación entre el % de inhibición y el ratio M/CO obtenido en el ensayo de ELISA.

(IC 95% 97.6%-99.9%), encontrándose los VPP y VPN para una prevalencia del 5% y el 85% indicados en la Tabla 4. Es de destacar que en este caso se incluyeron todas las muestras de individuos que habían cursado COVID-19 con diagnóstico confirmado por PCR. A su vez, se compararon los resultados de ratio M/CO obtenidos mediante este ensayo con la capacidad de inhibir la unión RBD-ACE2 en 45 sueros, determinada mediante el ensayo *SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (sVNT)* de GenScript y expresado en porcentaje de inhibición, encontrando una correlación de Spearman $r=0.94$ (IC95% 0.89-0.97) estadísticamente significativa ($p<0.0001$) (Figura 22-C).

Tabla 4. Indicadores de capacidad diagnóstica del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0

	COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (iRBD)
Sensibilidad	88.6% (IC 95% 84.8%-91.7%)
Especificidad	99.3% (IC 95% 97.6%-99.9%)
VPP 5	87.6% (IC 95% 64.0%-96.6%)
VPN 5	99.4% (IC 95% 99.2%-99.5%)
VPP 85	99.9% (IC 95% 99.5%-100.0%)
VPN 85	60.6% (IC 95% 53.5%-67.2%)

Una de las principales limitantes de los ensayos mencionados anteriormente es que permiten un diagnóstico cualitativo de la presencia o no de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en una muestra, pero no permiten determinar la cantidad de anticuerpos que se encuentran en la misma. Esto no representaría un problema si se pretenden realizar, por ejemplo, ensayos de seroprevalencia, pero implica una limitante para su aplicación en otros escenarios. En particular, la necesidad de identificar donantes que se recuperaron de la enfermedad COVID-19 y que poseyeran un alto título circulante de anticuerpos para su utilización terapéutica, nos motivó a adaptar este ensayo para permitir un análisis semi-cuantitativo/cuantitativo de los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD presentes en muestras de suero.

Para la adaptación a una versión semicuantitativa se evaluó el nivel de correlación entre los resultados de ratio M/CO del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 para tres diluciones diferentes de las muestras de suero: 1:10 (la establecida en la versión cualitativa), 1:50 y 1:100. Además, nos interesó su correlación con los resultados obtenidos con otros ensayos serológicos comerciales, ya sea que fueran semicuantitativos o que se hubiera establecido que el resultado que arrojaban tenía una relación con los niveles de anticuerpos presentes en la muestra. Inicialmente comparamos nuestros resultados con los obtenidos empleando el ensayo Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Alemania), utilizándolo para titular los sueros mediante dilución límite, y también empleando el ensayo COVIDAR IgG (CONICET, Argentina), utilizando las muestras a una dilución 1:200 en este caso. Posteriormente, pudimos evaluar nuestras muestras empleando el ensayo Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania), que arroja resultados expresados en unidades relativas (RU)/ml, constituyendo uno de los primeros ensayos de ELISA cuantitativo para anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en salir al mercado. Como se puede observar en la Figura 23 el ratio M/CO obtenido con nuestro ensayo muestra una muy buena correlación con

los resultados obtenidos empleando los otros ELISA comerciales cuando las muestras

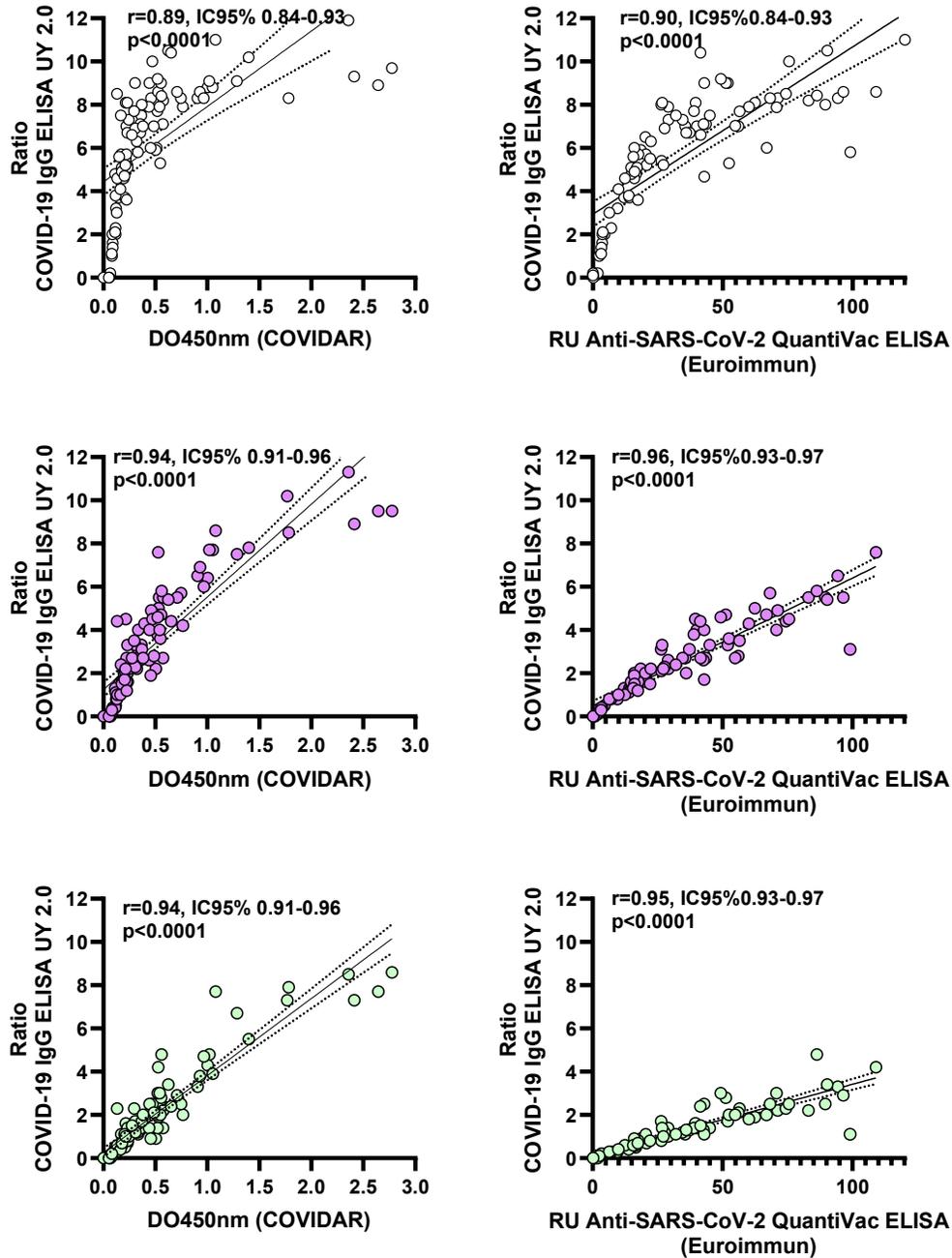


Figura 23. Análisis de la correlación entre los resultados obtenidos para tres diluciones de suero empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y otros dos ensayos comerciales. En el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 se emplearon los sueros a una dilución 1:10 (panel superior, círculos blancos), 1:50 (panel medio, círculos violetas) y 1:100 (panel inferior, círculos verdes), y se comparó con el resultado obtenido empleando el ensayo COVIDAR IgG (CONICET, Argentina) a una dilución 1:200 de la muestra (izquierda) y utilizando el ensayo Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (Euroimmun) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos se calculó el índice de correlación de Spearman (r) con un intervalo de confianza del 95%.

son analizadas en las tres diluciones, sin embargo, con la dilución 1:100 es con la que se observa una mejor correlación lineal ($r^2=0.86$ con los resultados del COVIDAR y

$r^2=0.81$ con los resultados empleando Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA). Como se verá más adelante, esto fue particularmente útil para realizar el tamizaje de sueros de candidatos a donantes de plasma convaleciente de COVID-19 con alto título de anticuerpos. Además, nos permitió establecer que la dilución 1:100 de los sueros permitía aumentar el rango de linealidad entre la DO450nm de la muestra en el ensayo de ELISA y su nivel de anticuerpos, lo que sirvió de insumo para la adaptación del ensayo a una versión cuantitativa.

En una última instancia, se adaptó el ensayo a una versión cuantitativa. Para esto se generó una curva de calibración secundaria a partir del estándar internacional de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 (*First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)*, NIBSC code: 20/136), que permite expresar los resultados obtenidos en BAU/ml. Para una dilución 1:100 de las muestras, se obtiene una correlación lineal entre la OD450nm en el ensayo de ELISA y la concentración en BAU/ml, para el rango comprendido entre 10 y 400 BAU/ml del estándar internacional (Figura 24-A). Luego de generar el estándar secundario se evaluó nuevamente el estándar internacional, observando que hay una excelente concordancia con los resultados obtenidos con ambos. También se analizó un panel de muestras de referencia (*First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin*, NIBSC code: 20/268) empleando el ensayo, obteniendo resultados que concuerdan con lo establecido para las muestras analizadas, y lo encontrado por diversos grupos de investigación que analizaron este panel mediante diversas técnicas. La muestra negativa 20/142 también resultó negativa en el ensayo, la muestra 20/140 catalogada como con un nivel bajo de anticuerpos anti-S se cuantificó en 24.5 BAU/ml, la 20/148 catalogada como media arrojó 207.5 BAU/ml, y la 20/150 catalogada como alta dio 573,1 BAU/ml, empleando nuestro ensayo (Tabla 5).

Esta tercera versión del ensayo llamada de COVID-19 IgG QUANT ELISA permitió la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos específicos de tipo IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero y plasma. El kit fue evaluado por el DLSP en junio de 2021, obteniéndose una sensibilidad del 96,97% (IC 95%: 84,68%-99,46%) para muestras obtenidas 8-14 días luego del comienzo de síntomas y 100% (IC 95%: 87,13%-100%) para muestras obtenidas a partir de los 14 días desde el comienzo de síntomas (Anexo II-9.3).

Tabla 5. Resultados obtenidos para el *WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin* (NIBSC code: 20/268) empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA.

	anti-RBD IgG (BAU/ml)	
	Referencia	COVID-19 IgG QUANT ELISA
Low 20/140	45	24,5
Negative 20/142		2
low S, high N 20/144	66	43,5
Mid 20/148	205	190,5
High 20/150	817	510

Esta versión cuantitativa se utilizó para determinar los niveles de anticuerpos inducidos en respuesta a la infección con SARS-CoV-2 así como los generados por las vacunas contra COVID-19 empleadas en nuestro país en diferentes poblaciones, como se abordará más adelante (Figura 24-B). Todas las muestras prepandemia analizadas se

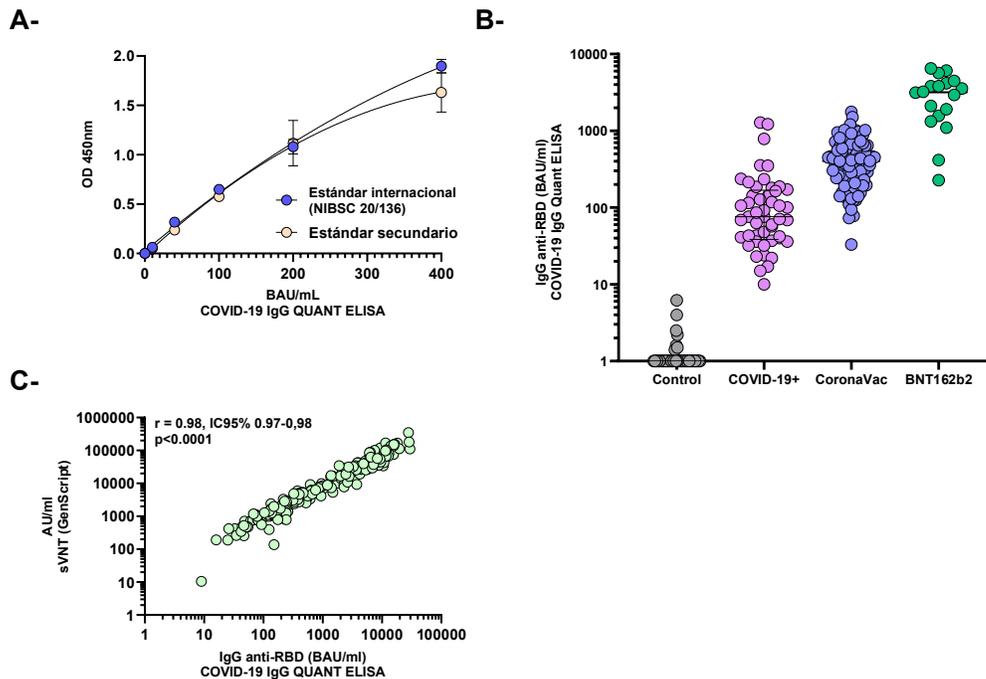


Figura 24. Adaptación del ensayo de ELISA a una versión cuantitativa. **A-** A partir del estándar internacional *First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)* (NIBSC code: 20/136) se generó un estándar secundario en el rango comprendido de 10 a 400 BAU/ml, ambos estándares se corrieron en paralelo para verificar su concordancia empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA. **B-** El ensayo de ELISA en su versión cuantitativa fue empleado para determinar los niveles de anticuerpos anti-RBD presentes en muestras de pacientes con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2, vacunados con CoronaVac o con BNT162b2 y en muestras control obtenidas previo al comienzo de la pandemia **C-** Se analizó la correlación entre los niveles de anticuerpo IgG anti-RBD encontrados empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA expresados en BAU/ml y la capacidad de los sueros de inhibir la interacción entre RBD y ACE2 determinada empleando el sVNT (GenScript) en su versión cuantitativa. Se calculó el índice de correlación de Spearman (r).

ubicaron por debajo de las 10 BAU/ml por lo que este fue establecido como punto de

corte para el ensayo cuantitativo. Como se puede observar en la Figura 24-C se estableció, además, una correlación entre los resultados obtenidos empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA expresados en BAU/ml con la capacidad de inhibir la unión RBD-ACE2 encontrado utilizando un ensayo sVnt (*cPass Neutralization Antibody Detection kit*, GenScript) en su versión semi cuantitativa, resultados expresados en unidades arbitrarias (AU)/ml, permitiendo establecer una relación entre los niveles de IgG específicos anti-RBD presentes en el suero con la capacidad neutralizante del mismo.

3.1.2 Estudios de seroprevalencia: aplicación de los ensayos COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y COVID-19 IgG QUANT ELISA en territorio

Estos ensayos también se emplearon para realizar estudios de seroprevalencia en la población uruguaya, algunos de los cuales se identifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Estudios de seroprevalencia realizados en Uruguay empleando los ensayos de ELISA desarrollados en el país.

Población objetivo	Título	Responsables	N
Personal de la salud. Rivera.	“Estudio de seroprevalencia contra el SARS-CoV-2 en personal de salud de Rivera”	UdelaR, IP Montevideo e ITRN, UTEC	1204
Población general. Rivera.	“Estudio de seroprevalencia poblacional sobre COVID-19 y evaluación del impacto sociosanitario de las medidas de emergencia sanitaria”	MSP, UdelaR, IP Montevideo e ITRN, UTEC	401
Población general. Población asociada a brotes. Salto.	“Detección y estimación de prevalencia de asintomáticos y sintomáticos no reportados por SARS-Cov-2 en la ciudad de Salto”	CENUR Salto	403
Personal de la salud. Uruguay.	“Estudio de seroprevalencia de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en personal de salud. Uruguay 2021.”	MSP, UdelaR, IP Montevideo	17630
Personal del IP Montevideo	“Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal de Institut Pasteur de Montevideo”	IP Montevideo	177

En el trabajo “Estudio de seroprevalencia contra el SARS-CoV-2 en personal de salud de Rivera” contribuimos en el análisis de 1204 muestras de sangre obtenidas en el mes de febrero de 2021 correspondientes al personal de tres de los principales prestadores de salud de la ciudad de Rivera (ASSE, Casmer y Comeri), utilizando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0. La seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 fue de 8,3% (100 positivos en 1204 muestras analizadas) (Figura 25-A). De los individuos con diagnóstico previo de COVID-19 mediante hisopado y estudio por PCR, el ensayo identificó la presencia de anticuerpos en el 94,2% (49/52). De estos, todos los que cursaron la enfermedad de manera sintomática fueron positivos (43/43), mientras que dentro de los asintomáticos un tercio resultaron negativos para la presencia de

anticuerpos (3/9). Dentro de las muestras seropositivas sin diagnóstico previo de infección, dos habían presentado síntomas compatibles con COVID-19 aunque no se les realizó hisopado. Cuando se compararon los niveles de anticuerpos presentes en las muestras de aquellos con infección previa confirmada por SARS-CoV-2 mediante PCR y los que no tenían diagnóstico previo de infección mediante hisopado, no se encontraron diferencias significativas. Como seguimiento de esta población, se realizó un estudio postvacunal en el cual se analizaron 394 muestras provenientes de personal de la salud de la ciudad de Rivera extraídas entre octubre y noviembre del año 2021, encontrándose que el 99.5% (392/394) de las mismas eran positivas para la presencia de anticuerpos (Figura 25-B). Cuando se compararon los niveles de anticuerpos encontrados en las muestras positivas de febrero de 2021 con los de las muestras positivas de noviembre de 2021, analizados mediante el empleo del kit COVID-19 IgG Quant ELISA en su versión cuantitativa, se observó un incremento significativo, lo cual es compatible con la literatura, en la cual se ha observado que los niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación serían más altos que los alcanzados en respuesta a la

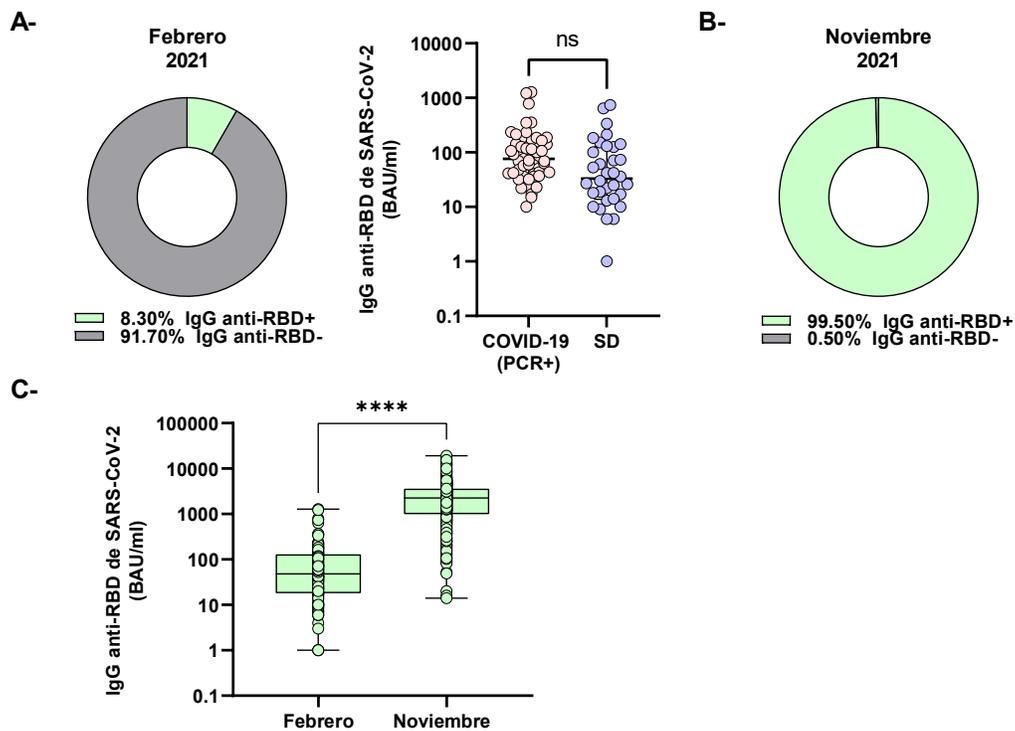


Figura 25. Estudio de seroprevalencia de SARS-CoV-2 en el personal de la salud de la ciudad de Rivera. A- Se calculó la prevalencia de resultados positivos para la presencia de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 (IgG anti-RBD+) en el personal de la salud de la ciudad de Rivera en febrero de 2021 y se compararon los niveles de anticuerpos presentes en las muestras con diagnóstico previo de infección (COVID-19 PCR+) con las que no tenían diagnóstico (SD) sin encontrarse diferencias significativas. B- Se repitió el mismo análisis en noviembre de 2021, 8 meses luego del inicio de la campaña de vacunación. C- Se compararon los niveles de anticuerpos presentes en las muestras positivas de febrero con las de noviembre. ns, no significativo, ****p<0,001 Mann-Whitney test,

infección, media de 48 BAU/ml (IQR 18-130) vs. 2242 BAU/ml (IQR 990-3602) en noviembre, $p < 0.0001$ Mann-Whitney test (Figura 25-C).

También colaboramos con un estudio de seroprevalencia a nivel de la población general en Rivera realizado a partir de 401 muestras obtenidas en marzo-abril de 2021 previo a la vacunación. Al ser una muestra probabilística diseñada por el INE, esto permitió expandir los resultados a toda la población mayor de 18 años. Un 6,8% de esa población resultó seropositiva para la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 al 04/03/2021 (7,3% en varones y 6,3% en mujeres), una seroprevalencia un poco menor a la encontrada en el personal de la salud de esta misma ciudad, lo cual era esperado dada la mayor exposición de estos últimos.

Por último, también utilizamos este ensayo para determinar la seroprevalencia de anticuerpos en el personal del IP Montevideo en marzo de 2021. Se encontró un 4,5% de muestras positivas (8/177), de las cuales 5 corresponden a individuos con diagnóstico previo por PCR de infección por SARS-CoV-2, una corresponde a un individuo que se había inmunizado con la primera dosis de CoronaVac hacía 15 días, y dos no tenían diagnóstico previo. En un seguimiento realizado luego de comenzada la vacunación y hasta noviembre del año 2022 se encontró que la seroprevalencia de anticuerpos en esta población se mantuvo cercana al 100%. Sobre este trabajo se profundizará más adelante.

3.1.3 Aplicación del ensayo para la conformación de un banco de plasma de pacientes convalecientes de COVID-19

Frente a la pandemia por SARS-CoV-2 y la falta de tratamientos específicos, una de las primeras ideas en surgir, en base a la experiencia de epidemias anteriores, fue la utilización terapéutica del plasma de individuos recuperados de la infección. Cuando se comprobó que este tratamiento era seguro y no generaba un agravamiento de la enfermedad por mecanismos como la amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, por *antibody-dependent enhancement*), se comenzó a extender su utilización a nivel mundial, lo que se continuó hasta etapas tardías de la epidemia, siendo una alternativa accesible para países de bajos recursos que no pueden afrontar los costos del uso de drogas y tratamientos más específicos. A pesar de la controversia que ya había en ese momento con respecto a la efectividad de este tratamiento, la gran mayoría de los lineamientos coincidían en que el plasma debía ser empleado en etapas tempranas y que se debían utilizar plasmas con alto título de anticuerpos específicos.

En este sentido, una nota de autorización de la FDA para la disponibilidad de plasma convaleciente COVID-19 con alto título de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, establecía una serie de ensayos serológicos que podían ser empleados para la determinación de los niveles de anticuerpos y a partir de qué valor se consideraban como aptos para su utilización. Por ejemplo, de acuerdo con la FDA se entendía como alto título un ratio M/C $\geq 3,5$ utilizando el Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun), que fue luego sustituido por un resultado >55 RU/ml empleando el ensayo Anti-SARS-CoV-2 S1 Curve ELISA (IgG) de la misma compañía, y un porcentaje de inhibición $\geq 80\%$ utilizando el cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (GenScript), entre otros. Por otra parte, la experiencia argentina indicaba que los plasmas a ser empleados y que podían ser considerados como de alto título, eran aquellos con un título mayor a 1:1000 empleando el ensayo de ELISA COVIDAR (IgG) desarrollado en este país³⁹⁰. A partir del estudio exhaustivo de más de 1000 muestras, en Argentina encontraron que una DO mayor a 1 (lectura a 450 nm) utilizando el COVIDAR a una dilución 1:200 de los sueros, era una buena manera de encontrar donantes de alto título a la vez que se ahorraba tiempo y recursos. En este sentido, a partir de los resultados generados con el ensayo semicuantitativo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y su comparación con los ensayos Anti-SARS-CoV-2 S1 Curve ELISA (IgG) (Euroimmun) y COVIDAR (IgG), analizamos la equivalencia entre el resultado del ratio M/CO obtenido con nuestro ensayo empleando una dilución 1:100 de las muestras y el resultado obtenido con estos otros ELISA, con

el objetivo de poder realizar una selección inicial de las muestras. Este análisis mostró que una equivalencia a una DO_{450nm} mayor a 1 con el COVIDAR sería un ratio M/CO mayor o igual a 4 con nuestro ensayo, la equivalencia con un ratio $M/C \geq 3.5$ en el ensayo de Euroimmun cualitativo sería un ratio M/CO mayor o igual a 1,4, mientras que un resultado mayor a 55 RU/ml con el ensayo de Euroimmun cuantitativo equivalía a un ratio $M/CO \geq 1.9$ nuestro ELISA.

Teniendo en cuenta la distribución del ratio M/CO en una población de 100 sueros de personas convalecientes de COVID-19 y candidatos a donantes de plasma analizada en etapas iniciales de recolección, un ratio ≥ 1.4 discriminaba aproximadamente al 50% de las muestras, mientras que un ratio ≥ 4 separaba al 15% superior. En función de esto se seleccionó como criterio de tamizaje un ratio $M/CO \geq 2.8$ que separaba al 25% superior de los sueros analizados, de forma de conjugar la obtención de un número de muestras suficiente con el cumplimiento de los criterios de la FDA para poder ser considerados plasmas con alto título de anticuerpos.

En el período comprendido entre abril de 2020 y agosto de 2021 se analizaron los niveles de anticuerpos de tipo IgG específicos anti-SARS-CoV-2 en 3620 muestras de aspirantes a donantes de plasma convaleciente de COVID-19 para su uso terapéutico. Aproximadamente un 35% de las muestras de suero recolectadas cumplían con el criterio de presentar un ratio $M/CO \geq 2.8$ cuando eran analizadas a una dilución 1:100 empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (Figura 26-A). A quienes pasaban este tamizaje inicial se los convocaba para realizar efectivamente la donación de plasma, el que era analizado nuevamente para corroborar que efectivamente se mantenía por encima de aquel ratio antes de utilizarlos en pacientes. Así, se analizaron 691 muestras de plasma convaleciente de SARS-CoV-2 donado, cumpliendo con la definición de alto título un 76% de las muestras (Figura 26-A). Si bien existía información que relacionaba el título de anticuerpos IgG anti-RBD presentes en el suero con la capacidad neutralizante del mismo, nos pareció importante determinar qué capacidad de inhibir la unión RBD-ACE2 presentaban los sueros con un ratio $M/CO \geq 2,8$, mediante la utilización de un ensayo de neutralización viral sucedáneo sVNT (GenScript). Encontramos que todos los sueros analizados mostraban un porcentaje de inhibición

igual o superior al 80% en el ensayo sVNT, cumpliendo con la recomendación de la FDA para considerarlos de alto título utilizando dicho ensayo (Figura 26-B).

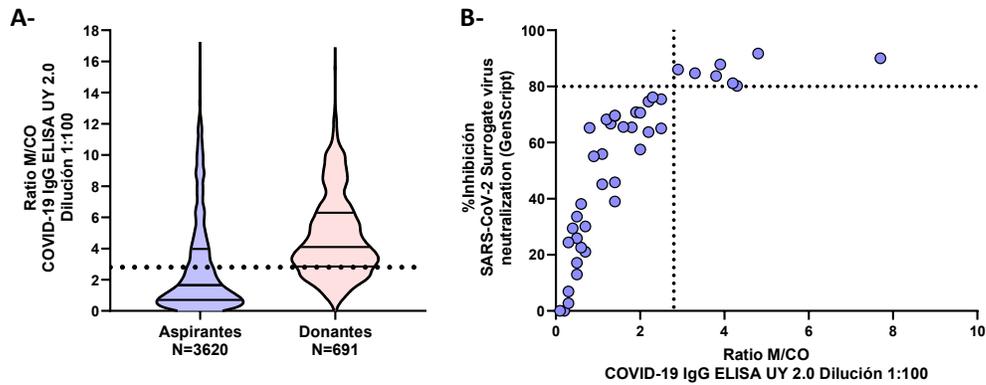


Figura 26. Banco de plasma convaleciente COVID-19. A- Distribución del ratio M/CO de las muestras de suero de aspirantes a donantes de plasma convaleciente COVID-19 y donantes efectivos analizadas a una dilución 1:100 empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0. **B-** Relación entre el ratio M/CO de la muestras analizadas a una dilución 1:100 y la capacidad de inhibir la interacción entre RBD y ACE2 expresado como %inhibición empleando el ensayo sVNT (GenScript). En línea punteada se indica el ratio M/CO de 2,8 utilizado como criterio para determinar la presencia de un alto título de anticuerpos en la muestra y el 80% de inhibición en el ensayo sVNT.

Además del título de anticuerpos y la capacidad neutralizante de los mismos, se ha demostrado que otras funciones efectoras que median los anticuerpos como la ADCC y la ADCP, pueden contribuir con el efecto terapéutico del plasma. En este contexto, se trabajó en la puesta a punto de un ensayo que permitiera medir la capacidad de los anticuerpos presentes en estos sueros de mediar ADCC. Se empleó el diseño experimental mostrado en la Figura 27-A, y se determinó el porcentaje de células NK (CD3-CD56+) positivas para el marcador de activación CD107+, cuando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) eran incubadas con sueros positivos para la presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 (determinado mediante ELISA) de donantes de plasma o sueros control. Se encontró que los sueros de donantes eran capaces de inducir la activación dependiente de anticuerpos de las células NK (Figura 27-C). Sin embargo, debido a la dificultad y variabilidad de este ensayo fue difícil extenderlo a un número mayor de muestras pensando en poder utilizarlo como un método más de tamizaje inicial.

Además de analizar las muestras de donantes de plasma, también tuvimos la oportunidad de evaluar la respuesta de anticuerpos que ocurría en algunos de los pacientes con COVID-19 receptores de este plasma, aunque no disponemos de datos

“Abordaje sistémico de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el SARS-CoV-2”

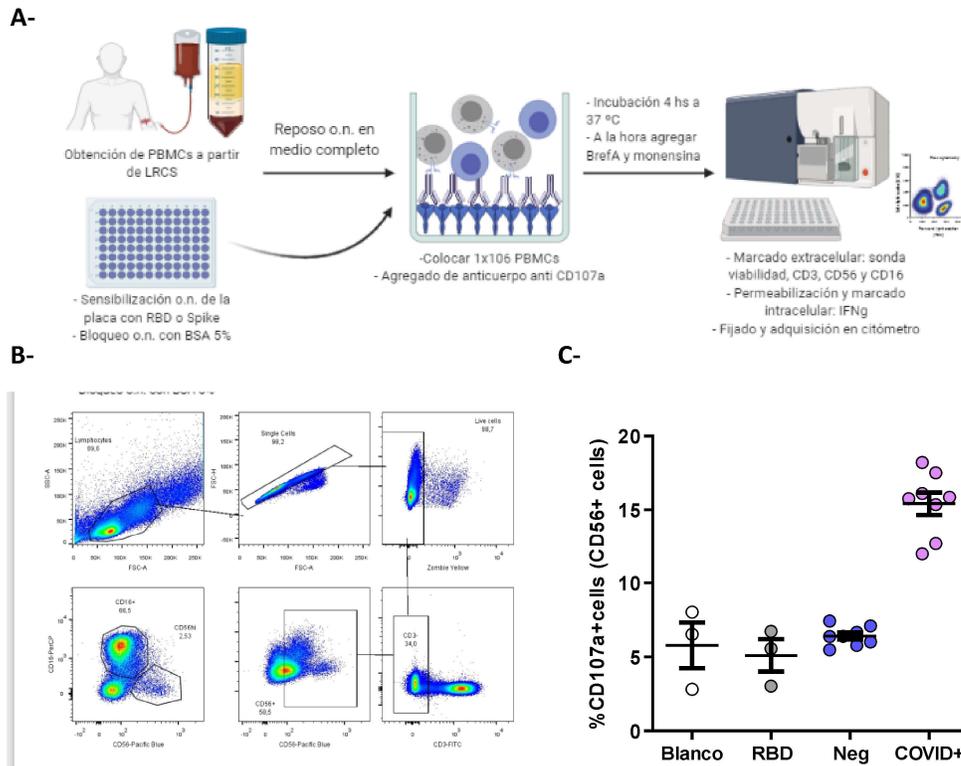
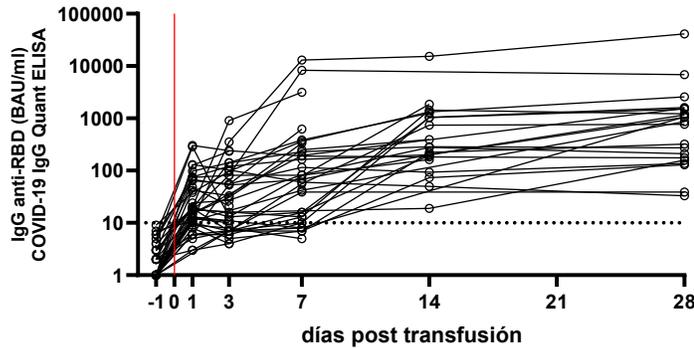


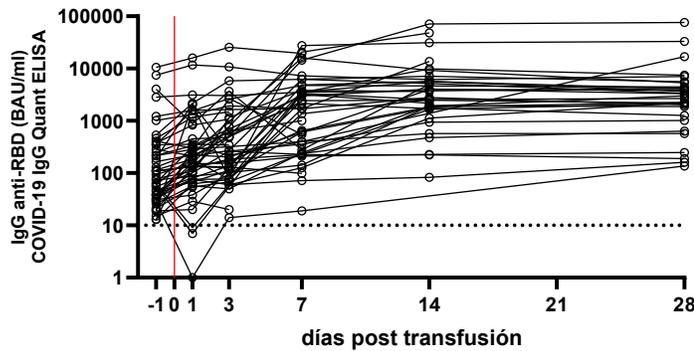
Figura 27. Evaluación de la capacidad de sueros positivos para la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD de mediar ADCC. **A-** Diseño experimental del ensayo de activación de células NK dependiente de anticuerpos. **B-** Estrategia de selección de células NK mediante citometría de flujo. Se seleccionaron las células en función de su morfología, se excluyeron dobletes y células muertas. Dentro de la población CD3- se seleccionaron las células CD56+ y se evaluó el porcentaje de células positivas para la expresión de CD107a. Para el análisis se utilizó el programa FlowJo LLC (BD) **C-** Se determinó el porcentaje de células CD107a+ dentro de la población de células CD56+ aplicando la estrategia de selección indicada en B- frente al empleo de sueros positivos para la presencia de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 (COVID+) y sueros control (Neg). Se utilizaron como control de la reactividad basal del ensayo pocillos sensibilizados donde no se colocó suero (RBD) y pocillos sin agregado de proteína (Blanco).

sobre la evolución clínica de los mismos. Se cuantificaron los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 empleando el ensayo en su versión cuantitativa. Se plantearon 5 extracciones de sangre, una previa a la transfusión de plasma, y a las 24h, 72h, 14 días, y 28 días luego de la misma. Se analizaron 93 pacientes, disponiéndose de una muestra previa a la transfusión en 89 de ellos. De estos, 40 no presentaban niveles detectables de anticuerpos al momento de la intervención terapéutica. Dentro de este grupo se dispone de una muestra 24h post-transfusión en 38 pacientes, de los cuales en 28 (74%) se cuantificó un nivel de anticuerpos mayor o igual a 10 BAU/ml (Figura 28-A y B). En etapas más tardías los niveles de anticuerpos aumentaron en la mayoría de los pacientes, probablemente debido al desarrollo de una respuesta inmune humoral propia

A-



B-



C-

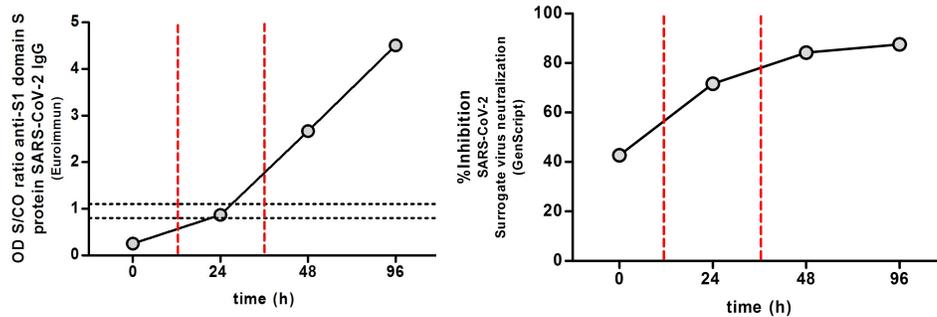


Figura 28. Evolución de los niveles de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en pacientes tratados con plasma convaleciente COVID-19. A y B- Determinación de los niveles de IgG anti-RBD empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA en muestras de suero de pacientes con COVID-19 tratados con plasma convaleciente previo a la transfusión y luego de esta, se distingue entre aquellos que no presentaban niveles detectables de anticuerpos al momento del tratamiento (A) de aquellos que presentaban más de 10 BAU/ml (B). En línea roja se indica el momento de la transfusión de plasma convaleciente. **C-** Evolución en el tiempo de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 de SARS-CoV-2 presentes en el suero de una paciente doble trasplantada renal tratada con plasma convaleciente COVID-19 determinados empleando el ensayo Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun) (izquierda) y de la capacidad neutralizantes de los mismos determinada mediante sVnt (GenScript) (derecha). En línea punteada roja se indica la administración de una unidad de plasma convaleciente (Ver Anexo I-8.3).

(Figura 28-A y B). La cuantificación de anticuerpos puede ser particularmente útil en este escenario, ya que la ausencia de anticuerpos previo a la administración de plasma puede ser un indicador de que el mismo se está empleando en etapas tempranas de la

infección, y luego de la administración para evaluar la necesidad de aumentar el número de transfusiones hasta que el paciente comience a generar sus propios anticuerpos.

Un caso particular donde la utilización de plasma convaleciente como terapia contra el COVID-19 tiene mayor aceptación es en el caso de individuos que están en estado de inmunosupresión ya sea natural o inducido. En octubre de 2020 tuvimos la oportunidad de colaborar en el seguimiento de una paciente dos veces trasplantada de riñón hospitalizada con COVID-19, que debido a un empeoramiento de los síntomas respiratorios ingresó a una unidad de cuidados intensivos donde recibió dos dosis de plasma con alto título de anticuerpos. Cuando evaluamos los niveles de anticuerpos y la capacidad neutralizante de los mismos en el suero de esta paciente, encontramos que previo a la transfusión los niveles de IgG específicas no fueron detectables, pero sí observamos actividad neutralizante, lo que podría ser atribuido a anticuerpos de tipo IgM y/o IgA (Figura 28-C). Luego de recibir la transfusión de plasma los niveles de anticuerpos IgG específicos aumentaron rápidamente, así como la capacidad neutralizante (Figura 28-C). En paralelo fue evaluada la carga viral, mostrando una disminución marcada en muestras de saliva e hisopado nasofaríngeo luego de la administración en plasma y una disminución más contenida en las muestras de aspirado traqueal³⁹¹. Luego de la transfusión también disminuyeron los niveles séricos de citoquinas inflamatorias asociadas al fenómeno de tormenta de citoquinas³⁹¹ (Anexo I-8.3).

A modo de síntesis, en esta sección se describe la puesta a punto inicial de un ensayo de tipo ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos de tipo IgG dirigidos contra el RBD del SARS-CoV-2 en muestras humanas de suero, así como su evolución a una versión cuali/cuantitativa que emplea como antígeno un RBD recombinante de diseño propio y producido en células de insecto, lo que hace que su obtención sea más sencilla y económica que la del mRBD original. También se analizan las distintas versiones del ensayo empleando muestras seleccionadas y comparándolas con otros ensayos serológicos para SARS-CoV-2 comerciales empleados internacionalmente. Por último, a partir de su aplicación en territorio para la realización de ensayos serológicos, la conformación de un banco de plasma convaleciente de COVID-19 y en trabajos de investigación básicos y aplicados se puede por un lado evaluar la performance del ensayo en el mundo real y por otro visualizar su utilidad en etapas tempranas de la pandemia, previo a la introducción de las vacunas.

3.2 ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-SARS-COV-2 EN UNA COHORTE DE TRABAJADORES DE UN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN URUGUAYO.

En el marco de las posibles aplicaciones de los ensayos serológicos para SARS-CoV-2 en nuestro país, a finales de 2020 nos propusimos realizar el seguimiento de la evolución temporal de los niveles de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 en todos los trabajadores del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon) que voluntariamente así lo quisieran. El proyecto titulado “Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo” tuvo como objetivos principales:

- Conocer la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en personas de un instituto de investigación (IPMon) que habían estado vinculadas 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 ensayo serológico desarrollado por el GTI en un grupo específico de individuos no diagnosticados previamente en forma sistemática para COVID-19.

El inicio de la campaña de vacunación contra COVID-19 en marzo de 2021 y su rápido alcance a toda la población hizo que esta idea original se transformara. De esta manera, este estudio nos permitió conocer también que sucedía con la respuesta inmune humoral generada en respuesta a las vacunas empleadas en nuestro país contra el SARS-CoV-2, en un grupo de personas que, en su gran mayoría, no integraban grupos de riesgo para la infección viral y que podían considerarse como representativo de la población general. En esta sección se muestran los resultados correspondientes al estudio de seroprevalencia realizado en marzo de 2021 en esta cohorte de trabajadores del IPMon y la evolución temporal de los niveles de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en los dos años del estudio. Por otra parte, se presenta la caracterización de la respuesta inmune humoral a las vacunación primaria con CoronaVac, y a la aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en un esquema de vacunación heteróloga pionero a nivel mundial.

3.2.1 Estudio de seroprevalencia y evolución de los niveles de anticuerpos en una cohorte de trabajadores del IPMon

Se realizaron cinco extracciones de sangre periférica a integrantes del personal del IPMon programadas en el correr de los años 2021 y 2022 (Figura 28-A), y dos extracciones extra, una luego de culminado el esquema de vacunación primaria (Extracción 2D) y otra luego de la aplicación de una primera dosis de refuerzo (Extracción 3D). La participación fue voluntaria, previa firma de consentimiento informado, y abierta a todos los integrantes del instituto sin restricciones, también se permitió la incorporación de nuevos participantes en el estudio en cualquiera de sus etapas. En total 242 personas diferentes participaron de al menos una etapa del estudio, y 58 participaron de todas las instancias de extracciones programadas (Tabla 7).

Tabla 7. Participación en el estudio y resultados de seroprevalencia para la presencia de anticuerpos IgG específicos de SARS-CoV-2

Etapas	Participantes totales	Nuevos participantes	Seroprevalencia de anticuerpos anti-RBD IgG
Extracción A	177		4,5% (8/177)
Extracción 2D	82	8	
Extracción B	184	17	98,9% (182/184)
Extracción 3D	114	0	
Extracción C	147	15	98,0% (144/147)
Extracción D	138	16	100% (138/138)
Extracción E	117	9	100% (117/117)

En la extracción realizada los días 17 y 18 de marzo de 2021 (Extracción A) se analizaron 177 muestras de suero, encontrándose 8 muestras positivas para la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 (Tabla 7). De estas muestras, cinco corresponden a individuos con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 mediante PCR, una corresponde a un individuo que había recibido una única dosis de la vacuna CoronaVac 15 días previo a la extracción, y las dos restantes a individuos sin diagnóstico confirmado de infección. En el resto de las extracciones programadas (B, C, D y E) el porcentaje de individuos positivos para la presencia de anticuerpos se mantuvo cercano al 100%, lo cual se puede atribuir a que estos muestreos fueron realizados luego del inicio de la campaña de vacunación contra COVID-19 en Uruguay y la mayoría de los participantes del estudio declararon haber recibido el esquema completo de

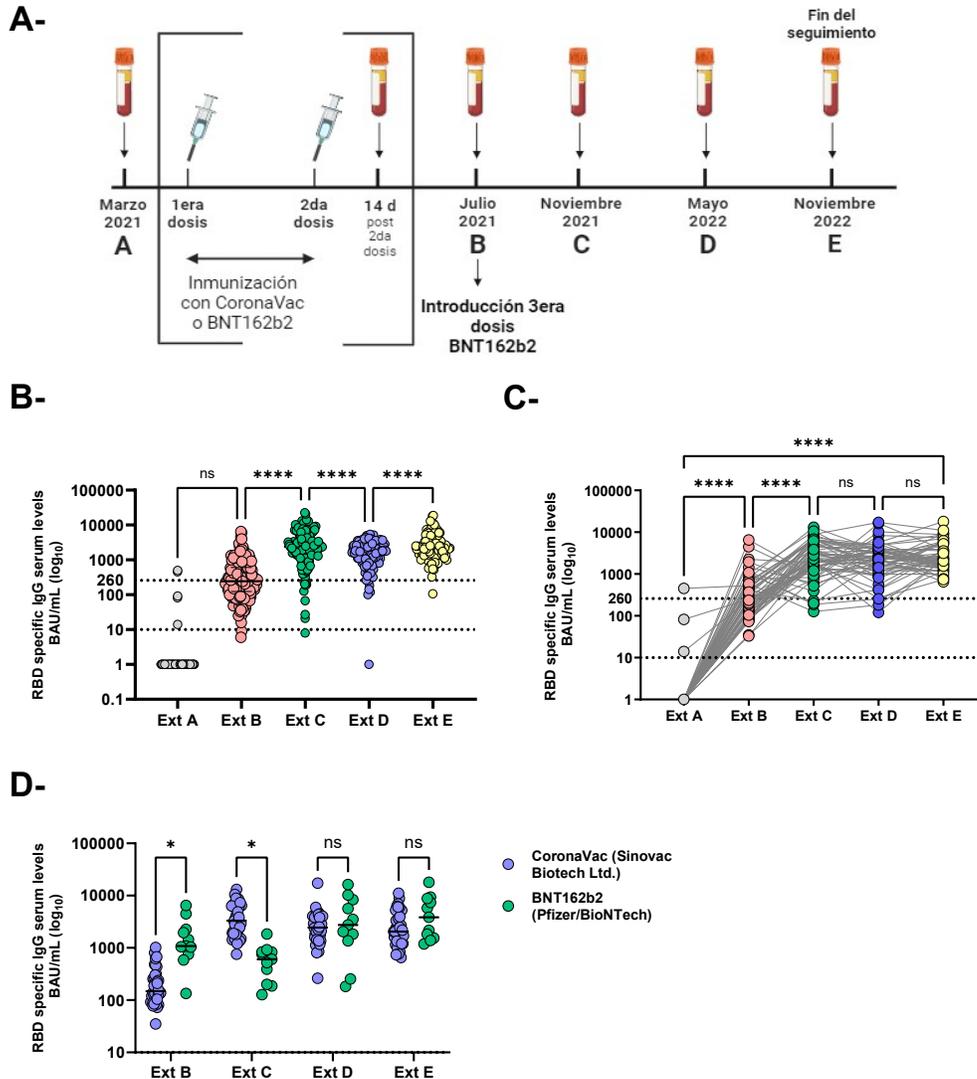


Figura 28. Análisis serológico de la evolución de los niveles de anticuerpos en una cohorte de trabajadores del IP Montevideo. **A-** Esquema de toma de muestras. **B-** Niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 determinados mediante el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA de todos los participantes en cada una de las extracciones, ns, no significativo, **** $p < 0,0001$ One-way ANOVA **C-** Evolución en el tiempo de los niveles de anticuerpos en 58 participantes de los cuales se disponía de todas las muestras seriadas. Ns, no significativo, **** $p < 0,0001$ ANOVA Friedman test **D-** Comparación de los niveles de anticuerpos presentes en la cohorte de 58 individuos en función del esquema de vacunación primaria recibido. Ns, no significativo, * $p > 0,05$ t test no pareado.

vacunación primaria (dos dosis de CoronaVac o dos dosis de BNT162b2) contra SARS-CoV-2.

En un trabajo coordinado por nosotros y realizado en el marco del curso 2022 de Metodología Científica II de la carrera Doctor en Medicina, se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos en las muestras positivas en la extracción A empleando

el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA, el cual aún no estaba desarrollado al momento de la extracción. Utilizando este mismo ensayo también se determinaron los niveles de anticuerpos en las muestras obtenidas en la subsiguientes extracciones, lo cual nos permitió conocer la evolución global de los niveles de anticuerpos en esta población (Figura 28-B). Como se discutirá más adelante si bien la historia de infección y vacunación de cada participante es única, principalmente en las etapas finales del estudio, la fluctuación general en los niveles de anticuerpos se puede vincular a puntos claves de la evolución de la dinámica de infección por SARS-CoV-2 y la vacunación.

Cuando se analizan los resultados globales de niveles de anticuerpos específicos anti-RBD en cada una de las etapas de extracción sin discriminar entre aquellos con o sin diagnóstico de infección y sin considerar el historial de vacunación se puede observar que en julio de 2021 (Ext B) hay un incremento notable en el número de individuos positivos para la presencia de anticuerpos, con una media en los niveles de IgG anti-RBD de 243,5 BAU/ml (IQR 123,3-607,5), lo cual es atribuible a la campaña de vacunación iniciada en marzo de ese año. En noviembre de 2021 (Ext C) se observa un aumento significativo en los niveles de anticuerpos específicos respecto a julio, media de 2373 BAU/ml (IQR 1389-5128), correspondiente a una extracción posterior a la introducción de una dosis de refuerzo con BNT162b2 para toda la población. Estos valores disminuyen en la extracción de mayo (Ext D), media de 1717 BAU/ml (IQR 906,5-2556), y vuelven a incrementarse en noviembre de 2022 (Ext E) con una media de 2123 BAU/ml (IQR 1349-3589). (Figura 28-B). Un punto interesante es que a excepción de un caso en noviembre de 2022 todos los individuos analizados presentaron más de 260 BAU/ml.

Si analizamos la evolución de los niveles de anticuerpos en el tiempo en aquellos 58 individuos en que disponemos de las cinco muestras seriadas, se observa un incremento sucesivo en los niveles de anticuerpos en las extracciones B y C, pero no se encuentra una disminución significativa en D (Figura 28-C). Cuando se discrimina este subgrupo en función de la vacuna recibida durante la vacunación inicial, se puede observar una diferencia significativa en los niveles de anticuerpos en la extracción B, siendo mayores en aquellos inmunizados con BNT162b2 comparado con los que recibieron CoronaVac, de acuerdo con lo esperado. En la extracción C se observa el comportamiento contrario, lo que se podría atribuir a que en ese momento probablemente la mayoría de los que habían sido vacunados con CoronaVac ya habían

recibido una dosis de refuerzo con BNT162b2, mientras que para los inmunizados con BNT162b2 la administración de una tercera dosis estuvo más retrasada en el tiempo (Figura 28-D). En las etapas finales del estudio no se observan diferencias en función de este parámetro, siendo probablemente otras las variables de mayor peso, por ejemplo, infecciones con SARS-CoV-2 y administración de dosis vacunales de refuerzo extras (Figura 28-D).

3.2.2 Caracterización de la respuesta inmune humoral a la vacunación contra COVID-19 en una cohorte de trabajadores de un instituto de investigación uruguayo.

Publicación 1

“Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2”

Florencia Rammauro*, Federico Carrión*, Natalia Olivero-Deibe, Martín Fló, Ana Ferreira, Otto Pritsch & Sergio Bianchi.

Resumen

La vacunación contra el SARS-CoV-2 ha demostrado ser una estrategia exitosa para prevenir formas graves de la enfermedad. CoronaVac y BNT162b2 fueron las vacunas más utilizadas a nivel global. En Uruguay, un 59,9% de la población fue inmunizada inicialmente con CoronaVac y un 38,4% con BNT162b2. Reportes internacionales y resultados de nuestro grupo mostraron que los niveles de anticuerpos generados en respuesta a CoronaVac, y a la vacunas a virus inactivado en general, eran más bajos que los inducidos por las vacunas a ARNm, lo que se acompañaba de una caída de estos títulos en el tiempo. La incertidumbre generada en torno a si estos niveles continuarían siendo suficientes para prevenir formas graves de COVID-19 y el surgimiento de nuevas variante virales llevó a la aplicación de refuerzos vacunales en muchos países. En Uruguay se decidió la administración de una dosis de refuerzo con la vacuna BNT162b2 independientemente de la vacuna recibida inicialmente, aplicando un esquema de vacunación heteróloga CoronaVac + BNT162b2 pionero a nivel mundial. En este trabajo se muestra un estudio longitudinal prospectivo de seguimiento serológico post vacunación realizado en 50 individuos sanos que recibieron un esquema de vacunación heteróloga, vacunación primaria con CoronaVac y una dosis de refuerzo con BNT162b2. Se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD (empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA) y la capacidad de estos de inhibir la interacción RBD-ACE2 mediante un ensayo sustituto de neutralización viral. En 20 individuos de esta cohorte se evaluó también la cinética de unión de los anticuerpos mediante resonancia plasmónica superficial (SPR) y la capacidad de estos de mediar citotoxicidad celular y fagocitosis dependientes de anticuerpos (ADCC y ADCP). Se encontró que todos los participantes presentaban anticuerpos específicos temprano

luego de la vacunación primaria con CoronaVac con una caída significativa de sus niveles a los 80 días post vacunación. La aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 provocó un aumento de unas 20 veces en los niveles de anticuerpos específicos, y si bien luego de 73 días de aplicada esta dosis se observa nuevamente una caída, estos continúan siendo más altos que los determinados luego de la vacunación inicial. Esta variación en los niveles de anticuerpos se acompaña también por un aumento en su funcionalidad.

Resultados

- 17 días luego de la vacunación con dos dosis de CoronaVac (t_1) la totalidad de los individuos analizados presentaron niveles detectables de anticuerpos IgG anti-RBD, con una media de 403 BAU/ml (IQR 249-618). A los 80 días post vacunación (t_2), si bien todos los participantes permanecieron seropositivos, los niveles de anticuerpos específicos habían caído a niveles significativamente menores (113 BAU/ml, IQR 61-193).
- Dos semanas post administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 (t_3) los niveles de anticuerpos anti-RBD ascendieron, alcanzando una media de 8877 BAU/ml (IQR 6076-13081), lo que representa un incremento de unas 50 veces respecto a los valores encontrados luego de la vacunación inicial. Transcurridos dos meses (t_4) los valores vuelven a descender, pero con una media de 2622 BAU/ml (1907-5100). Todos los participantes mostraron una cinética similar.
- La capacidad de los sueros de inhibir la interacción RBD-ACE2 evidenciada mediante un ensayo de un sVNT muestra un comportamiento similar a lo observado mediante ELISA. Se detectó una disminución entre t_1 y t_2 [media de 3413 BAU/ml (IQR 2250-5301) vs. 1064 BAU/ml (IQR 554-1968), respectivamente], un incremento notorio de la media en t_3 y nuevamente una caída a t_4 [65221 AU/ml (IQR 40701-109618) vs. 20480 AU/ml (IQR 12079-32878)].
- También se observó un incremento significativo en la capacidad de los sueros de mediar funciones efectoras como ADCC y ADCP luego de la tercera dosis comparado con lo encontrado luego de la vacunación primaria.

- Solo una fracción de los sueros obtenidos en t1 es capaz de inhibir la interacción entre el RBD de la variante Ómicron del SARS-CoV-2 y ACE2, a diferencia de lo que sucede con el RBD de la variante original. Aunque continúa siendo inferior, esta capacidad aumenta luego de la tercera dosis.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2



Florencia Rammauro^{a,b,1}, Federico Carrión^{b,1}, Natalia Olivero-Deibe^b, Martín Fló^{a,b}, Ana Ferreira^{c,d}, Otto Pritsch^{a,b}, Sergio Bianchi^{e,f,*}

^aDepartamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^bLaboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

^cUnidad de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^dÁrea Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^eLaboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^fLaboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2022

Received in revised form 6 July 2022

Accepted 19 July 2022

Available online 27 July 2022

Keywords:

SARS-CoV-2

Heterologous vaccination

Humoral immune response

Binding kinetics

Fc-mediated functions

ABSTRACT

Background: Vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has proven to be a successful strategy for prevent severe infections. CoronaVac and BNT162b2 are the most used vaccines worldwide, but their use in heterologous vaccination schedules is still subjected to evaluation.

Methods: Fifty healthy individuals who received heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 were enrolled in a post-vaccination serological follow-up longitudinal prospective study. We evaluated specific serum anti-receptor binding domain (RBD) IgG antibody levels, and their capacity to block RBD-ACE2 interaction with a surrogate neutralization assay. In 20 participants, we assessed antibody binding kinetics by surface plasmon resonance, and Fc-mediated functions by ADCC and ADCP reporter assays.

Results: Our baseline seronegative cohort, displayed seroconversion after two doses of CoronaVac and an important decrease in serum anti-RBD IgG antibodies levels 80 days post-second dose. These levels increased significantly early after the third dose with BNT162b2, but 73 days after the booster we found a new fall. Immunoglobulin functionalities showed a similar behavior.

Conclusions: The heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 generated an impressive increase in serum anti-RBD specific antibody levels followed by a drop. Nevertheless, these titers remained well above those found in individuals only vaccinated with CoronaVac in the same elapsed time. Serum IgG levels showed high correlation with antibody binding analysis, their capacity to block RBD-ACE2 interaction, and Fc-effectors mechanisms. Our work sheds light on the humoral immune response to heterologous vaccination with CoronaVac and BNT162b2, to define a post-vaccination correlate of protection against SARS-CoV-2 infection and to discuss the scheduling of future vaccine boosters in general population.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The application of effective vaccines against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has proved to be a successful strategy for reducing viral transmission and disease burden. The two most used vaccines worldwide are CoronaVac (Sino-vac Life Sciences, Beijing, China), an inactivated SARS-CoV-2 based

platform with more than 1.7 billion administered doses, and BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), a mRNA-based vaccine with more than 1.5 billion doses [1].

In March 2020, the first cases of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) were diagnosed in Uruguay. By February 24, 2022, of a 3.5 million population more than 830.000 confirmed cases of SARS-CoV-2 infection have been reported and more than 6.900 persons have died [2]. In February 2021, the Ministry of Public Health of Uruguay authorized the emergency use of CoronaVac [3] (600 SU of inactivated virus per dose) and BNT162b2 [4] (30 µg per dose) vaccines in two doses administrated 28 days apart. To date, 77% of the Uruguayan population has been vacci-

* Corresponding author at: Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Av. Italia s/n, 11600 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: sbianchi@fmed.edu.uy (S. Bianchi).

¹ Equal contribution as first author.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.023>

0264-410X/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

nated with two doses of some of these two vaccines (59.9% received CoronaVac and 38.4% BNT162b2) [2], while only 1.7% was immunized with AstraZeneca vaccine provided by the COVAX initiative (<https://vacuna.uy>).

Both CoronaVac and BNT162b2 have shown great efficacy to prevent hospitalizations two weeks after second dose (2D) administration [5,6], simultaneously with the detection of high levels of serum specific antibodies against the SARS-CoV-2 Spike protein [7]. Although immunological parameters required to define a post-vaccination correlate of protection (CoP) against SARS-CoV-2 infection are still under discussion, antibody-mediated viral neutralization has been considered one of the most important contributors [8], along with other antibody-mediated functions like Fc-mediated effector responses [9]. Some studies found that inactivated SARS-CoV-2 vaccines generates lower levels of neutralizing antibodies [1] and a decline over time in the level of specific antibodies has been reported for both, BNT162b2 [10,11] and CoronaVac vaccines [12].

Faced with this reality, the application of booster doses has become a strategic alternative that must coexist with the demand for a global equitable distribution of vaccines. In this regard, in September 2021 the Ministry of Public Health of Uruguay authorized the administration of a booster dose with BNT162b2 for the subset of the population fully vaccinated with CoronaVac. Nowadays, almost 52% of Uruguayan population has already received this booster.

Here, we analyzed the dynamics of serum IgG antibodies against the receptor binding domain (RBD) of SARS-Cov-2 Spike protein at different times, in a longitudinal prospective study on healthy individuals. We quantified the specific IgG levels in participants who received a two-dose plan of CoronaVac, and after heterologous BNT162b2 third dose (3D) administration. In addition, we analyzed the functionality of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies by measuring their neutralizing capacity, Fc-mediated effector functions, and their overall binding kinetics to the RBD. Regarding the measurement of the neutralizing capacity, we must point out that we used an *in vitro* assay that evidences the blockage of the interaction between the RBD protein and its receptor (ACE2) by specific anti-RBD antibodies, as an accessible experimental approach to address their neutralizing capacity. There is little information regarding the use of a 3D booster with BNT162b2 on fully vaccinated individuals with 2 doses of CoronaVac [13,14]. Our work provides new data that help to understand the development and characterization of the humoral immune response against this combination of heterologous vaccines.

2. Materials and methods

2.1. Cohort and study design

Fifty individuals, 60% women, median age 40 years (IQR 30–50) belonging to the staff of the Institut Pasteur de Montevideo, who underwent voluntary heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2, were enrolled in a post-vaccination serological follow-up study. Serum samples were collected at five times: before vaccination (t_0); after a median follow-up of 18 days (IQR 16–23) post-2D (t_1); 80 days (IQR 78–82) post-2D (t_2); 18 days (IQR 16–20) post-3D with BNT162b2 (t_3); and finally, 73 days (IQR 72–81) post-3D (for 41 of 50 participants) (t_4). All participants declared not to have been diagnosed with COVID-19 prior to or during the development of the study, in two questionnaires performed at t_0 and at t_3 . In addition, local and systemic adverse events within 7 days after 3D were registered. This study was done in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association and was approved by the ethical institutional review

board (MSP 956,220 – CEI 001-2021). Informed consent was obtained from all participants.

2.2. ELISA, neutralization activity, surface plasmon resonance (SPR), and antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis (ADCC and ADCP) assays

Anti-RBD (Wuhan variant) IgG serum levels were quantified using COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (developed by Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo and ATGen SRL), according to manufacturer's instructions. Results were expressed in binding antibody units per milliliter (BAU/mL), by using the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code: 20/136) for assay calibration (<https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>).

The blockade of RBD-ACE2 interaction by specific anti-SARS-CoV-2 antibodies was analyzed by using an *in vitro* surrogate virus neutralization test (sVNT; cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit, GenScript®) in serum from individuals who received heterologous vaccination at t_1 and t_2 (post-2D with CoronaVac) and at t_3 and t_4 (post-3D with BNT162b2), according to manufacturer's instructions. Briefly, recombinant RBD conjugated to HRP was pre incubated with different dilutions of serum samples and then added to ACE2 coated ELISA microplates to analyze the capacity of specific serum antibodies to inhibit RBD-ACE2 interaction. A calibrator serum (Cat. No. A02087, GenScript®) of 1.000.000 Arbitrary Units per milliliter (AU/mL) was used according to manufacturer's instructions to generate a standard curve by serially diluting the calibrator serum from 600 AU/mL to 9.37 AU/mL. The optical densities of serum dilutions measured at 450 nm that fall in the lineal range of the standard curve were used to interpolate a semiquantitative titer value in AU/mL, which were corrected with the corresponding dilution factor to calculate the final value in AU/mL of serum.

SPR assays were conducted with serum samples obtained at four different times (t_0 , t_1 , t_2 , t_3) from a sub-group of 20 individuals who received heterologous CoronaVac/BNT162b2 vaccination, to evaluate the binding of total specific antibodies against captured RBD on a SPR sensorchip. A recombinant RBD expressed in S2 insect cells was used for these assays (see [Supplementary Material](#) for details, [Fig. S1](#)).

ADCC and ADCP were performed on the same 20 serum samples at t_1 and t_3 , using ADCC and ADCP reporter assays (InvivoGen) according to manufacturer's instructions with minor differences. Jurkat-Lucia™ NFAT cells expressing human FcγRIIIA V158 allotype or human FcγRIIA H131 allotype were used for ADCC and ADCP reporter assays, respectively (see [Supplementary Material](#) for details).

2.3. Data analysis

By employing GraphPad Prism 9.2.0.332 we carried out comparisons between groups using Friedman's test and Dunnett's multiple comparison post-hoc test or Wilcoxon test. Although the non-parametric tests used in the multiple comparisons generally yielded significant differences in all the contrasts used, in some cases, the post-hoc comparisons were marginally significant, essentially because of the low number of observations. To overcome this difficulty, we used linear mixed models (R packages “lme4” and “emmeans”) with Tukey correction on the logarithm of the concentrations, modeling the individual as a random effect. Prior to this, we verified the normality and homoscedasticity assumptions through the Shapiro-Wilks test and the studentized Breusch-Pagan test, respectively. In all cases, the post-hoc contrasts were highly significant (p -value $< 1 \times 10^{-6}$). Results from reporter bioassays were obtained in relative luminescence unit

(RLUs) and expressed as endpoint titers. To assess consistency in the level of specific antibodies measured by ELISA and SPR, we calculated two-tailed Pearson correlation coefficients with a 95% confidence interval.

3. Results

Early after receiving the 3D of BNT162b2, all individuals reported only mild to moderate adverse events. Injection site pain was by far the most frequent (90%), followed by fatigue, malaise, and chills among other local and systemic adverse events (Table 1).

No specific anti-RBD IgG antibodies were found before vaccination (t_0) in the serum samples (baseline seronegative). In contrast, all participants displayed seroconversion 18 days post-2D of CoronaVac (t_1), with a median of 403 BAU/mL (IQR 249–618) (Fig. 1). At t_2 all 50 individuals remained seropositive, although with an important decrease in the level of anti-RBD IgG antibodies (median of 113 BAU/mL, IQR 61–193) (Fig. 1). Interestingly, a significant increase of serum anti-RBD IgG antibodies was evidenced after 18 days post-3D with BNT162b2 (t_3), reaching a median of 8877 BAU/mL (IQR 6076–13081) (Fig. 1). Finally, after a median of 73 days post-3D (t_4) the level of specific anti-RBD IgG antibodies in 41 individuals of our cohort decreased again but towards a median of 2622 BAU/mL (IQR 1907–5100) (Fig. 1). Despite individual differences, all participants showed the same trend in terms of IgG levels (Fig. 2A). In addition, we observed a concomitant evolution in blocking capacity of RBD-ACE2 interaction in participants who received a heterologous CoronaVac/BNT162b2 vaccination. We detected a drop between t_1 and t_2 [median of 3413 AU/mL (IQR 2250–5301) vs. 1064 AU/mL (IQR 554–1968), respectively], an important improvement early post-3D with BNT162b2 (t_3), and recurrently a reduction between t_3 and t_4 [median of 65,221 AU/mL (IQR 40701–109618) vs. 20,480 AU/mL (IQR 12079–32878), respectively] (Fig. 2B). According to the sVNT kit specifications, the neutralization titer can be interpreted as low (<1500AU/mL), medium (1500–5000AU/mL) and high (>5000). Besides, these blocking capacities linearly correlates with anti-RBD IgG levels at each time point (Fig. S2).

To evaluate kinetics of binding that could evidence differences in the maturation of humoral response, we selected 20 individuals who received heterologous vaccine scheme and analyzed the response based on total antibodies by SPR. All individuals surpassed the values obtained with pre immunization serum samples (Figs. 3A and S3) and dissociation proved to be extremely slow, causing that the level of bound antibodies remained almost constant for more than 10 min. By virtue of this, we could not obtain kinetics parameters and registered the level of bound antibodies (in RUs) after 1 min of dissociation, as an arbitrary measurement of the level of total bound anti-RBD antibodies. The values obtained at t_2 exhibited a decline with respect to t_1 , showing a temporal drop in the level of total circulating specific antibodies. Results obtained 18 days post-3D with BNT162b2 (t_3) resulted in a sharp increase in the level of total specific antibodies (Fig. 3A). Again, this behavior is in concordance with results obtained by ELISA (Fig. 3B) showing a strong correlation between IgG and total specific antibodies shortly after doses administration (Fig. S4).

Beyond virus recognition and neutralization by antibodies, Fc-mediated effector functions (like ADCC and ADCP) have been linked to protection against multiple pathogens [15], including SARS-CoV-2 vaccination in animal models [16]. To advance our knowledge on this, we performed *in vitro* ADCC and ADCP reporter assays on serum samples from 20 participants collected 18 days post-2D with CoronaVac (t_1) and 18 days post-3D with BNT162b2 (t_3). We found that BNT162b2 booster also increased the ADCC

Table 1
Adverse events after third dose with BNT162b2.

		Participants (%)
Local adverse events	Pain	45 (90)
	Swelling	4 (8)
	Skin redness	2 (4)
	Regional lymphadenopathy	1 (2)
Systemic adverse events	Fatigue	16 (32)
	Malaise	12 (24)
	Chills	10 (20)
	Headache	8 (16)
	Myalgia	8 (16)
	Fever	5 (10)
	Arthralgia	4 (8)
Nausea, vomiting, diarreia	4 (8)	

The questionnaire was conducted concomitantly to the blood extraction early after 3D with BNT162b2 by medical staff, and adverse events are classified as local or systemic signs or symptoms. All but two participants presented at least one of the evaluated events, and many of them presented more than one. The table shows the number of participants with the specific sign or symptom and the respective percentage within the cohort (%).

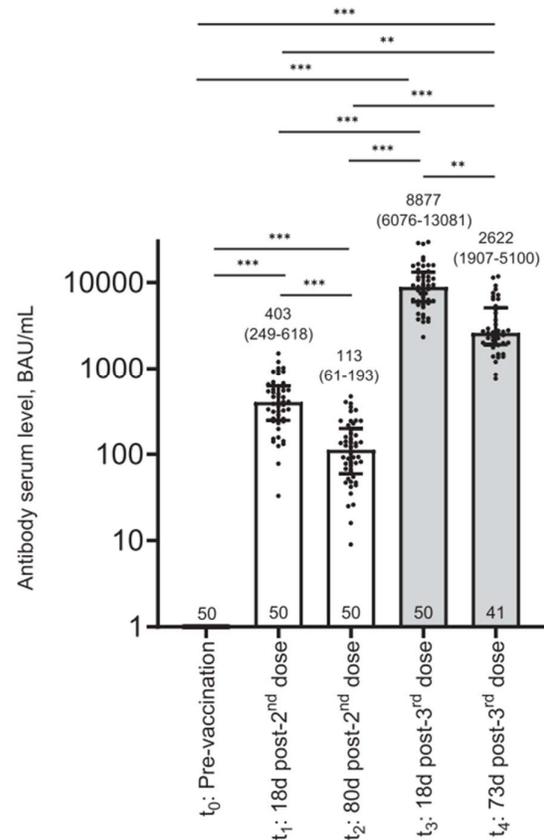


Fig. 1. Serum anti-RBD IgG levels at different times in the cohort follow-up. Serum samples of the same 50 individuals that received heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 were evaluated at different times, except for t_4 where 41 of them were studied. Bars and numbers above them represent the median values of each time point and numbers in parentheses are the interquartile ranges. The number of individuals evaluated at each time point is presented on the base of each bar. Bars corresponding to serum samples obtained after the third dose are presented in grey. Comparisons between groups were carried out using Friedman’s test and Dunn’s multiple comparison post-hoc test. ** $p = 0.01–0.001$, *** $p < 0.001$. BAU, binding antibody units.

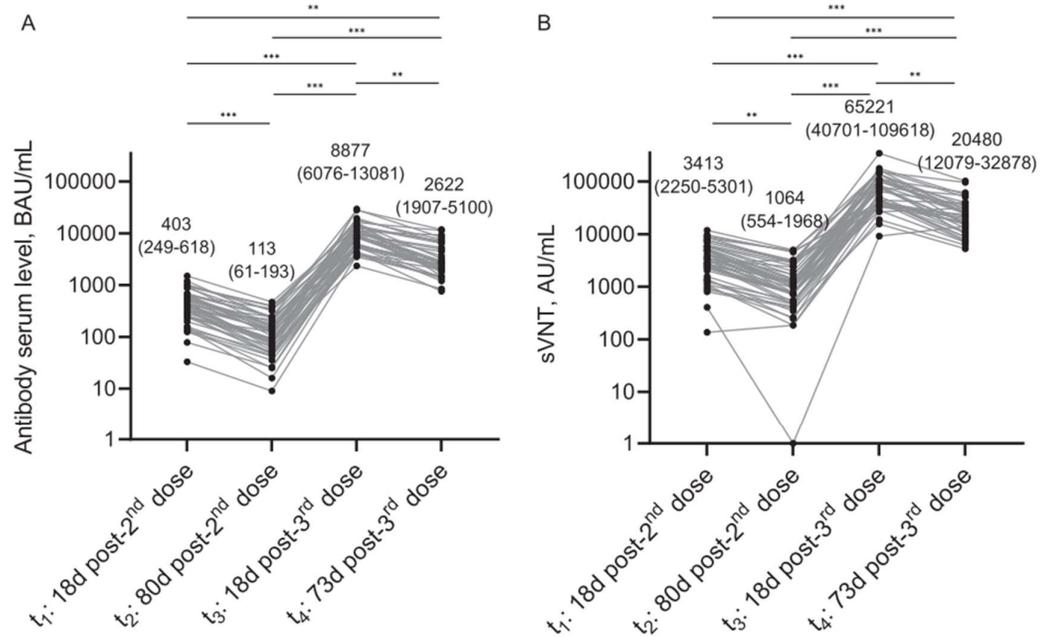


Fig. 2. Comparison between serum anti-RBD IgG levels and their capacity to block RBD-ACE2 interaction at different times in the cohort follow-up. Lines show the individual evolution over time of the serum anti-RBD IgG levels (A) and their capacity to block RBD-ACE2 interaction (B) for every participant in the cohort (n = 50). Numbers represents median values with the interquartile range in parentheses. Both datasets show a similar behavior over time in most of the evaluated cases. Comparisons between groups were carried out using Friedman’s test and Dunn’s multiple comparison post-hoc test. **p = 0.01–0.001, ***p < 0.001. BAU, binding antibody units; AU, arbitrary units.

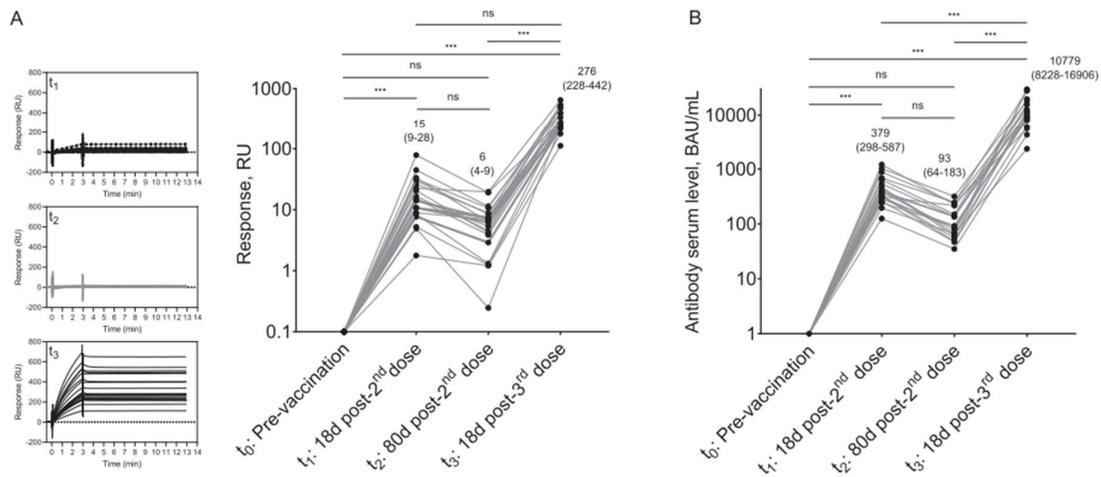


Fig. 3. Comparison of anti-RBD total antibodies measured by SPR and anti-RBD IgG measured by ELISA, in serum samples of 20 individuals selected from the cohort and collected at different times. The levels of total specific antibodies measured by SPR after 1 min dissociation are presented at different times with grey lines showing the individual evolution over time, and the corresponding sensorgrams as stacked insets on the left (A). Sensorgrams are presented after subtracting pre-vaccination data collected at t₀ and for clarity, curves are presented with the same color code as in Fig. S5. For comparison, the results obtained by ELISA with the same 20 selected individuals are presented (B) with the same representation as in Fig. 2. Both in SPR and ELISA, pre-vaccination data (at t₀) correspond to zero (not shown due to logarithmic representation of y-axis). RU, resonance units; BAU, binding antibody units.

titer from a median of 76 (IQR 37–165) to 548 (IQR 331–834) (Fig. 4A), and ADCP titer from a median of 28 (IQR 16–51) to 308 (IQR 116–436) (Fig. 4B). The same behavior was shown for blocking capacity of RBD-ACE2 interaction (Fig. 4C) and binding to RBD (Fig. 4D) at t₁ and t₃. Considering the relevance of Omicron outbreak in our country, we decided to compare the blocking capacity

of antibodies developed against SARS-CoV-2 Wuhan and Omicron variants, by performing sVNT with these same 20 sera. We found a clear reduced activity against the Omicron variant at both times, post-2D [median of Wuhan variant, 2371 AU/mL (IQR 1240–4494) vs. median of Omicron variant, 0 AU/mL (IQR 0–264)] and post-3D [median of Wuhan variant, 71,908 AU/mL (IQR 43947–108165), vs.

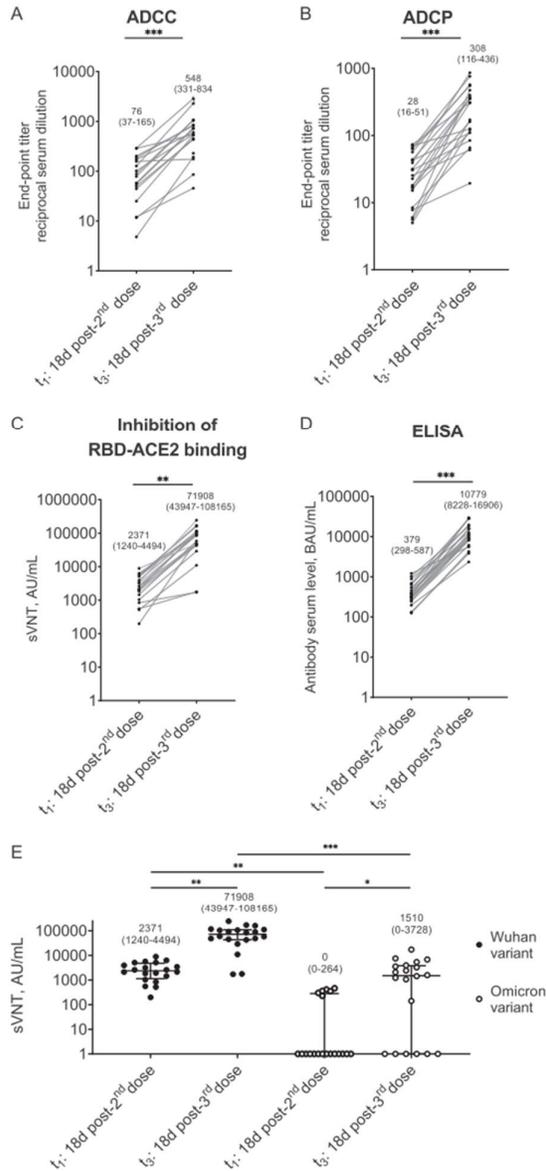


Fig. 4. Fc-mediated functions and RBD-ACE2 binding inhibition of specific serum anti-RBD immunoglobulins. Figure shows ADCC (A) and ADCP (B) Fc-mediated functions of serum anti-RBD immunoglobulin in 20 individuals early after two doses of Coronavac (t₁) and after heterologous booster with BNT162b2 (t₂). Endpoint titers were calculated by interpolating the reciprocal of serum dilutions to baseline, whose values were determined for each plate as the mean signal in absence of serum plus three standard deviations. Inhibition of RBD-ACE2 binding (C) and serum anti-RBD IgG levels (D) were measured in the same samples, showing a similar behavior over time. Comparison of the RBD-ACE2 binding inhibition activity against SARS-CoV-2 Wuhan and Omicron variants were carried out by sVNT in these 20 samples (E). Numbers represents median values and the interquartile range (in parentheses). Comparisons between groups were carried out using Wilcoxon test. *p < 0.05, **p = 0.01–0.001, ***p < 0.001. BAU, binding antibody units; AU, arbitrary units.

median of Omicron variant, 1510 AU/mL (IQR 0-3728)]. However, the *in vitro* blocking capacity of RBD-ACE2 interaction showed an increase after booster for both variants, especially for Wuhan one (Fig. 4E).

4. Discussion

Safety and efficacy of BNT162b2 and CoronaVac vaccines have been previously reported [5,17,18], and some studies have directly compared CoronaVac and BNT162b2 vaccines performances [19,20]. In fact, our group has recently evaluated the humoral response to these vaccines in solid organ transplant recipients [21,22]. Moreover, in a small number of individuals immunized with BNT162b2, we found similar results when comparing both vaccines over time (Fig. S5). At present, one of the major topics of discussion is the use of vaccine boosters [23,24], especially heterologous vaccination approaches. In this regard, noteworthy results have recently been published which focuses on heterologous priming with adenoviral-vectored vaccines followed by boosting with mRNA [25,26] or recombinant protein-based vaccines [27], or viral-vectored vaccine booster after two doses of inactivated vaccine [28]. Information regarding the dynamics of antibody response induced by heterologous prime-boost vaccination with inactivated-virus and mRNA vaccines remains scarce, especially in the medium-term post-booster [13,14,29]. Moreover, studies which focuses on functional characteristics of antibodies generated by heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 are still hard to find.

Our baseline seronegative cohort showed seroconversion 18 days post-2D with CoronaVac, but the level of specific antibodies dropped significantly 80 days post-2D (almost 72%), similarly to the decay overtime reported following the administration of BNT162b2 [10,30] or CoronaVac [12,31] vaccines. However, 18 days post-3D with BNT162b2 vaccine, we found an impressive 22-fold increase in serum specific antibody levels if compared with the same period post-2D with CoronaVac. Indeed, the level of antibodies detected in these individuals were almost three times higher than those reached by individuals fully vaccinated with two doses of BNT162b2 (Fig. S5). Our results are in agreement with recent reports analyzing populations that received the prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 [13,32], as well as with other 3D schedules, by using either homologous [33] or heterologous [34] schemes.

To assess the evolution of specific antibody levels after heterologous booster we compared results obtained 73 days post-3D (t₄) with those obtained at t₃ and found a drop of 70% considering medians values of each time, similarly to that seen in a comparable span of time post-2D with CoronaVac (between t₁ and t₂). Despite this, the antibody levels at t₄ remained 23-fold higher as compared to levels obtained from participants fully vaccinated with CoronaVac at 80 days post-2D. To the best of our knowledge this is the first study to determine the magnitude of the decline over time in serum specific antibody levels after heterologous vaccination with CoronaVac and BNT162b2 in a healthy population. These results are crucial in the definition of future boosting plans, especially regarding the time between them.

The dynamics of the capacity to block RBD-ACE2 interaction follows the same behavior as anti-RBD antibody levels, showing an important increase early post-3D with BNT162b2 (t₃), followed by a new reduction measured 73 days post-3D (t₄). Considering a similar period post-vaccination, the blocking of RBD-ACE2 interaction post-3D with BNT162b2 remained significantly higher than those observed post-2D with CoronaVac (t₃ vs. t₁). Despite the fall observed 73 days post-3D with BNT162b2, the blocking capacity remains almost 20-times higher when compared with that detected 80 days post-2D with CoronaVac (t₄ vs. t₂). Even more, blocking levels at t₄ remained 6-times higher than those detected at t₁. sVNT results expressed in AU/mL are very useful for comparing variation between different individuals and over time. If we interpret the results expressed in AU/mL according to the technical specifications of the sVNT kit, we can summarize that the median

values of neutralization titers were medium at t_1 , low at t_2 , and high at t_3 and t_4 .

The reported dynamics of humoral response highlights the benefits of this heterologous vaccination scheme, considering that the level of serum neutralizing antibodies has been proposed as a highly predictive marker of immune protection for symptomatic SARS-CoV-2 infected patients [35]. Even more, in the context of the emergence of SARS-CoV-2 variants of concern, a higher neutralization capacity achieved by a booster vaccination, can generate an increased protection from severe infection outcomes [8,36]. However, we found a clear decline in the RBD-ACE2 interaction blocking capacity when we compare the Wuhan variant against the Omicron one, in agree with previous findings of Pérez-Then and col. [13]. Anyway, our results could provide valuable information regarding the temporal behavior of blocking capacity since a CoP for SARS-CoV-2 is crucial in the fight against pandemic [37].

To compare the performance of different vaccine schedules, we urgently need to define efficient methods that serve as CoP for COVID-19 vaccines. These CoPs will also allow assessing the individual and community levels of protection against SARS-CoV-2 infection. Recent studies have shown that antibody levels against the Spike protein and its neutralizing capacity strongly correlates with efficacy across different vaccine platforms [35,38,39]. The use of the WHO international standard and the expression of results in BAU/mL, allows its comparison between different laboratories. Recent works suggested an antibody level of approximately 260 BAU/mL as a correlate of protection in the general population [38] and cancer patients [40]. Although this level still needs to be confirmed by other studies, the possibility of having this type of information could be useful for future management of vaccination schedules.

Based on the complexity of the mechanisms associated with the maturation of the humoral response and the effect that different vaccines platforms could have on it, we analyzed differences in the binding kinetics of serum samples by SPR. As opposed to ELISA, where antibodies reach binding equilibrium, using SPR we obtained real-time binding data, allowing kinetic binding evaluation at the expense of a reduction in sensitivity. However, polyclonality and the unknown concentration of specific antibodies prevented us from extracting overall kinetics parameters that could help in elucidating changes associated with longitudinal maturation of humoral response. Even the “apparent k_{off} ” (which does not depend on free antibody concentration) could not be properly calculated, probably because of avidity and/or re-binding events of the different isotypes of antibodies which result in an extremely slow dissociation. This slow dissociation (whose differences between doses were inexistent or remained undetectable) is a qualitative feature of anti-RBD antibodies, being compatible with the presence of high affinity IgG produced by plasma cell that underwent the complex process of maturation through successive rounds of somatic hypermutation and selection. On the other hand, this feature of specific IgG antibodies likely favors their ability to trigger effector mechanisms *in vivo*. Interestingly, the level of specific IgG or total antibodies, measured respectively by ELISA and SPR, showed a similar temporal evolution and a strong correlation early after 2D and 3D (Fig. S4), evidencing the usefulness of both techniques to analyze the dynamics of humoral responses nearly vaccination.

While recent data points to the ability of SARS-CoV-2 mRNA vaccines to evoke robust Fc-effector functions [9], less is known about inactivated virus vaccines and heterologous vaccination. It has been reported that some Fc-dependent pathways of anti-SARS-CoV-2 specific antibodies potentially contribute to COVID-19 severity [41] and/or could play a role in combatting SARS-CoV-2 infections [42]. We determined that these Fc-mediated fea-

tures show strong correlation with IgG serum levels and blocking capacities, similarly to findings reported in convalescent individuals [43]. This suggests that Fc-mediated functions could be playing an important role in preventing SARS-CoV-2 infections or COVID-19 severity after vaccination, even against emerging virus variants. Moreover, according to our findings, binding of specific antibodies could represent an indirect measurement of Fc-mediated effector functions.

The findings of this study must be seen considering some limitations. The first is the sample size; although, we consider it important to have a five-point IgG levels follow-up, covering pre- and post-vaccination. The second limitation concerns the lack of CoronaVac-boosted group; however, the Ministry of Public Health of Uruguay did not use CoronaVac as a booster option but only the BNT162b2 vaccine. For this reason, there are virtually no people with a third dose of CoronaVac in our country. Third, Uruguay lacks local access to biosafety level 3 (BSL3) facilities for achieving plaque reduction neutralization tests (PRNT), which is the gold standard for detecting and quantifying neutralizing antibodies (NAb). For this reason, we performed a surrogate neutralization test which clearly has limitations, such as the absence of biological membranes and other proteins or protein domains with a known role in the attachment, binding, and fusion processes of the virus with the host cell. Finally, data on T-cell responses induced during vaccination is a relevant issue to be considered.

5. Conclusion

In this work we provide new evidence regarding heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 in healthy individuals, showing the dynamic of the levels of specific antibody after approximately 2.5 months. A significant correlation between levels of anti-RBD antibodies, their RBD-ACE2 interaction blocking capacity, and ADCC or ADCP-effectors activities was found, supporting that inexpensive and easily implemented serological tests are important tools for monitoring the immune response after vaccination and define booster doses.

Inactivated virus-based vaccines are useful tools in the global fight against COVID-19, although more data are needed on its efficacy against emerging SARS-CoV-2 variants and on the durability of protection across different age groups, geographical settings and in the presence of comorbidities [44]. In addition, as mRNA-based platform vaccines have shown to be safe and effective over time [17], the use of a heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 represents a promising and safe strategy.

Authorship

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank all the participants who volunteered for this study at the Institut Pasteur de Montevideo. We especially thank Hugo Naya for his generous support during the preparation of this manuscript. The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work. To María Teresa Lamaison, Daniela Hirschfeld, and Finance and Purchases Unit members for their dedication and their diligent support during study execution.

Funding

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur [grant number COF 03/11]; Agencia Nacional de Investigación e Innovación; and Comisión Académica de Posgrado (CAP), Universidad de la República.

The funders did not play any role in the design and conduct of the study; collection, analysis, or interpretation of the data; preparation, approval, or decision to submit the manuscript for publication.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.023>.

References

- [1] Mallapaty S. China's COVID vaccines have been crucial - now immunity is waning. *Nature* 2021;598(7881):398–9. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02796-w>.
- [2] Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao L, et al. Coronavirus pandemic (COVID-19). *Our World in Data*; 2020. <<https://ourworldindata.org/coronavirus>>.
- [3] Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21(2):181–92.
- [4] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020;383(27):2603–15.
- [5] Jara A, Undurraga EA, González C, Paredes F, Fontecilla T, Jara G, et al. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. *N Engl J Med* 2021;385(10):875–84.
- [6] Tenforde MW, Patel MM, Ginde AA, et al. Effectiveness of SARS-CoV-2 mRNA vaccines for preventing covid-19 hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab687>.
- [7] Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol* 2021;21(8):475–84. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00578-z>.
- [8] Cromer D, Steain M, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe* 2022;3(1):e52–61.
- [9] Tazuin A, Nayrac M, Benlarbi M, et al. A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host Microbe* 2021;29(7):1137–1150 e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.001>.
- [10] Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning immune humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *N Engl J Med* 2021;385(24):e84.
- [11] Kertes J, Gez SB, Saciuk Y, Supino-Rosin L, Stein NS, Mizrahi-Reuveni M, et al. Effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine 6 months after vaccination among patients in large health maintenance organization, Israel. *Emerg Infect Dis* 2022;28(2):338–46.
- [12] Cucunawangsih C, Wijaya RS, Lugito NPH, Suriapranata I. Antibody response to the inactivated SARS-CoV-2 vaccine among healthcare workers, Indonesia. *Int J Infect Dis* 2021;113:15–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.078>.
- [13] Pérez-Then E, Lucas C, Monteiro VS, Miric M, Brache V, Cochon L, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination. *Nat Med* 2022;28(3):481–5.
- [14] Cheng SMS, Mok CKP, Leung WY, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nat Med* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01704-7>.
- [15] Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 2018;18(1):46–61. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.106>.
- [16] Gorman MJ, Patel N, Guebre-Xabier M, Zhu AL, Atyeo C, Pullen KM, et al. Fab and Fc contribute to maximal protection against SARS-CoV-2 following NVX-CoV2373 subunit vaccine with Matrix-M vaccination. *Cell Rep Med* 2021;2(9):100405.
- [17] Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine through 6 months. *N Engl J Med* 2021;385(19):1761–73.
- [18] Dinc HO, Saltoglu N, Can G, Balkan II, Budak B, Ozbey D, et al. Inactive SARS-CoV-2 vaccine generates high antibody responses in healthcare workers with and without prior infection. *Vaccine* 2022;40(1):52–8.
- [19] Lim WW, Mak L, Leung GM, Cowling BJ, Peiris M. Comparative immunogenicity of mRNA and inactivated vaccines against COVID-19. *Lancet Microbe* 2021;2(9):e423. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00177-4).
- [20] Mok CKP, Cohen CA, Cheng SMS, et al. Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID-19 vaccines in Hong Kong. *Respirology* 2021. <https://doi.org/10.1111/resp.14191>.
- [21] Seija M, Rammauro F, Santiago J, Orihuela N, Zuberi C, Machado D, et al. Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant. *Clin Kidney J* 2022;15(3):527–33.
- [22] Prieto J, Rammauro F, López M, Rey R, Fernández A, Bianchi S, et al. Low Immunoglobulin G antibody levels against severe acute respiratory disease coronavirus 2 after 2-dose vaccination among liver transplantation recipients. *Liver Transpl* 2022;28(5):891–4.
- [23] Krause PR, Fleming TR, Peto R, Longini IM, Figueroa JP, Sterne JAC, et al. Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *Lancet* 2021;398(10308):1377–80.
- [24] Callaway E. COVID vaccine boosters: the most important questions. *Nature* 2021;596(7871):178–80. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02158-6>.
- [25] Schmidt T, Klemis V, Schub D, Mihm J, Hielscher F, Marx S, et al. Immunogenicity and reactivity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nat Med* 2021;27(9):1530–5.
- [26] Normark J, Vikström L, Gwon Y-D, Persson I-L, Edin A, Björnell T, et al. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA-1273 vaccination. *N Engl J Med* 2021;385(11):1049–51.
- [27] Stuart ASV, Shaw RH, Liu X, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, et al. Immunogenicity, safety, and reactivity of heterologous COVID-19 primary vaccination incorporating mRNA, viral-vector, and protein-adjuvant vaccines in the UK (Com-COV2): a single-blind, randomised, phase 2, non-inferiority trial. *Lancet* 2022;399(10319):36–49.
- [28] Yorsaeng R, Suntronwong N, Phowattanasathian H, Assawakosri S, Kanokudom S, Thongmee T, et al. Immunogenicity of a third dose viral-vectored COVID-19 vaccine after receiving two-dose inactivated vaccines in healthy adults. *Vaccine* 2022;40(3):524–30.
- [29] Costa Clemens SA, Weckx L, Clemens R, Almeida Mendes AV, Ramos Souza A, Silveira MBV, et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study. *Lancet* 2022;399(10324):521–9.
- [30] Collier A-R, Yu J, McMahan K, Liu J, Chandrashekar A, Maron JS, et al. Differential kinetics of immune responses elicited by Covid-19 vaccines. *N Engl J Med* 2021;385(21):2010–2.
- [31] Zeng G, Wu Q, Pan H, Li M, Yang J, Wang L, et al. Immunogenicity and safety of a third dose of CoronaVac, and immune persistence of a two-dose schedule, in healthy adults: interim results from two single-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 clinical trials. *Lancet Infect Dis* 2022;22(4):483–95.
- [32] Assawasaksakul T, Sathitranacheewin S, Vichaiwattana P, Wanlapakorn N, Poovorawan Y, Kittanamongkolchai W. Immunogenicity, safety and reactivity of a heterogeneous booster following the CoronaVac inactivated SARS-CoV-2 vaccine in patients with SLE: a case series. *RMD Open* 2021;7(3):e002019.
- [33] Choi A, Koch M, Wu K, Chu L, Ma LingZhi, Hill A, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 variant mRNA vaccine boosters in healthy adults: an interim analysis. *Nat Med* 2021;27(11):2025–31.
- [34] Munro APS, Janani L, Cornelius V, Aley PK, Babbage G, Baxter D, et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2021;398(10318):2258–76.
- [35] Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27(7):1205–11.
- [36] Hunsawong T, Fernandez S, Buathong R, Khadthasrima N, Rungrojchareonkit K, Lohachanakul J, et al. Limited and short-lasting virus neutralizing titers induced by inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *Emerg Infect Dis* 2021;27(12):3178–80.
- [37] Krammer F. A correlate of protection for SARS-CoV-2 vaccines is urgently needed. *Nat Med* 2021;27(7):1147–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01432-4>.
- [38] Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bibi S, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27(11):2032–40.
- [39] Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science* 2022;375(6576):43–50.
- [40] Barrière J, Carles M, Audigier-Valette C, Re D, Adjoutah Z, Seitz-Polski B, et al. Third dose of anti-SARS-CoV-2 vaccine for patients with cancer: should humoral responses be monitored? A position article. *Eur J Cancer* 2022;162:182–93.
- [41] Adeniji OS, Giron LB, Purwar M, Zilberstein NF, Kulkarni AJ, Shaikh MW, et al. COVID-19 severity is associated with differential antibody Fc-mediated innate immune functions. *mBio* 2021;12(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00281-21>.
- [42] Diez JM, Romero C, Cruz M, et al. Anti-SARS-CoV-2 hyperimmune globulin demonstrates potent neutralization and antibody-dependent cellular

F. Rammauro, F. Carrión, N. Olivero-Deibe et al.

Vaccine 40 (2022) 5189–5196

cytotoxicity and phagocytosis through N and S proteins. *J Infect Dis* 2021(2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa540>.

[43] Butler SE, Crowley AR, Natarajan H, Xu S, Weiner JA, Bobak CA, et al. Distinct features and functions of systemic and mucosal humoral immunity among

SARS-CoV-2 convalescent individuals. *Front Immunol* 2020;11:618685. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.618685>.

[44] Ramasamy MN, Jessop LJ. CoronaVac: more data for regulators and policy makers. *Lancet* 2021;398(10296):186–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01543-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01543-9).

3.3 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN CONTRA COVID-19 EN GRUPOS DE PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS EN URUGUAY.

Los receptores de trasplantes de órganos sólidos (RTOS) y pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) se vieron particularmente impactados con la pandemia por COVID-19. El estado de inmunosupresión ya sea natural o farmacológico, y la presencia concomitante de comorbilidades hace que estos grupos sean más propensos a desarrollar formas graves de la enfermedad por COVID-19, habiéndose reportado tasas más altas de mortalidad que en la población general, sobre todo durante la primera ola de infección^{40,349}. En el caso de los pacientes con ERC que se encuentran en tratamiento de sustitución de la función renal, se suma la necesidad de concurrir a los centros de diálisis, aumentando el riesgo de exposición al virus. La vacunación contra el SARS-CoV-2 ha disminuido el impacto de COVID-19, sin embargo, múltiples estudios han mostrado una respuesta inmune subóptima a las vacunas contra COVID-19 en cohortes de pacientes con enfermedades crónicas y que se encuentran bajo tratamiento inmunosupresor. En Uruguay, los grupos de pacientes inmunosuprimidos fueron priorizados en etapas iniciales de la campaña de vacunación, pero se les aplicó la misma estrategia de inmunización que a la población general. A nivel internacional, en ese mismo momento, comenzaban a surgir evidencias de una respuesta disminuida en estos grupos frente a la inmunización con vacunas basadas en ARNm, pero qué ocurría con las vacunas a virus inactivado era desconocido.

En este apartado se describe el trabajo realizado, en conjunto con el área clínico-asistencial, para evaluar la respuesta inmune humoral frente a la vacunación contra COVID-19 en tres cohortes de pacientes inmunosuprimidos en nuestro país: trasplantados renales (TR), trasplantados hepáticos (TH) y pacientes en diálisis crónica (PDC). Evaluándose tanto la respuesta a la vacunación primaria como frente a distintas estrategias de refuerzo.

3.3.1 Respuesta a la vacunación contra COVID-19 en receptores de trasplante renal

Publicación 2

“Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant”

Mariana Seija*, Florencia Rammauro*, José Santiago, Natalia Orihuela, Catherine Zulberti, Danilo Machado, Cecilia Recalde, Javier Noboa, Victoria Frantchez, Rossana Astesiano, Federico Yandián, Ana Guerisoli, Álvaro Morra, Daniela Cassinelli, Cecilia Coelho, Belén de Aramburu, Paulina González-Severgnini, Romina Moreno, Aldana Pippolo, Gabriela López, Mónica Lemos, Lorena Somariva, Eliana López, Soledad Fumero, Carla Orihuela, Rosalía Rodríguez, Gonzalo Acuña, Victoria Rabaza, Nancy Perg, Rossana Cordero, Cristina Reinfeld, Paula Olivera, Paola Montero, Cecilia Nogueira, Catheryn Nalerio, Sergio Orihuela, Lilián Curi, Ema Burgstaller, Oscar Noboa, Otto Pritsch, Marcelo Nin & Sergio Bianchi.

Resumen

Estudios previos habían mostrado que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación contra SARS-CoV-2 en pacientes trasplantados renales, empleando vacunas basadas en ARNm o vectores adenovirales, era débil. Sin embargo, poco se conocía de la respuesta humoral desarrollada en esta población luego de la utilización de vacunas a virus inactivado. En este trabajo, comparamos la respuesta de anticuerpos generada luego de la administración de la vacuna a virus inactivado CoronaVac y de la vacuna a ARNm BNT162b2 en un grupo conformado por pacientes de todos los centros de trasplante renal de Uruguay, vacunados entre el 1ero y el 31 de mayo de 2021 (CoronaVac n=245 y BNT162b2 n=39), sin diagnóstico previo de COVID-19. Las muestras fueron tomadas 30-40 días luego de la administración de la segunda dosis y se cuantificaron los niveles de anticuerpos IgG específicos contra el RBD de la proteína Spike de SARS-CoV-2 mediante ELISA (kit COVID-19 IgG Quant ELISA). Se detectó la presencia de anticuerpos solamente en un 29% de los pacientes con trasplante renal (36,5% BNT162b2, 27,8% CoronaVac, $p = 0,248$), comparado con una población control de individuos no trasplantados donde se detectaron anticuerpos en el 100% de los

individuos para ambas vacunas. En conclusión, la respuesta de anticuerpos frente a la vacunación con SARS-CoV-2 fue significativamente menor en los pacientes con trasplante renal comparado con la población control para ambas vacunas estudiadas. Sin embargo, en los pacientes en los que se detectó respuesta, los niveles de anticuerpos fueron más altos cuando se empleó la vacuna BNT162b2. Estos resultados apoyaron la idea de que era necesario buscar estrategias que potenciaran la respuesta a la vacunación contra SARS-CoV-2 en trasplantados renales.

Resultados

- El porcentaje de individuos en los cuales se detectó presencia de anticuerpos específicos luego de la administración de una segunda dosis de vacuna contra SARS-CoV-2 fue significativamente menor en el grupo de trasplantados renales comparado con el grupo control (29% vs 100%).
- Aunque no significativo ($p=0,248$), se encontró un porcentaje mayor de trasplantados renales positivos para la presencia de anticuerpos anti-RBD entre aquellos vacunados con BNT162b2 (36,5%) comparado con los vacunados con CoronaVac (27,8%).
- Los niveles de anticuerpos específicos contra el RBD fueron más altos con BNT162b2 que con CoronaVac en trasplantados renales [media (IQR) 173 (73–554) y 29 (11–70) BAU/mL, $p < 0,034$, respectivamente], pero 10 veces más bajos que en el grupo control [BNT162b2: 2638 (2608–3808) y CoronaVac: 308 (209–335) BAU/mL, $p < 0,034$, respectivamente].
- En un análisis multivariado, las variables asociadas significativamente con una respuesta humoral negativa fueron: la edad, estar bajo triple inmunosupresión, la tasa de filtrado glomerular estimada y el tiempo transcurrido desde el trasplante renal.



ORIGINAL ARTICLE

Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant

Mariana Seija ^{1,2,*}, Florencia Rammauro ^{3,4,*}, José Santiago ¹, Natalia Orihuela ⁵, Catherine Zulberti ⁵, Danilo Machado ⁶, Cecilia Recalde ⁶, Javier Noboa ^{1,4}, Victoria Frantchez ⁷, Rossana Astesiano ¹, Federico Yandián ¹, Ana Guerisoli ¹, Álvaro Morra ⁵, Daniela Cassinelli ⁸, Cecilia Coelho ⁸, Belén de Aramburu ⁸, Paulina González-Severgnini ⁸, Romina Moreno ⁸, Aldana Pippolo ⁸, Gabriela López ⁹, Mónica Lemos ⁹, Lorena Somariva ⁹, Eliana López ⁹, Soledad Fumero ⁹, Carla Orihuela ⁹, Rosalía Rodríguez ⁶, Gonzalo Acuña ⁶, Victoria Rabaza ⁶, Nancy Perg ⁶, Rossana Cordero ⁶, Cristina Reisfeld ⁶, Paula Olivera ⁶, Paola Montero ⁶, Cecilia Nogueira ⁶, Catheryn Nalerio ⁵, Sergio Orihuela ⁵, Lilián Curi ⁵, Ema Burgstaller ⁶, Oscar Noboa ¹, Otto Pritsch ^{3,4}, Marcelo Nin ^{1,5} and Sergio Bianchi ^{2,10}

¹Centro de Nefrología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁵Centro de Trasplante INU, Hospital Italiano, Montevideo, Uruguay, ⁶Centro de Trasplante, Hospital Evangélico, Montevideo, Uruguay, ⁷Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁸Students of Scientific Methods 2, Medical Doctor Degree, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁹Departamento de Enfermería, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay and ¹⁰Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Sergio Bianchi; E-mail: sbianchi@fmed.edu.uy

Received: 6.9.2021; Editorial decision: 15.12.2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the ERA. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

ABSTRACT

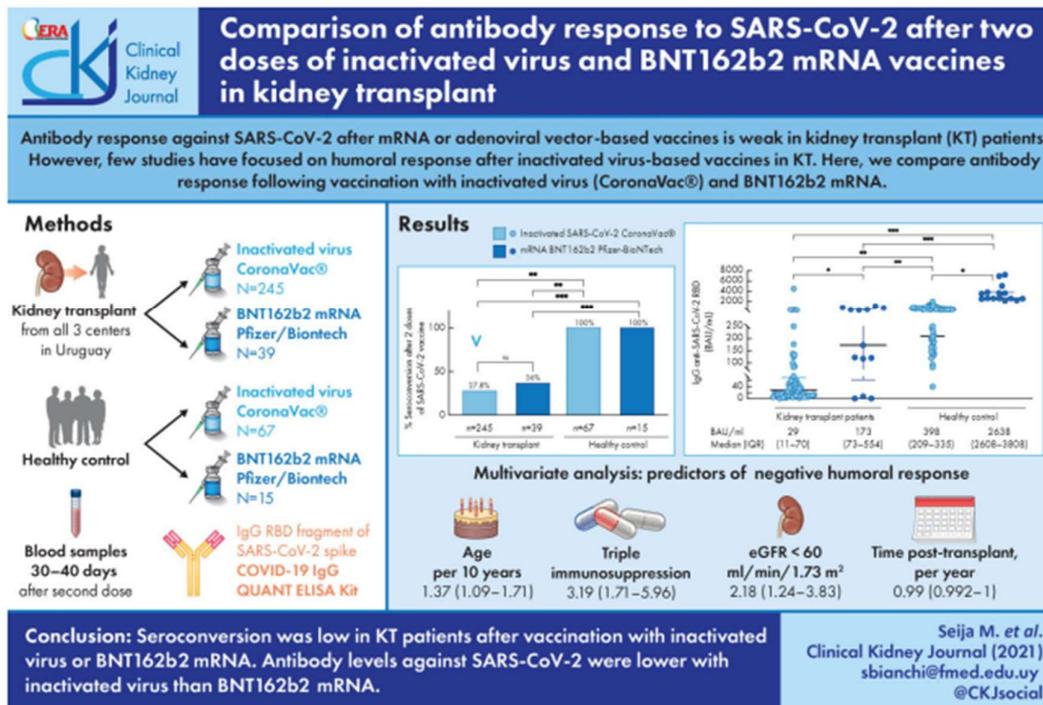
Background. Antibody response against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) after mRNA or adenoviral vector-based vaccines is weak in kidney transplant (KT) patients. However, few studies have focused on humoral response after inactivated virus-based vaccines in KT. Here, we compare antibody response following vaccination with inactivated virus (CoronaVac®) and BNT162b2 mRNA.

Methods. A national multicentre cross-sectional study was conducted. The study group was composed of patients from all KT centres in Uruguay, vaccinated between 1 and 31 May 2021 (CoronaVac®, n = 245 and BNT162b2, n = 39). The control group was constituted of 82 healthy individuals. Participants had no prior confirmed coronavirus disease 2019 (COVID-19) test. Blood samples were collected between 30 and 40 days after the second dose. Serum-specific immunoglobulin G (IgG) antibodies against the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike protein were determined using the COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit.

Results. Only 29% of KT recipients showed seroconversion (36.5% BNT162b2, 27.8% inactivated virus, P = 0.248) in comparison with 100% in healthy control with either vaccine. Antibody levels against RBD were higher with BNT162b2 mRNA than with inactivated virus [median (interquartile range) 173 (73–554) and 29 (11–70) binding antibody units (BAU)/mL, P < 0.034] in KT and 10 times lower than healthy control [inactivated virus: 308 (209–335) and BNT162b2: 2638 (2608–3808) BAU/mL, P < 0.034]. In multivariate analysis, variables associated with negative humoral response were age, triple immunosuppression, estimated glomerular filtration rate and time post-KT.

Conclusion. Seroconversion was low in KT patients after vaccination with both platforms. Antibody levels against SARS-CoV-2 were lower with inactivated virus than BNT162b2 mRNA. These findings support the need for strategies to improve immunogenicity in KT recipients after two doses of either vaccine.

GRAPHICAL ABSTRACT



Keywords: COVID-19, kidney transplantation, SARS-CoV-2 vaccine

INTRODUCTION

Kidney transplant (KT) patients are at high risk of severe severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection [1–5]. Hence, vaccination in this population is recommended. Recent evidence suggests that antibody response among solid organ transplant (SOT) patients is weak after two doses of mRNA-based vaccine or adenoviral vector platform [6–23]. However, only one study has addressed humoral response after inactivated virus-based vaccine in KT patients [24].

Inactivated virus vaccines are a well-known technology and have several advantages for large-scale utilization, including their stability at non-extreme refrigeration temperatures and their long lifespan [25]. These characteristics make them a useful tool in the global fight against coronavirus disease 2019 (COVID-19), although more data are needed on its efficacy in KT recipients. Furthermore, recently it has been approved by the European Medicine Agency for emergency use in Europe and to date, more than 750 000 000 have been administered in more than 40 countries [26, 27].

In Uruguay, the Ministry of Public Health approved inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac®, Sinovac Biotech Ltd) and BNT162b2 mRNA (Pfizer/BioNTech) vaccines for emergency use [28, 29]. Healthcare workers were vaccinated with BNT162b2 mRNA. SOT patients were prioritized and vaccinated according to age group (people between 18 and 70 years received inactivated virus-based and those over 70 years were vaccinated with BNT162b2 mRNA). CoronaVac® was administered to almost 70% of the Uruguayan population, including SOT patients, with a reduction of infection and intensive care admissions according to the Health Ministry Authority.

The aim of this work was to compare humoral response after inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in KT patients and evaluate adverse events associated with vaccination.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a national multicentre cross-sectional study to evaluate humoral response after SARS-CoV-2 vaccination in KT patients. The study group was composed of KT recipients from all KT centres in Uruguay (INU-Hospital Italiano, Hospital Evangélico and Hospital de Clínicas). Inclusion criteria were age >18 years old, kidney or kidney-pancreas transplant, no prior confirmed COVID-19 and had a second dose of either vaccine, BNT162b2 mRNA or inactivated virus (CoronaVac®), between 1 and 31 May. The control group was constituted by 82 healthy individuals [40.2% men; median age 41 years, interquartile range (IQR) 33–49], without immunosuppression medication, no prior confirmed COVID-19 and have the second dose of either vaccine BNT162b2 mRNA (15 individuals, 40% men; median age 42 years, IQR 37–47) or inactivated virus (CoronaVac®) (67 individuals, 40.3% men; median age 41 years, IQR 30–49).

All subjects received two doses (30 µg each) of BNT162b2 mRNA or two doses (600 SU each) of inactivated virus, both 28 days apart, according to the recommendations of the Uruguayan National Health Authority. None of the participants had prior confirmed COVID-19. Clinical data were recorded. A questionnaire of adverse events was performed, including all symptoms 7 days after each dose, which included local side effects such as pain, redness, swelling and regional lymphadenopathy, and systemic side effects such as fever, chills, headache, fatigue, myalgia, arthralgia, nausea, vomiting and diarrhoea. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calcu-

lated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula.

Blood samples were collected between 30 and 40 days after the second dose injection. Freshly collected blood in clot activator and gel tube was centrifuged (2500 r.p.m., 15 min). Sera were separated and stored at –20°C until analysis.

The level of serum-specific Immunoglobulin G (IgG) antibodies against the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike protein was determined using the COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (developed by Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo and ATGen Company), according to manufacturer’s instruction. The assay has a sensitivity of 97.7% and specificity 96.2%. Quantitative test results were expressed in binding antibody units (BAU)/mL referring to the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code: 20/136) used for assay calibration. Seroconversion was defined as presence of specific IgG antibodies against the RBD.

The study was approved by the ethical institutional review board (MSP 3535533-956220).

Continuous variables were tested for normal distribution (Kolmogorov-Smirnov). Normally distributed variables were expressed as mean ± standard deviation (SD), non-normally distributed as median and interquartile range, and qualitative variables as number and percentage. Categorical variables were compared using Chi-squared statistic. Continuous variables were compared using t-test (normally distributed) or Kruskal-Wallis/Mann-Whitney (non-normally distributed).

Group analysis included two groups according to SARS-CoV-2 IgG antibodies status: positive or negative.

Binary logistic regression models for negative serology test risk were fitted including the significant variables in univariate analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant. IBM® SPSS® version 22 (Chicago, IL, USA) statistical software was used for statistical analyses and Graph Pad 8 for charts constructs.

RESULTS

Among 1400 KT patients in Uruguay, 284 KT recipients were included in this study. In addition, 82 healthy individuals were included as a control group. Both groups underwent serological testing for SARS-CoV-2-specific antibodies after two doses of inactivated virus or BNT162b2 mRNA vaccine. Baseline patients’ characteristics are detailed in Table 1. Seroconversion was lower in KT patients than healthy control (29% versus 100%). Seroconversion in KT with BNT162b2 mRNA (36.5%) was higher than inactivated virus (27.8%), but without statistical significance ($P = 0.248$, Figure 1A).

Serum levels of anti-RBD IgGs were significantly higher in KT patients who received BNT162b mRNA compared with inactivated virus vaccine, with a median of 173 (73–554) and 29 (11–70) BAU/mL respectively ($P < 0.034$, Figure 1B). Compared with the healthy control group, KT had lower levels of antibody with either vaccine.

Seropositive patients for anti-RBD were significantly younger, had higher eGFR and lymphocyte count, and longer time since transplantation. With regard to immunosuppression treatment, these patients were less frequently on triple therapy (antimetabolite, calcineurin inhibitor and prednisone) and more often on everolimus treatment (Table 1).

In multivariate analysis, variables associated with negative humoral response were age [per 10 years, odds ratio 1.372 [95% confidence interval (CI) 1.097–1.715], $P = 0.006$], triple immunosuppression [3.197 (1.714–5.96), $P = 0.000$] and eGFR

Table 1. Clinical characteristics of patients according to IgG anti-RBD SARS-CoV-2 status after inactivated SARS-CoV-2 or BNT162b2 mRNA vaccine

Variable	IgG anti-RBD SARS-CoV-2		Total	P-value
	Negative	Positive		
N, (%)	204 (71)	80 (29)	284 (100)	
Type of vaccine, n (%)				
Inactivated SARS-CoV-2	179 (87.7)	66 (82.5)	245 (86.3)	0.335
mRNA BNT162b2	25 (12.5)	14 (17.5)	39 (17.3)	
Age years, median (IQR)	56 (45–73)	52 (39–72)	55 (43–72)	0.039
Sex, men n (%)	119 (59.5)	46 (58)	165 (59)	0.759
Comorbidities, n (%)				
Stroke	7 (4.5)	1 (1.8)	8 (3.8)	0.369
Ischaemic heart disease	17 (11)	4 (7.3)	21 (10)	0.433
Peripheral arteriopathy	4 (2.6)	0 (0)	4 (1.9)	0.229
Diabetes mellitus, n (%)	61 (30.2)	16 (20.3)	77 (27.4)	0.093
BMI	26.3 (23.1–35)	25.3 (22.3–35.2)	26 (22–35)	0.187
Type of transplant, n (%)				
Kidney	194 (95)	78 (98)	272 (95)	0.365
Kidney-pancreas	10 (5)	2 (2)	12 (4.2)	
Time of transplant months, median (IQR)	57 (29–221)	76 (37–263)	61 (32–230)	0.061
Patients in the first year of transplant, n (%)	19 (9.4)	7 (8.9)	26 (9.3)	0.887
Triple immunosuppression, n (%)	167 (82.7)	48 (68.8)	215 (76.5)	0.000
Antimetabolite, n (%)				0.000
None	19 (9.5)	21 (25.6)	40 (14.3)	
Mycophenolate	178 (88.6)	48 (60.8)	226 (80.7)	
Azathioprine	4 (2)	10 (12.7)	14 (5)	
Calcineurin inhibitors, n (%)				0.023
None	5 (2.5)	8 (10.1)	13 (4.6)	
Tacrolimus	166 (82.2)	60 (75.9)	226 (80.4)	
Cyclosporine	31 (15.3)	11 (13.9)	42 (16.9)	
Prednisone, n (%)	192 (95)	71 (89.9)	263 (93.6)	0.111
Everolimus, n (%)	18 (9)	22 (27.8)	40 (14.3)	0.000
Rituximab, n (%)	3 (1.5)	0 (0)	3 (1.1)	0.274
Thymoglobulin, n (%)	29 (14.6)	9 (11.4)	38 (13.7)	0.477
Rejection in last 3 months, n (%)	6 (3)	2 (2)	8 (2.9)	0.838
Lymphocyte count, cells/ μ L, median (IQR)	1900 (1400–3696)	2213 (1740–4200)	2000 (1454–3820)	0.09
Serum creatinine μ mol/L, median (IQR)	124 (101–1414)	112 (91–241)	120 (97–352)	0.020
eGFR mL/min/1.73 m ² , mean \pm SD	50.3 \pm 23	58.4 \pm 22	52 \pm 22	0.011

BMI, body mass index; triple immunosuppression, antimetabolite + calcineurin inhibitor + prednisone.

Table 2. Binary logistic regression model of predictors of negative humoral response 30 days after two doses of inactivated SARS-CoV-2 or BNT162b2 mRNA vaccine

Predictor	Odd ratio	95% CI	P-value
Immunosuppression			
Other	Ref		
Triple immunosuppression	3.197	1.714–5.962	0.000
Age, per 10 years old	1.372	1.097–1.715	0.006
eGFR			
≥ 60 mL/min/1.73 m ²	Ref		
< 60 mL/min/1.73 m ²	2.184	1.243–3.838	0.007
Time after KT, per year	0.996	0.992–1.000	0.034

Triple immunosuppression, antimetabolite + calcineurin inhibitor + prednisone.

< 60 mL/min/1.73 m² [2.18 (1.24–23.83), $P = 0.007$], whereas time post-KT was negatively associated with negative humoral response [0.996 (0.992–1)] (Table 2).

The most frequent adverse event with each vaccine dose was pain at the site of injection, with significant difference between platforms (24% CoronaVac® and 48% mRNA, $P < 0.05$). Other less

frequent events were headache, arthralgia, myalgia and pruritus, without difference in frequency comparing the first with the second dose. There were no severe side-effects reported in this cohort (Figure 2).

DISCUSSION

Prior studies have shown low seroconversion after two doses of mRNA and viral vector-based vaccines [6–23]. To our knowledge, this is the first study that analyses the humoral response after two doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine in KT patients. Only 29% of KT recipients had antibody response against SARS-CoV-2 vaccine, in contrast to 100% of healthy controls. There was no difference in seroconversion between the two vaccine platforms analysed. Nonetheless, mean antibody titres were higher with mRNA-based vaccine than with inactivated SARS-CoV-2 platform.

These findings agree with previous studies that report a seroconversion between 10% and 40% with mRNA-based vaccine [6–8, 17–23]. In concordance with other studies, mean antibody titres in KT patients were up to 10 times lower than healthy controls [17]. There is only one study that

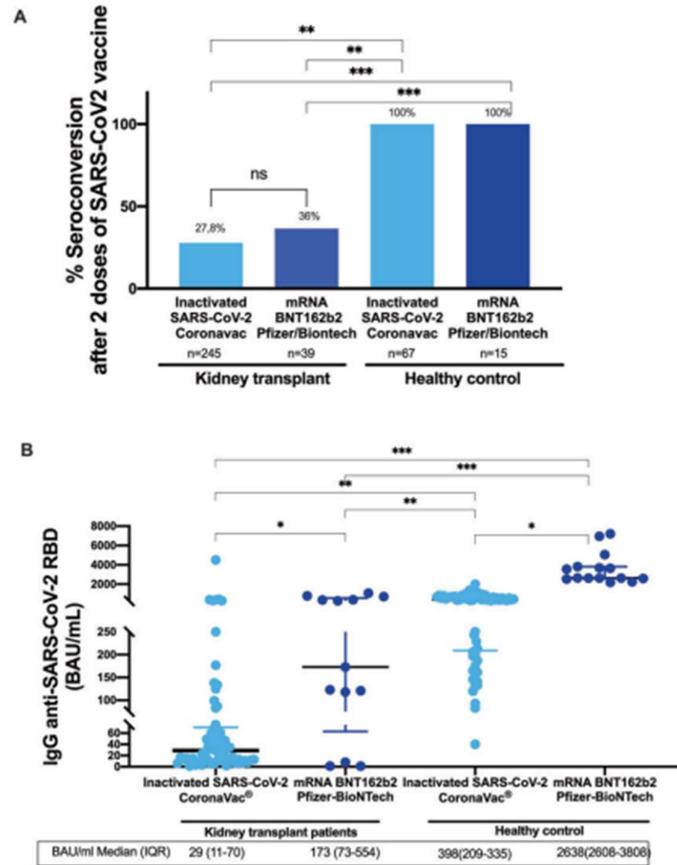


FIGURE 1: Serological response after two doses of inactivated SARS-CoV-2 or BNT162b2 mRNA vaccine in kidney transplant patients and healthy control. (A) Percentage of seroconversion. (B) IgG anti-RBD SARS-CoV-2 titres (BAU/mL) in patients with seroconversion. *P < 0.05 mRNA versus inactivated SARS-CoV-2, **P < 0.05 versus inactivated SARS-CoV-2 in healthy control, ***P < 0.05 versus BNT162b2 mRNA in healthy control. ns, not significant.

compares antibody titres between two different vaccine platforms in KT patients, showing enhanced humoral responses with BNT162b2 mRNA-based compared with ChAdOx1-based vaccine. The clinical significance of this finding should be further evaluated [8].

The most important risk factors for no serological response to vaccines are associated with net immunosuppression such as age, triple immunosuppression, tacrolimus and mycophenolate, low lymphocyte count and eGFR.

Our results provide additional evidence of a weak immune response with two different vaccine platforms. To reinforce immunity, higher and/or supplemental booster doses are the more common solutions. Recently, it has been reported that a third and a fourth dose of BNT162b2 mRNA to SOT recipients improved immunogenicity [30–32]. There is growing evidence that combination of different platforms enhanced immunity [33].

A potential bias for this study was the criteria to receive each platform vaccine in Uruguay. BNT162b2 mRNA-vaccinated

group had small size and included healthcare workers from all ages and patients older than 70 years. However, since most patients were vaccinated with inactivated virus vaccine, this work contributes to understanding the humoral response after inactivated SARS-CoV-2 vaccine in KT population. Another drawback of this work could be the absence of anti-RBD IgGs determination before vaccination in these patients.

In conclusion, we report a weak humoral response after two doses of inactivated SARS-CoV-2 or BNT162b2 mRNA vaccine in KT recipients (29% of seroconversion). IgG antibody titres in KT were 10 times lower than healthy controls, even though they were higher with mRNA vaccine. Further study is needed to determine the impact of COVID-19 in these patients. Different strategies could improve immunogenicity, such as additional doses or a combination of platforms [30–32, 34, 35]. Based on these findings, we strongly recommend that all transplant recipients should continue with the non-pharmacological protection measures, including masks, hand hygiene and social distancing.

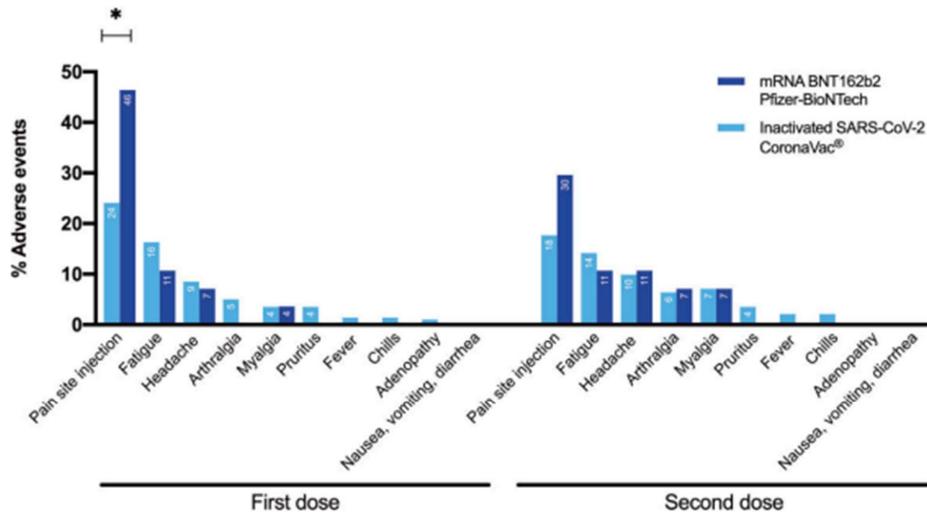


FIGURE 2: Side effects with first and second dose of inactivated SARS-CoV-2 or BNT162b2 mRNA vaccine. *P < 0.05 mRNA versus inactivated SARS-CoV-2.

FUNDING

This work was supported by: Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM, COF 03/11); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay; and Fondo de Investigación en Nefrología (FOINE), Hospital de Clínicas, Uruguay. This protocol was approved by Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República Ethics Committee.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on reasonable request from the corresponding author S.B., or M.S. The data are not publicly available due to restrictions for containing information that could compromise the privacy of research participants.

REFERENCES

- Cravedi P, Mothi SS, Azzi Y et al. COVID-19 and kidney transplantation: results from the TANGO International Transplant Consortium. *Am J Transplant* 2020; 20: 3140–3148
- Hilbrands LB, Duivenvoorden R, Vart P et al. COVID-19-related mortality in kidney transplant and dialysis patients: results of the ERACODA collaboration. *Nephrol Dial Transplant* 2020; 35: 1973–1983
- Crespo M, Mazuecos A, Rodrigo E et al. Respiratory and gastrointestinal COVID-19 phenotypes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2020; 104: 2225–2233
- Elias M, Pievani D, Randoux C et al. COVID-19 infection in kidney transplant recipients: disease incidence

- and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31: 2413–2423
- Jager KJ, Kramer A, Chesnaye NC et al. Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe. *Kidney Int* 2020; 98: 1540–1548
- Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA* 2021; 325: 2204–2206
- Danthu C, Hantz S, Dahlem A et al. Humoral response after SARS-Cov-2 mRNA vaccine in a cohort of hemodialysis patients and kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32: 2153
- Prendecki M, Thomson T, Candice L et al. Willicombe M in collaboration with the OSC. Comparison of humoral and cellular responses in kidney transplant recipients receiving BNT162b2 and ChAdOx1 SARS-CoV-2 vaccines. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.07.09.21260192>; preprint: not peer reviewed
- Miele M, Busà R, Russelli G et al. Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients. *Am J Transplant* 2021; 21: 2919–2921
- Marinaki S, Adamopoulos S, Degiannis D et al. Immunogenicity of SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2021; 21: 2913–2915
- Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant* 2021; 21: 2719–2726
- Hall VG, Ferreira VH, Ierullo M et al. Humoral and cellular immune response and safety of two-dose SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2021; 21: 3980
- Herrera S, Colmenero J, Pascal M et al. Cellular and humoral immune response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in

Downloaded from <https://academic.oup.com/ckj/article/15/3/527/6484820> by guest on 21 December 2022

- liver and heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2021; 21: 3971
14. Ducloux D, Colladant M, Chabannes M et al. Factors associated with humoral response after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in kidney transplant patients. *Clin Kidney J* 2021; 14: 2270–2272
 15. Bertrand D, Hanoy M, Edet S et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and in-centre and satellite centre haemodialysis patients. *Clin Kidney J* 2021; 14: 2127–2128
 16. Wijtvliet V, Ledeganck K, Peeters B et al. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated kidney transplant recipients: an issue of concern. *Clin Kidney J* 2021; 14: 2261–2262
 17. Broseta JJ, Rodríguez-Espinosa D, Rodríguez N et al. Humoral and cellular responses to mRNA-1273 and BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccines administered to hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2021; 78: 571–581
 18. Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant* 2021; 21: 2719–2726
 19. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N et al. Weak anti-SARS-CoV-2 antibody response after the first injection of an mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2021; 99: 1487–1489
 20. Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA et al. Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV2 BNT162b2 (Tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J Clin Invest* 2021; 131: e150175
 21. Rincon-Arevalo H, Choi M, Stefanski AL et al. Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Sci Immunol* 2021; 6: 1–15
 22. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N et al. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int* 2021; 99: 1498–1500
 23. Korth J, Jahn M, Dorsch O et al. Impaired humoral response in renal transplant recipients to SARS-CoV-2 vaccination with BNT162b2 (Pfizer-BioNTech). *Viruses* 2021; 13: 4–9
 24. Medina-Pestana J, Cristelli MP, Viana LA et al. Clinical impact, reactogenicity, and immunogenicity after the first CoronaVac dose in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2021; doi: 10.1097/TP.0000000000003901 (published ahead of print)
 25. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol* 2021; 21: 195–197
 26. Jara A, Undurraga EA, González C et al. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. *N Engl J Med* 2021; 385: 875–884
 27. Wilder-Smith A, Mulholland K. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* 2021; 385: 946–948
 28. Zhang Y, Zeng G, Pan H et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 181–192
 29. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2603–2615
 30. Benotmane I, Gautier G, Perrin P et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA* 2021; 326: 1063
 31. Chavarot N, Morel A, Leruez-Ville M et al. Weak antibody response to 3 doses of mRNA vaccine in kidney transplant recipients treated with belatacept. *Am J Transplant* 2021; 21: 4043
 32. Alejo JL, Mitchell J, Chiang TP-Y et al. Antibody response to a fourth dose of a SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2021; 105: e280–e281; doi: 10.1097/TP.0000000000003934
 33. Barros-Martins J, Hammerschmidt SI, Cossmann A et al. Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Nat Med* 2021; 27: 1525–1529
 34. Mossad SB. SARS-CoV-2 vaccine effectiveness trumps immunogenicity in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2021; 21: 4105
 35. Grupper A, Katchman H. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus: not alarming, but should be taken gravely. *Am J Transplant* 2021; 21: 2909

Publicación 3

“Humoral Response to Heterologous SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Patients Is Heterogeneous and Dose Dependent”

Mariana Seija*, Florencia Rammauro*, Javier Noboa, José Santiago, Natalia Orihuela, Catherine Zulberti, Danilo Machado, Cecilia Recalde, Rossana Astesiano, Federico Yandián, Victoria Frantchez, Ana Guerisoli, Álvaro Morra, Daniela Cassinelli, Cecilia Coelho, Belén de Aramburu, Paulina González-Severgnini, Romina Moreno, Aldana Pippolo, Gabriela López, Mónica Lemos, Lorena Somariva, Eliana López, Soledad Fumero, Carla Orihuela, Ana Laura Suárez, Rosalía Rodríguez, Gonzalo Acuña, Victoria Rabaza, Nancy Perg, Rossana Cordero, Cristina Reifeld, Paula Olivera, Paola Montero, Cecilia Nogueira, Catheryn Nalerio, Sergio Orihuela, Lilián Curi, Ema Bugstaller, Otto Pritsch, Marcelo Nin, Oscar Noboa & Sergio Bianchi.

Resumen

La vacunación ha mostrado ser un pilar fundamental para combatir la pandemia contra COVID-19. Los trasplantados renales presentan una respuesta inmunológica disminuida frente a la administración de dos dosis de vacunas contra SARS-CoV-2, lo que se acompañó de reportes de infecciones graves en esta población. Basado en esta evidencia se ha recomendado la administración de dosis de refuerzo. Resultados previos del grupo de trabajo habían mostrado que solo se podía detectar la presencia de anticuerpos en un 27,8% y 36,5% de los trasplantados renales, luego de la vacunación con dos dosis de CoronaVac y BNT162b2, respectivamente. En este trabajo analizamos la respuesta de anticuerpos inducida frente a la administración de una tercera dosis de refuerzo con BNT162b2 en trasplantados renales inmunizados previamente con BNT162b2, y a una tercera y cuarta dosis de refuerzo con esta vacuna en aquellos previamente vacunados con CoronaVac. Solo se incluyeron pacientes de los cuales se disponía de todas las muestras y que no tenían diagnóstico previo de COVID-19, a los cuales se les analizaron los niveles de anticuerpos IgG específicos contra RBD en suero mediante ELISA, 30 días luego de las dos dosis y después de cada dosis de refuerzo. Los pacientes fueron clasificados en cuatro grupos de acuerdo con el número de dosis que fueron necesarias para detectar presencia de anticuerpos. Luego de la vacunación homóloga con 3 dosis y la vacunación heteróloga con 4 dosis, se detectó la presencia de anticuerpos en un 70,6% y 71,7% de los pacientes, respectivamente. Los pacientes en los cuales se detectó anticuerpos luego de la

segunda dosis alcanzaron niveles mayores luego de las dosis de refuerzo. El tratamiento con micofenolato de mofetilo y un menor tiempo desde el trasplante se asociaron con la no respuesta en los trasplantados renales.

Resultados

- Al finalizar los esquemas de vacunación heteróloga y homóloga, un 71,7% y 70,6% de los pacientes, respectivamente, presentaba niveles de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 mayores a 10 BAU/ml.
- Globalmente, la seroconversión luego de dos dosis de vacuna fue del 26%, y esto mejoró un 31,2% adicional luego de una tercera dosis (un 30,4% en el régimen de vacunación heteróloga y un 34,7% en el de vacunación homóloga). En el régimen de vacunación heteróloga un 21% de los pacientes mostraron seroconversión luego de la cuarta dosis con BNT162b2.
- Dentro del grupo de pacientes que no presentaban anticuerpos detectables al finalizar los esquemas de vacunación una alta proporción de los mismos estaban bajo tratamiento con micofenolato de mofetilo (96,7% vs. 45%, 85% y 87% en los grupos -2D, -3D y -4D, respectivamente, $p=0,000$), y, aunque no estadísticamente significativo, presentaban menor tiempo transcurrido desde el trasplante (45 meses de media vs. 113, 84 y 68 meses en 2D, 3D y 4D, respectivamente, $p=0,415$) y menor recuento linfocitario (1900/ μ l media vs. 2400, 2010 y 2600/ μ l en 2D, 3D y 4D, respectivamente, $p=0,415$).
- Los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD específicos alcanzados al finalizar la inmunización dependieron del número de dosis necesarias para la seroconversión, siendo significativamente mayores en el grupo que seroconvirtió después de dos dosis (2D) vs. 3D y 4D, para todos los puntos de medida, en ambos esquemas de vacunación.
- En el régimen heterólogo los anticuerpos IgG anti-RBD aumentaron con cada dosis, observándose un aumento de 14 veces luego de la tercera dosis y 1,7 veces luego de la cuarta dosis para el grupo 2D. En el régimen de vacunación

homóloga los niveles de anticuerpos aumentaron 5,5 veces luego de la tercera dosis.

- Cuando se comparan ambos regímenes de vacunación luego de la tercera dosis, la respuesta de anticuerpos con el esquema heterólogo parece ser mayor que con el homólogo (2682 BAU/ml [IQR 1741-4460] vs. 1225 BAU/ml [IQR 724-2627], $p=0,158$, en el grupo 2D, y 186 BAU/ml [IQR 61-624] vs. 37 BAU/ml [18-188], $p=0,074$, en el grupo 3D), aunque las diferencias no son significativas.
- En un análisis multivariado, las variables asociadas a niveles de anticuerpos por debajo de 264 BAU/ml luego de la vacunación, ya sea homóloga o heteróloga, fueron el uso de micofenolato de mofetilo y el tiempo transcurrido desde el trasplante.
- Solamente los pacientes del grupo 2D alcanzan, luego de la tercera o cuarta dosis, niveles de anticuerpos comparables con los que se encuentran luego de dos dosis con BNT162b2 en el grupo control.

Humoral Response to Heterologous SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Patients Is Heterogeneous and Dose Dependent

Mariana Seija^{1,2,11}, Florencia Rammauro^{3,4,11}, Javier Noboa^{1,4}, José Santiago¹, Natalia Orihuela⁵, Catherine Zulberti⁵, Danilo Machado⁶, Cecilia Recalde⁶, Rossana Astesiano¹, Federico Yandián¹, Victoria Frantchez⁷, Ana Guerisoli¹, Álvaro Morra⁵, Daniela Cassinelli⁸, Cecilia Coelho⁸, Belén de Aramburu⁸, Paulina González-Severgnini⁸, Romina Moreno⁸, Aldana Pippolo⁸, Gabriela López⁹, Mónica Lemos⁹, Lorena Somariva⁹, Eliana López⁹, Soledad Fumero⁹, Carla Orihuela⁹, Ana Laura Suárez², Rosalía Rodríguez⁶, Gonzalo Acuña⁶, Victoria Rabaza⁶, Nancy Perg⁶, Rossana Cordero⁶, Cristina Reifeld⁶, Paula Olivera⁶, Paola Montero⁶, Cecilia Nogueira⁶, Catheryn Nalerio⁵, Sergio Orihuela⁵, Lilián Curi⁵, Ema Bugstaller⁶, Otto Pritsch^{3,4}, Marcelo Nin^{1,5}, Oscar Noboa¹ and Sergio Bianchi^{2,10}

¹Centro de Nefrología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁵Centro de Trasplante INU, Hospital Italiano, Montevideo, Uruguay; ⁶Centro de Trasplante, Hospital Evangélico, Montevideo, Uruguay; ⁷Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁸Students of Scientific Methodology, Medical Doctor Degree, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁹Departamento de Enfermería, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; and ¹⁰Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Correspondence: Sergio Bianchi, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Italia s/n, Montevideo 11600, Uruguay. E-mail: sbianchi@fmed.edu.uy

¹¹MS and FR contributed equally to this work.

Received 6 April 2022; revised 29 April 2022; accepted 2 May 2022

Kidney Int Rep (2022) ■, ■-■; <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.05.005>

KEYWORDS: COVID-19; SARS-CoV-2 vaccine; transplantation

© 2022 International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Vaccination is the cornerstone in the fight against the ongoing COVID-19 pandemic.^{1–5} Kidney transplant recipients (KTRs) had a weak immunologic response after 2 doses of either vaccine scheme.^{1–3, S1–S9} Severe COVID-19 breakthrough infection has been reported in KTR with 2 doses of mRNA vaccine.^{3, S10, S11} On the basis of these data and evidence that boosters improve immunogenicity, international societies recommended a third dose in KTR and recently a fourth dose in a case-by-case basis.^{4–8, S12–S14}

Different methods to assess immune response after vaccines, such as humoral and T cell function, have been used. However, many of these studies cannot be compared because of the lack of standardized assays.⁹ The World Health Organization International recommended standardization of antibody measurement by

using binding antibody units per milliliter (BAU/ml) for binding serologic tests.^{5,9} A cutoff value of 264 BAU/ml anti-receptor binding domain (RBD) IgG had been correlated with protection of symptomatic disease in the healthy population,^{5,15} whereas Barrière *et al.*^{5,16} proposed a 3-zone classification of anti-SARS-CoV-2 antibody levels for patients with cancer: a group of nonresponders with specific antibody levels <40 BAU/ml, a group that responds to vaccines with levels >260 BAU/ml, and a third area of uncertainty between these 2 values. Although they may be approximate values, the idea of this kind of classification can also be useful for its application in KTR patients.

We are carrying on a multicenter, prospective, observational study for monitoring anti-SARS-CoV-2 specific IgG in KTR.¹ Here, we present a second report

ARTICLE IN PRESS

RESEARCH LETTER

Table 1. Clinical characteristics of patients according to the number of doses to achieve seroconversion after 3D homologous and 4D heterologous SARS-CoV-2 vaccinations

Variables	Seroconversion achieved after SARS-CoV-2 vaccination				Total	P value
	2D After 2 doses	3D After first booster	4D After second booster	No seroconversion		
<i>n</i> (%)	29 (26.6)	35 (31.2)	15 (13.8)	31 (28.4)	109 (100)	
Vaccine scheme						
Heterologous, <i>n</i> (%)	23 (79)	28 (82.5)	15 (100)	26 (84)	92 (84)	0.326
Homologous, <i>n</i> (%)	6 (21)	6 (17.5)	—	5 (16)	17 (16)	
Age, yr, median (IQR)	55 (40–62)	54 (45–77)	59 (54–65)	54 (45–77)	58 (45–72)	0.245
Sex, men, <i>n</i> (%)	17 (57)	25 (73)	8 (28)	18 (62)	68 (64)	0.564
Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	3 (10)	8 (23)	6 (40)	7 (23)	24 (22)	0.160
Type of transplant, <i>n</i> (%)						
Kidney	28 (97)	33 (97)	15 (100)	30 (90)	106 (98)	0.687
Kidney-pancreas	1 (3)	1 (3)	—	—	2 (2)	
Time of transplant, mo, median (IQR)	113 (30–148)	84 (32–174)	68 (34–155)	45 (32–112)	68 (32–146)	0.415
Patients in the first year of transplant, <i>n</i> (%)	2 (7)	2 (6)	1 (7)	2 (7)	7 (7)	0.998
Triple immunosuppression, <i>n</i> (%)	17 (59)	22 (65)	11 (73)	26 (87)	76 (71)	0.097
Antimetabolite, <i>n</i> (%)						0.000
None	10 (35)	4 (12)	1 (7)	1 (3)	16 (15)	
Mycophenolate	13 (45)	28 (85)	13 (87)	29 (96.7)	83 (78)	
Azathioprine	6 (20)	1 (3)	1 (7)	0 (0)	8 (7)	
CNI, <i>n</i> (%)						0.312
None	3 (11)	5 (15)	1 (7)	1 (3.3)	10 (9)	
Tacrolimus	23 (79)	22 (65)	9 (60)	25 (83)	79 (73)	
Cyclosporine	3 (10)	7 (21)	5 (33)	4 (13)	19 (17)	
Prednisone, <i>n</i> (%)	28 (97)	32 (94)	13 (87)	28 (96)	101 (94)	0.654
Everolimus, <i>n</i> (%)	10 (35)	10 (30)	1 (6.7)	1 (3)	22 (21)	0.006
Rituximab, <i>n</i> (%)	0	2 (6)	0	0	2 (2)	0.224
Thymoglobulin, <i>n</i> (%)	15 (47)	5 (15)	3 (20)	6 (21)	19 (18)	0.931
Rejection in last 3 mo, <i>n</i> (%)	0	0	1 (6.7)	0	8 (2.9)	0.103
Lymphocyte count, cells/μl, median (IQR)	2400 (1800–2552)	2010 (1560–2570)	2600 (1800–3440)	1900 (1288–2286)	2108 (1560–2600)	0.073
Lymphocyte count < 1400 cells/μl, <i>n</i> (%)	2 (7)	6 (18)	3 (20)	10 (36)	21 (20)	0.058
Serum creatinine, μmol/l, median (IQR)	109 (90–134)	113 (96–141)	114 (87–122)	119 (87–138)	114 (92–134)	0.886
eGFR ml/min per 1.73 m ² , mean ± SD	62 ± 18	56 ± 21	59 ± 17	57 ± 20	58 ± 19	0.661
IgG anti-RBD SARS-CoV-2 (BAU/ml), median (IQR)						
After 2D	42 (23–173)	0	0	0	0 (0–8)	0.000
After 3D	2453 (1255–3505)	179 (41–412)	0	2.5	25 (0–1770)	0.000
After 4D	4659 (2778–13,394)	621 (254–1913)	74 (33–283)	0	254 (7–2775)	0.000

2D, 2 doses; 3D, 3 doses; 4D, 4 doses; CNI, calcineurin inhibitor; eGFR, estimated glomerular filtration rate using CKD-EPI Formula; IQR, interquartile range; RBD, receptor binding domain; triple immunosuppression: antimetabolite + calcineurin inhibitor + prednisone. Homologous vaccination: 3 doses of BNT162b2 mRNA vaccine 30 days apart; heterologous vaccination: 2 doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) and 2 BNT162b2 mRNA boosters 30 days apart. Lymphocyte counts were assessed previous to vaccination. The threshold to define seroconversion was 10 BAU/ml (black dotted line).

on antibody levels after 4 doses of heterologous vaccination and 3 doses of homologous scheme stratified by the number of doses required to achieve seroconversion compared with healthy control.

In Uruguay, 90% of KTRs received inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac, Sinovac Biotech Ltd., Beijing, People’s Republic of China) and 10% BNT162b2 mRNA (Pfizer, Manhattan, NY/BioNTech, Mainz, Germany), the most used vaccines worldwide, according to definitions of the Ministry of Public Health (details in the [Supplementary Material](#)). After the demonstration that only 29% of KTR seroconverted,¹ the Ministry of Public Health approved heterologous and homologous booster/s in all KTRs, irrespectively of seroconversion status. The heterologous vaccination group received 2

doses of inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac) and 2 BNT162b2 mRNA boosters 30 days apart, and the homologous vaccination group received 3 doses of the BNT162b2 mRNA vaccine ([Supplementary Figure S1](#)).

Among all 1400 KTRs in follow-up in Uruguay (90% received 2 doses of CoronaVac and 10% 2 doses of mRNA-based vaccines), all were invited to participate in the study. Of these, 289 patients accepted to participate and were enrolled to study immunologic response to SARS-CoV-2 after 2 doses of vaccines.¹ From this initial cohort, we only included for the present analysis patients who had blood samples available after 30 days of 2 initial doses and boosters according to the vaccination scheme (heterologous *n* = 92; homologous *n* = 17). A total of 180 patients who did

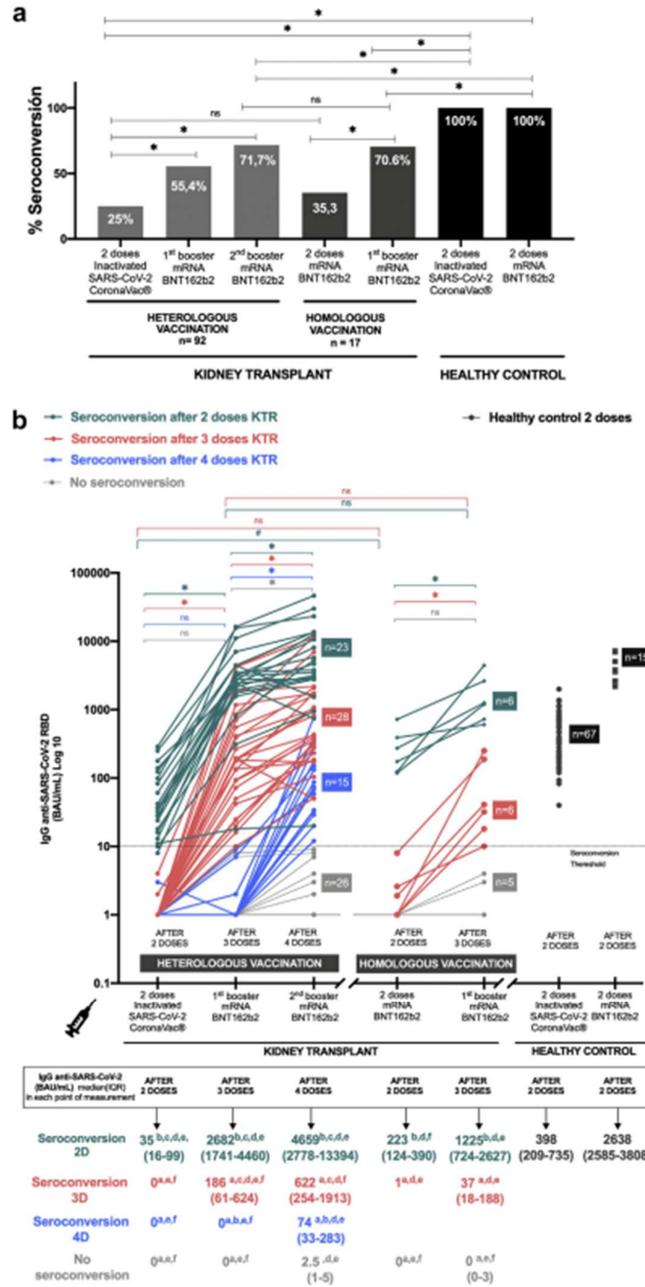


Figure 1. Serologic response after 3D-homologous and 4D-heterologous SARS-CoV-2 vaccination in KTRs. (a) Percentage of seroconversion. * $P < 0.05$. (b) Anti-RBD SARS-CoV-2 IgG levels (BAU/ml) according to the number of doses to achieve seroconversion. Friedman test and Bonferroni correction were used for paired analysis within each seroconversion group (green: seroconversion-2D; pink: seroconversion-3D; blue: seroconversion-4D; gray: no seroconversion), * $P < 0.05$. Comparison between homologous and heterologous vaccination was performed in seroconversion groups 2D and 3D in each point of measurement with Mann-Whitney, * $P < 0.05$. In each point of antibody measurement, Kruskal-Wallis test and Bonferroni *post hoc* test were used to compare between seroconversion and control groups. Pairwise analysis at each point of measurement (after 2 doses, 3 doses, and 4 doses of vaccine): ^a $P < 0.05$ versus seroconversion 2D group; ^b $P < 0.05$ versus seroconversion 3D group; ^c $P < 0.05$ versus seroconversion 4D; ^d $P < 0.05$ versus no seroconversion; ^e $P < 0.05$ versus control (continued)

RESEARCH LETTER

not have all the samples available were excluded. Patients included in the study had no prior confirmed COVID-19 diagnosis until homologous or heterologous vaccination scheme was completed.

All individuals declared not to have had any sign or symptom compatible with COVID-19 before vaccination. All patients underwent serologic testing for anti-RBD specific IgG 30 days after 2 initial doses and posteach booster. Patients were stratified into the following 4 groups according to the number of doses required to achieve seroconversion: seroconversion achieved after 2 doses (seroconversion-2D), 3 doses (seroconversion-3D), 4 doses (seroconversion-4D), and no seroconversion. In addition, a subanalysis between homologous or heterologous vaccine schemes was performed. Control group was constituted of 82 healthy individuals, fully vaccinated, with 2 doses of CoronaVac or BNT162b2 between April 1 and May 31, according to the recommendations of the Uruguayan National Health Authority considering age and comorbidities. No specific anti-RBD IgG antibodies were found before vaccination in the serum samples of the healthy control group (baseline seronegative). We do not have information on this regard in the KTR group. Seroconversion was defined as anti-RBD-SARS-CoV-2 specific IgG >10 BAU/ml.

Baseline patients' characteristics according to seroconversion groups are detailed in Table 1 and according to vaccine scheme in Supplementary Tables S1 and S2. Seroconversion after 2 doses was 26% globally, and it improved an additional 31.2% with the third dose (30.4% heterologous and 34.7% homologous vaccination, respectively) (Figure 1a). In the heterologous regimen, 21% of the patients seroconverted after the fourth dose of BNT162b2 mRNA (Figure 1a). At the end of heterologous and homologous vaccination, 71.7% and 70.6% of the patients seroconverted, respectively. In the seronegative group, a greater proportion of patients were treated with mycophenolate (96.7% vs. 45%, 85% and 87% in Seroconversion-2D, -3D, and -4D groups: respectively, $P = 0.000$) (Table 1); they also had less time since transplantation (median of 45 months vs. 113, 84, and 68 months in Seroconversion-2D, -3D, and -4D, respectively, $P = 0.415$) and lower lymphocyte count (median 1900/ μ l vs. 2400, 2010, and 2600/ μ l in Seroconversion-2D, -3D, and -4D, $P = 0.415$), statistically nonsignificant.

Serum levels of anti-RBD IgGs depend on the number of doses to achieve seroconversion (Figure 1b; green, pink, blue, and gray). Anti-RBD IgG serum levels were significantly higher in the Seroconversion-2D group (Figure 1b; green) in comparison with Seroconversion-3D and -4D (Figure 1b; pink and blue) at the 3-time point measurement (after 2, 3, and 4 doses) in both vaccine schedules.

In the heterologous regimen, anti-RBD IgG increased with each dose. For example, in the Seroconversion-2D-group, we observed a 14-fold after the third dose and 1.7 after the fourth dose (from a median of 186 to 2682 and 4659 BAU/ml respectively, $P = 0.000$). Meanwhile, with the homologous scheme, antibody titer increased only 5.5-fold after the third dose (from a median of 223 to 1225 BAU/ml, $P = 0.000$).

A comparison between the heterologous and homologous schemes at each point of measurement can be found in Figure 1b. Antibody levels were higher in patients after 2 doses of BNT162b2 mRNA than with 2 doses of CoronaVac (median 223 BAU/ml [interquartile range (IQR) 124–390] vs. 35 BAU/ml [IQR 16–99], $P = 0.003$). After the third dose of the heterologous scheme, the antibody response was enhanced compared with the homologous (seroconversion 2D, median 2682 [IQR 1741–4460] vs. 1225 BAU/ml [724–2627], $P = 0.158$ and in seroconversion 3D group median 186 BAU/ml [IQR 61–624] and 37 BAU/ml [IQR 18–188], $P = 0.074$). Although not significant, these differences have a tendency to be considered when defining possible booster dose regimens.

Only patients in the seroconversion-2D group after the third and fourth doses in heterologous vaccination achieved antibody titers comparable with 2 doses of BNT162b2 mRNA in the healthy group. Meanwhile, only 26.7% of patients with seroconversion after the fourth dose have levels of antibody >264 BAU/ml (Supplementary Figure S2 and Supplementary Material).

In multivariate analysis, variables associated with low antibody level (<264 BAU/ml) after heterologous or homologous vaccination were mycophenolate and time post-KT (Supplementary Table S3). We used antibody level of 264 BAU/ml, suggested by other authors as a correlate of protection in healthy individual^{S15} and KTR,^{S17} to compare the number of patients in each group that reached this level, making it easier to visualize the response to vaccines. We are not

Figure 1. (continued) group vaccinated with inactivated SARS-CoV-2; [†] $P < 0.05$ versus control group vaccinated with BNT162b2 mRNA. Homologous vaccination: 3 doses of BNT162b2 mRNA vaccine 30 days apart; heterologous vaccination: 2 doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) and 2 BNT162b2 mRNA boosters 30 days apart. Healthy control received 2 doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) or 2 doses of BNT162b2 mRNA vaccine 28 days apart. Threshold to define seroconversion was 10 BAU/ml (black dotted line). 2D, 2 doses; 3D, 3 doses; 4D, 4 doses; BAU, binding antibody unit; IQR, interquartile range; KTR, Kidney transplant recipient; ns, not significant; RBD, receptor-binding domain.

suggesting a specific level of anti-SARS-CoV-2 antibodies that correlates with protection in KTR. During the 5-month follow-up, 10 KTRs had COVID-19 confirmed by polymerase chain reaction during the second wave of the pandemic in Uruguay (between December 2021 and February 2022). Two rejection episodes and 1 IgA nephropathy recurrence were reported. The 2 patients with rejection belonged to the group with higher antibody titers (seroconversion-2D, heterologous: 17,413 and 3470 BAU/ml) (details in the [Supplementary Material](#) and [Supplementary Table S4](#)). No deaths were reported.

We provided data that heterologous vaccination with 4 doses induced an enhanced humoral response in KTR. Although antibody titers are highly heterogeneous, it could be predicted by taking into consideration the number of doses to achieve seroconversion. We described the following 4 different groups: seroconversion-2D, -3D, -4D, and no response associated with the magnitude of humoral immune response after vaccination. These differences in humoral response were associated with the use of mycophenolate or everolimus and time since kidney transplant.

Patients with seroconversion after 2 doses of either vaccination scheme have higher antibody titers than those who seroconverted after the third or fourth dose and were similar to healthy control after 30 days of 2 doses of mRNA vaccines.

Although nonstatistically significant, heterologous vaccination achieved higher antibody titers than homologous. In the healthy population, heterologous vaccination had a better immunologic response than homologous,^{6,S18} but in KTR, this effect cannot be found.^{S16} This difference could be since prior studies included groups of patients with heterogeneity in immunologic response.^{S19}

Potential biases for this study are the low number of patients in the homologous vaccination group; most patients were approximately 50 years old and lacked evaluation of cellular immunity.

Our results provide additional evidence of heterogeneous humoral response among KTRs after 4 doses of heterologous vaccination or 3 doses of mRNA homologous. Although there is information of response to the third and fourth dose vaccinations, as far as we know, it is the first work to study immune response after 4 doses of SARS-CoV-2 vaccines administered to every kidney transplant patient without considering seroconversion status. Patients who seroconverted after 2 doses achieved higher levels of SARS-CoV-2 antibody than those with seroconversion after the third or fourth dose and reached antibody titer similar to healthy control. Meanwhile, most patients with seroconversion after the fourth dose have low levels of antibodies.

These differences in immune response depend on mycophenolate use and time since kidney transplant. This stratification strategy according to the number of doses to achieve seroconversion could be used to personalize boosters in KTR.

Heterologous vaccination seemed to induce an enhanced humoral response compared with homologous vaccination. However, future studies with larger size groups stratified by the magnitude of humoral response are needed to settle this debate.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM, COF 03/11); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay; and Fondo de Investigación en Nefrología (FOINE), Hospital de Clínicas, Uruguay.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

[Supplementary File \(PDF\)](#)

Supplementary Methods.

Figure S1. Types of vaccination schemes and IgG anti-RBD measurement.

Figure S2. Percentage of patients with IgG anti-SARS-CoV-2 RBD above 264 BAU/ml after 4-dose heterologous and 3-dose homologous vaccination scheme.

Table S1. Clinical characteristics of patients according to number of doses to achieve seroconversion after 4-dose heterologous SARS-CoV-2 vaccination.

Table S2. Clinical characteristics of patients according to number of doses to achieve seroconversion after 3-dose homologous SARS-CoV-2 vaccination.

Table S3. Multivariate analysis for IgG anti-RBD SARS-CoV-2 < 264 BAU/ml as a surrogate of protection.

Table S4. Adverse events reported post-vaccination.

Supplementary References.

STROBE Statement.

REFERENCES

- Seija M, Rammauro F, Santiago J, et al. Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant. *Clin Kidney J.* 2021;15:527–533. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfab291>
- Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N, et al. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int.* 2021;99:1498–1500. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.04.005>
- Quiroga B, Soler MJ, Ortiz A, et al. Safety and immediate humoral response of COVID-19 vaccines in chronic kidney disease patients: the SENCOVAC study. *Nephrol Dial Transplant.* 2021;gfab313. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab313>

RESEARCH LETTER

4. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA*. 2021;326:1063. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.12339>
5. Westhoff TH, Seibert FS, Anft M, et al. A third vaccine dose substantially improves humoral and cellular SARS-CoV-2 immunity in renal transplant recipients with primary humoral nonresponse. *Kidney Int*. 2021;100:1135–1136. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.09.001>
6. Reynolds CJ, Gibbons JM, Pade C, et al. Heterologous infection and vaccination shapes immunity against SARS-CoV-2 variants. *Science*. 2022;375:eabm0811. <https://doi.org/10.1126/science.abm0811>
7. Caillard S, Thaunat O, Benotmane I, et al. Antibody response to a fourth messenger RNA COVID-19 vaccine dose in kidney transplant recipients: a case series. *Ann Intern Med*. 2022;175:455–456. <https://doi.org/10.7326/L21-0598>
8. Predecki M, Thomson T, Candice L, et al. Comparison of humoral and cellular responses in kidney transplant recipients receiving BNT162b2 and ChAdOx1 SARS-CoV-2 vaccines. medRxiv. Published July 14, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.07.09.21260192>
9. Ikizler TA, Coates PT, Rovin BH, Ronco P. Immune response to SARS-CoV-2 infection and vaccination in patients receiving kidney replacement therapy. *Kidney Int*. 2021;99:1275–1279. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.04.007>

3.3.2 Respuesta a la vacunación contra COVID-19 en receptores de trasplante de hígado

Publicación 4

“Low Immunoglobulin G Antibody Levels Against Severe Acute Respiratory Disease Coronavirus 2 After 2-Dose Vaccination Among Liver Transplantation Recipients”

Jimena Prieto*, Florencia Rammauro*, Martín López, Romina Rey, Ana Fernández, Sergio Bianchi, Solange Gerona, Julio Medina & Otto Pritsch.

Resumen

Al igual que otros grupos de individuos inmunosuprimidos, los pacientes receptores de trasplante de hígado no fueron incluidos en los ensayos clínicos de las vacunas contra COVID-19, por lo que su eficacia en este grupo era desconocida. Unos pocos reportes disponibles mostraban una respuesta humoral disminuida luego de la administración de vacunas contra SARS-CoV-2 basadas en ARNm en RTOS, particularmente en trasplantados renales. En trasplantados hepáticos (TH), un trabajo pionero mostró que solo un 47,5% de estos pacientes desarrollaban anticuerpos anti-SARS-CoV-2 específicos 2 o 3 semanas luego de dos dosis de BNT162b2³⁹². Qué sucedía en respuesta a vacunas a virus inactivado en este grupo era totalmente desconocido. En este trabajo comparamos la respuesta de anticuerpos desarrollada por trasplantados hepáticos con un grupo control luego de la vacunación completa con la vacuna a virus inactivado CoronaVac o BNT162b2. Para esto se realizó un estudio transversal en el cual se analizó la respuesta de IgG específicas anti-RBD de SARS-CoV-2 empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA, transcurridos al menos 15 días desde la vacunación completa con BNT162b2 o CoronaVac. Se incluyeron un total de 85 pacientes registrados en el Programa Nacional de Trasplante Hepático de Uruguay sin diagnóstico previo de COVID-19, y 44 individuos no trasplantados utilizados como población control. Luego de la vacunación, globalmente, un 41,2% de los pacientes trasplantados presentaron niveles detectables de anticuerpos específicos anti-RBD, comparado con un 100% en la población control. La proporción de respondedores fue significativamente mayor entre los trasplantados hepáticos que recibieron BNT162b2, comparado con los que recibieron CoronaVac. Los niveles de anticuerpos fueron

significativamente menores en los pacientes trasplantados comparado con la población control, para ambas vacunas. Sin embargo, igual que lo que ocurre en el grupo control, los trasplantados hepáticos vacunados con BNT162b desarrollaron niveles de anticuerpos anti-RBD significativamente mayores que los inmunizados con CoronaVac. El único parámetro que se asoció de manera significativa con la no respuesta a la vacunación en este grupo fue una tasa de filtrado glomerular disminuida (<60 mg/ml). Encontrarse en el primer año luego del trasplante también parece impactar de manera negativa en la respuesta, pero no se encontraron diferencias significativas. Este trabajo, en conjunto con el realizado sobre receptores de trasplante renal en nuestro país, sustentaron la necesidad de aplicar dosis vacunales de refuerzo en los grupos de pacientes inmunocomprometidos.

Resultados

- La tasa global de detección de IgG específicas anti-RBD luego de la vacunación entre los trasplantados hepáticos fue de 41,2% (35/85), con diferencias dependiendo de la vacuna utilizada. La tasa de seroconversión fue significativamente mayor entre los trasplantados que recibieron BNT162b2 comparado con los que recibieron CoronaVac, 72,7% (8/11) vs. 36,5% (27/74) $p=0,045$, respectivamente. En el grupo control el 100% de los participantes presentaron anticuerpos específicos luego de la vacunación, para ambas vacunas.
- Los niveles de anticuerpos fueron significativamente más altos en los trasplantados hepáticos que fueron inmunizados con BNT162b2 comparado con los que recibieron CoronaVac, 66 BAU/ml [IQR 5-321] vs. 2 BAU/ml [IQR 1-18.5] $p=0,005$, respectivamente, algo similar a lo observado en el grupo control.
- Cuando se los compara con el grupo control, los trasplantados hepáticos mostraron niveles significativamente más bajos de IgG anti-RBD, para ambas vacunas, 2 BAU/ml vs. 190 BAU/ml en el grupo control ($p<0,001$) para CoronaVac, y 66 BAU/ml vs. 1355 BAU/ml ($p<0,001$) para BNT162b2.
- Una reducción en el filtrado glomerular (<60 mg/dl) se asoció al grupo de trasplantados que no presentaron anticuerpos detectables luego de la vacunación ($p<0,001$). Y, aunque sin significancia estadística, los pacientes

vacunados durante el primer año desde que recibieron el trasplante presentaron una tasa de seroconversión menor, lo cual puede estar asociado a un nivel mayor de inmunosupresión durante este período.

Low Immunoglobulin G Antibody Levels Against Severe Acute Respiratory Disease Coronavirus 2 After 2-Dose Vaccination Among Liver Transplantation Recipients

TO THE EDITOR:

Liver transplantation (LT) recipients (LTRs) were not included in severe acute respiratory disease coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine registration trials, and therefore the clinical efficacy of the different vaccines for this group of patients who are immunosuppressed is not yet known. Recent work has demonstrated a reduced humoral immune response after administration of SARS-CoV-2 messenger RNA (mRNA)-based vaccines to solid organ transplantation recipients (SOTRs),⁽¹⁻³⁾ especially in kidney transplantation recipients. However, there is still not enough information regarding the use of different vaccine platforms in LTRs. Recently, Rabinowich et al.⁽⁴⁾ reported that only 47.5% of LTRs vaccinated with BNT162b2 (Pfizer-BioNTech, New York, NY, USA)

developed specific anti-SARS-CoV-2 antibodies 2 or 3 weeks after the second dose administration. However, Strauss et al.⁽⁵⁾ reported that LTRs vaccinated with 2 doses of SARS-CoV-2 mRNA-based vaccines developed a much more robust humoral response compared with other SOTRs.

Development of a robust humoral response against different vaccine platforms in LTRs remains an open question. In this work, we compared anti-SARS-CoV-2 antibody response in a study group of LTRs and a healthy control group after the 2-dose series of either inactivated virus CoronaVac (Sinovac Life Sciences Co., Beijing, China) or BNT162b2 vaccines.

Patients and Methods

We conducted a cross-sectional study to analyze the specific immunoglobulin G (IgG) response directed against the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein after full vaccination with BNT162b or CoronaVac.

A total of 85 LTRs registered in the National Liver Transplantation Programme of Uruguay were included with the following criteria: aged >18 years, no clinical criteria of previous disease or polymerase chain reaction confirmation for SARS-CoV-2 infection, and fully vaccinated with either the BNT162b2 (n = 11) or CoronaVac (n = 74) vaccines. The median time between LT and vaccine administration was 4 years (interquartile range [IQR], 2-8 years; range, 1 month-24 years). The distribution by type of vaccine was based on the guidelines defined by the national health authority, according to age groups, risk groups, and vaccine availability at the beginning of the vaccination program. A total of 44 healthy individuals belonging to the staff of a research institution were included in the control group with the following criteria: aged >18 years, no clinical history of coronavirus disease

Abbreviations: BAU, binding antibody units; COVID-19, coronavirus disease 2019; IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile range; LT, liver transplantation; LTR, liver transplantation recipient; mRNA, messenger RNA; NIBSC, National Institute for Biological Standards and Control; RBD, receptor-binding domain; SARS-CoV-2, severe acute respiratory disease coronavirus 2; SOTR, solid organ transplantation recipient; WHO, World Health Organization.

Address reprint requests to Otto Pritsch, Ph.D., Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. General Flores 2125, Montevideo, Uruguay. Telephone: 598-99-477-945; Fax: 598-2522-4185; E-mail: pritsch@pasteur.edu.uy

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (COF 03/11) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay.

**These authors contributed equally to the manuscript.*

Received September 20, 2021; accepted December 19, 2021.

© 2021 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/lt.26400

Potential conflict of interest: Nothing to report.

2019 (COVID-19), prevaccination negative serology, and 2 doses of either the BNT162b2 (n = 22) or CoronaVac (n = 21) vaccines. The ethical review institutional board approved the study, and all participants were included after signing the informed consent form.

Serum samples were obtained at least 15 days after the second dose from the LTR group (median, 45 days; IQR, 40-55 days) and from the healthy group (median, 45 days; IQR, 30-60 days). Specific RBD-IgG levels were determined by using the COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (ATGen SRL, Montevideo, Uruguay). Results are expressed in binding antibody units (BAU)/mL by using the World Health Organization (WHO) International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC code 20/136, <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>) for assay calibration.

Results and Discussion

We report the results of the first 85 LTRs enrolled in this study (median age, 56 years; IQR, 45-65 years; 62.3% men). A total of 11 LTRs (13%) received the BNT162b2 vaccine, and 74 received (87%) the CoronaVac vaccine. The overall LTR seroconversion rate after second-dose vaccination with both platforms was 41.2% (35 of 85). However, a significantly higher seroconversion rate ($P = 0.045$) was found among LTRs who received BNT162b2 (72.7%; 8 of 11) versus CoronaVac (36.5%; 27 of 74). The control group included 43 healthy volunteers (median age, 41 years; IQR, 35-44 years; 35% men). The seroconversion rate for the healthy control group after the second dose with both vaccine platforms was 100%.

Significantly higher antibody levels ($P = 0.005$) were found among LTRs fully vaccinated with BNT162b2 (median, 66 BAU/mL; IQR, 5-321 BAU/mL) versus CoronaVac (median, 2 BAU/mL; IQR, 1-18.5 BAU/mL). Similarly, the antibody response was also significantly higher ($P < 0.001$) in healthy control individuals fully vaccinated with BNT162b2 (median, 1355 BAU/mL; IQR, 968.3-2495 BAU/mL) compared with CoronaVac (median, 190 BAU/mL; IQR, 96.5-328.5 BAU/mL). However, significantly lower IgG levels ($P < 0.001$) were found when comparing LTRs (median, 2 BAU/mL) with the healthy group (median, 190 BAU/mL) vaccinated with CoronaVac. Similarly, significantly lower specific antibody levels ($P < 0.001$) were also found

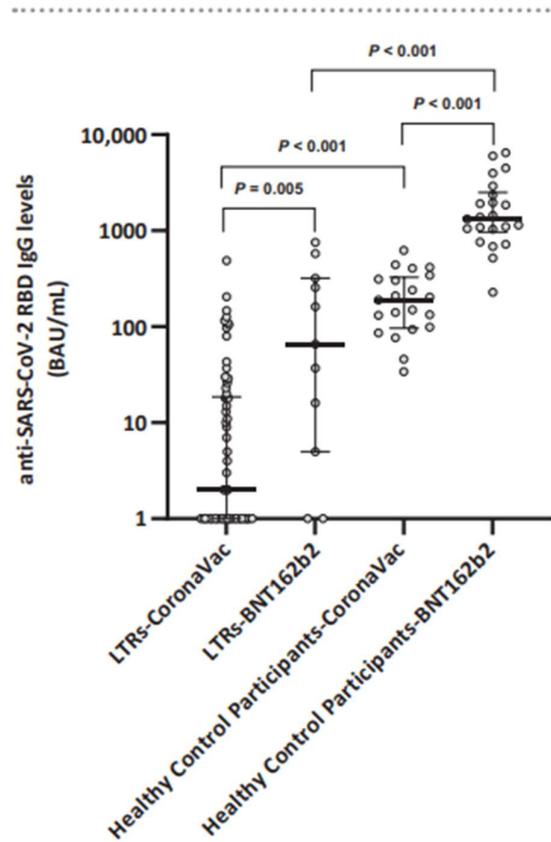


FIG. 1. Specific anti-RBD SARS-CoV-2 IgG levels in LTRs and healthy control participants fully vaccinated with 2 doses of either the BNT162b2 or CoronaVac vaccines. IgG levels are expressed in BAU/mL, by using the WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code 20/136) for assay calibration. Medians and IQRs are indicated by horizontal bars. Differences between independent-group continuous data were analyzed by Mann-Whitney U test.

when comparing LTRs (median, 66 BAU/mL) with the healthy group (median, 1355 BAU/mL) fully vaccinated with BNT162b2 (Fig. 1).

No major adverse events or rejection episodes associated with vaccination were identified in this LTR cohort.

During the development of this study, 2 fully vaccinated LTRs developed a mild form of COVID-19 without the need for therapeutic intervention: 1 vaccinated with CoronaVac and the other with BNT162b2.

A reduction in glomerular filtration (cutoff point <60 mg/dL) was statistically associated with the LTR

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of LTRs Fully Vaccinated With BNT162b2 or CoronaVac Associated With Seroconversion Status

Variable	LTR Nonresponders	LTR Responders	LTR Total	P Value
Number (%)	50 (58.8)	35 (41.2)	85 (100)	
Age in years, median (IQR)	54.6 (48-65)	49.4 (31-62)	56 (45-65)	0.102
Male sex, n (%)	33 (66)	20 (57)	53 (62.3)	0.306
Type of vaccine, n (%)				
Inactivated SARS-CoV-2, CoronaVac	47 (63.5)	27 (36.5)	74 (87)	0.045
mRNA BNT162b2, Pfizer/BioNTech	3 (27.3)	8 (72.7)	11 (13)	
Immunosuppression treatment, n (%)				
Tacrolimus	45 (90)	31 (88.5)	76 (89.4)	1
Mycophenolate	32 (64)	16 (45.7)	48 (56.5)	0.094
Corticosteroids	26 (52)	16 (45.7)	42 (49.4)	0.568
Everolimus	12 (24)	11 (31.4)	23 (27)	0.584
LTRs in the first year after transplant	7 (14)	1 (2.8)	8 (9.4)	0.133
Glomerular filtration <60 mg/dL, n (%)	33 (66)	2 (5.7)	35 (41.2)	<0.001

group that did not elicit a measurable antibody response against the vaccine ($P < 0.001$; 95% confidence interval, 1511–2767). Although nonstatistically significant ($P = 0.133$), patients fully vaccinated during the first year after LT showed a low seroconversion rate, in line with the major pharmacological immunosuppression period. Fisher’s exact, chi-square, and Student t tests were used in the statistical analysis (Table 1).

In this work, we show significantly lower anti-RBD-IgG levels in the LTR fully vaccinated group (2 doses 28 days apart) either with CoronaVac or with BNT162b2 when compared with the healthy control group. These results are in agreement with previous reports showing low levels of specific IgG after the 2-dose administration of mRNA-based vaccines in LTRs (Fig. 1). Furthermore, our work provides original evidence on the significant low immunogenicity of CoronaVac in this special risk group.

To our knowledge, this is the first study that reports the seroconversion rate in LTRs vaccinated with CoronaVac. Our results also provide information about the low incidence of major adverse events or rejection episodes associated with vaccination in this LTR cohort.

Taking into account the international evidence and the results presented in this work, the Uruguayan Ministry of Public Health decided to reinforce the primary scheme of vaccination in the transplant recipient group. After 1 month of the second dose, those who have received BNT162b2 may receive a third dose of the same vaccine, whereas those who have received

the complete vaccination schedule with CoronaVac may receive the complete vaccination schedule with BNT162b2 (2 doses). The effects of this intervention in reinforcing the recipient immune response will be analyzed by following this cohort over time.

Jimena Prieto, M.D., M.Sc.^{1,2,*}
 Florencia Rammauro, M.Sc.^{3,4,*}
 Martín López, M.D.²
 Romina Rey, M.D.²
 Ana Fernández, R.N.²
 Sergio Bianchi, M.D., Ph.D.^{5,6}
 Solange Gerona, M.D.²
 Julio Medina, M.D., Ph.D.^{1,2}
 Otto Pritsch, Ph.D.^{3,4}

¹Cátedra de Enfermedades Infecciosas
 Facultad de Medicina
 Universidad de la República
 Montevideo, Uruguay

²Programa Nacional de Trasplante Hepático
 Montevideo, Uruguay

³Departamento de Inmunobiología
 Facultad de Medicina
 Universidad de la República
 Montevideo, Uruguay

⁴Laboratorio de Inmunovirología
 Institut Pasteur de Montevideo
 Montevideo, Uruguay

⁵Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas

PRIETO ET AL.

LIVER TRANSPLANTATION, May 2022

Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay
Laboratorio de Genómica Funcional
Institut Pasteur de Montevideo
Montevideo, Uruguay

REFERENCES

- 1) Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, Tobian AAR, Massie AB, Segev DL, Gazonik-Wang JM. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA* 2021;325:2204-2206.
- 2) Werbel WA, Boyarsky BJ, Ou MT, Massie AB, Tobian AAR, Gazonik-Wang JM, Segev DL. Safety and immunogenicity of a third dose of SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: a case series. *Ann Intern Med* 2021;174:1330-1332.
- 3) Guarino M, Cossiga V, Esposito I, Alessandro F, Morisco F. Effectiveness of SARS-Cov-2 vaccination in liver transplanted patients: the debate is open! *J Hepatol* 2022;76:237-239.
- 4) Rabinowich L, Grupper A, Baruch R, Ben-Yehoyada M, Halperin T, Turner D, et al. Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J Hepatol* 2021;75:435-438.
- 5) Strauss AT, Hallett AM, Boyarsky BJ, Ou MT, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 messenger RNA vaccines in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2021;27:1852-1856.

Respuesta frente a la aplicación de una dosis de refuerzo en trasplantados hepáticos

En base a la respuesta encontrada para los grupos de pacientes inmunosuprimidos en nuestro país y la evidencia internacional, el MSP dispuso la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 para aquellos que recibieron un régimen de inmunización primario con esta vacuna, y la revacunación con un esquema completo de BNT162b2 para aquellos que fueron vacunados inicialmente con CoronaVac. En este contexto, nos interesó realizar un seguimiento de la cohorte de trasplantados hepáticos para evaluar qué sucedía con los niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en respuesta a estas intervenciones.

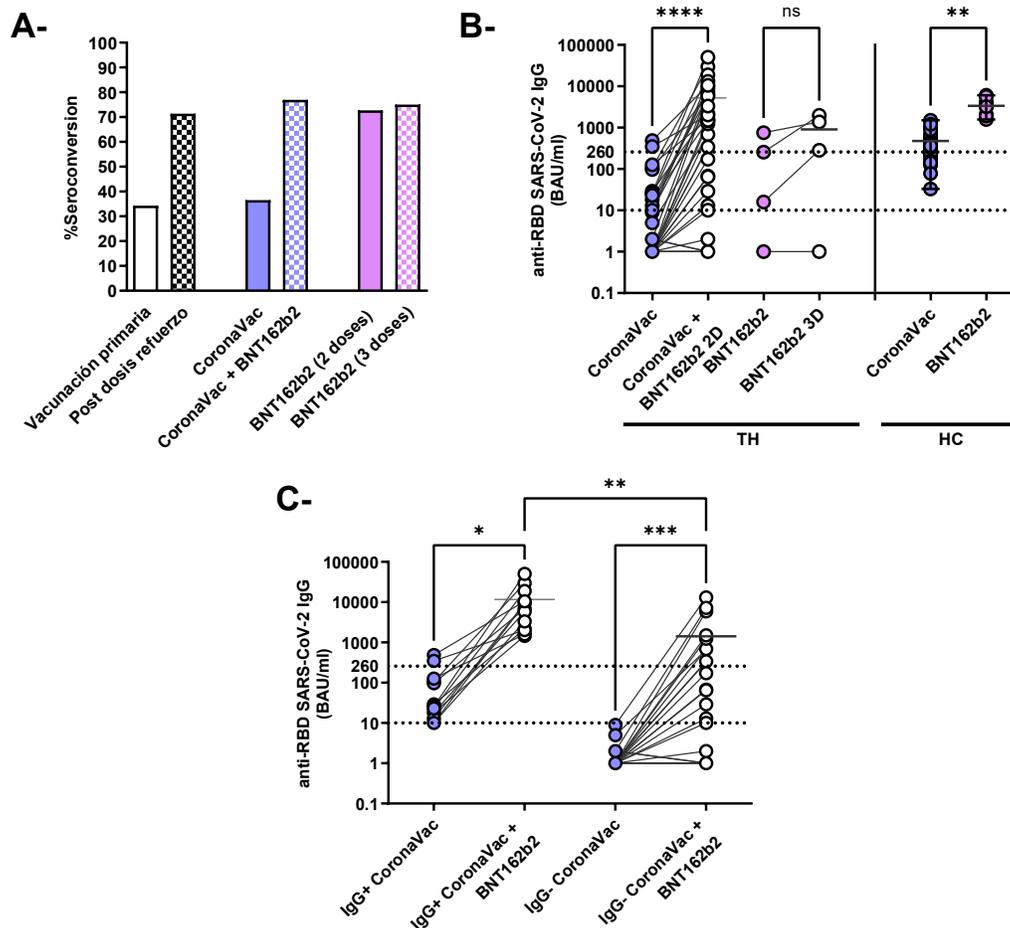


Figura 29. Respuesta a la administración de dosis de refuerzo con BNT162b2 en TH vacunados inicialmente con CoronaVac. A- Tasa de seroconversión global y en función de la estrategia vacunal empleada. B- Niveles de anticuerpos específicos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 determinados empleando en ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA. TH: trasplantados hepáticos. HC: controles sanos, ns no significativo, **p=0,0096, ****p<0,0001 Kruskal-Wallis test C- Niveles de anticuerpos en TH separados en

función de si seroconvirtieron luego de la vacunación primaria (IgG+) o no (IgG-). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Kruskal-Wallis test. En líneas punteadas se indica el punto de corte del ensayo a 10 BAU/ml y el valor de 260 BAU/ml como referencia.

De los 85 pacientes incluidos en el Programa Nacional de Trasplante Hepático que participaron en el trabajo inicial, se le extrajo una muestra luego de la administración de dosis de refuerzo a 35. En este grupo, globalmente la proporción de TH que presentaban anticuerpos IgG anti-RBD detectables luego de la administración del esquema de vacunación de refuerzo fue de un 71,4% (25/35), comparado con un 34,3% (12/35) luego de vacunación primaria (Figura 29-A). De estos 35 pacientes solamente 4 habían sido inmunizados con BNT162b2 inicialmente y recibieron una tercera dosis de esta vacuna, por lo cual es difícil sacar conclusiones respecto a este grupo. En el grupo de trasplantados vacunados inicialmente con CoronaVac que recibieron dos dosis de BNT162b2, se observa un aumento significativo tanto en la tasa de seroconversión (30,8% vs. 76,9%), así como en los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD presentes en el suero, media de 2 BAU/ml [IQR 1-18] luego de la vacunación primaria y 1242 [IQR 13-6794] luego de la vacunación de refuerzo con BNT162b2 ($p < 0,001$) (Figura 29- A y B). De forma similar a lo que ocurre en los trasplantados renales, aquellos que presentaron seroconversión luego de la vacunación inicial (IgG+) alcanzaron niveles significativamente más altos de IgG anti-RBD luego de la vacunación de refuerzo con dos dosis de BNT162b2, media 6312 BAU/ml [IQR 1925-12650], que aquellos que no presentaban anticuerpos inicialmente (IgG-), media 65 BAU/ml [IQR 1-963] ($p < 0,001$) (Figura 29-C). De hecho, todos los pacientes analizados que presentaron anticuerpos luego de la vacunación inicial con CoronaVac alcanzaron niveles mayores a 260 BAU/ml luego de la revacunación con BNT162b2.

3.3.3 Respuesta a las vacunas contra COVID-19 en pacientes en diálisis crónica

Se realizó un seguimiento de los niveles de anticuerpos específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero de pacientes en hemodiálisis o en diálisis peritoneal pertenecientes a los centros de diálisis del Hospital de Clínicas y el CASMU (CASMU IAMPP). Se realizaron cinco extracciones entre junio de 2021 y agosto de 2022, en total 216 pacientes participaron en al menos una de las etapas de extracción.

A un total de 199 pacientes en diálisis crónica (PDC) sin diagnóstico de infección previa por SARS-CoV-2 y con al menos 15 días de haber completado un esquema de vacunación primaria contra COVID-19 se les extrajo una muestra de sangre en junio de 2021. Se analizó la presencia de anticuerpos IgG específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 en suero empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA, encontrándose un resultado positivo (mayor a 10 BAU/ml) en el 85,9% (171/199). Dentro de estos, 108 participantes habían sido inmunizados con CoronaVac y 83 con BNT162b2, detectándose la presencia de anticuerpos en un 81,3% (88/108) y 90,4% (75/83) de los pacientes, respectivamente (Figura 30-A). Dentro de los PDC aquellos inmunizados con CoronaVac presentaron niveles de anticuerpos significativamente menores que los que recibieron BNT162b2, media de 83 BAU/ml (IQR 15-225) vs. 442 BAU/ml (IQR 138-1068), $p < 0.0001$ (Figura 30-B). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos para ninguna de las dos vacunas cuando se compararon los pacientes en HD y DP, por lo que fueron analizados en conjunto. La tasa de seroconversión reportada por nosotros en población general fue del 100% para ambas vacunas, con una media de 403 BAU/ml (IQR 249-618) en aquellos inmunizados con CoronaVac y 3179 BAU/ml (IQR 2103-4163) en los que recibieron BNT162b2, siendo significativamente más altas que las encontrados en los PDC. A 99 de los 108 pacientes vacunados con CoronaVac y 76 de los 83 que recibieron BNT162b2 se les midió los niveles de anticuerpos 3 meses luego de la extracción inicial, encontrándose que disminuían en la mayoría de los participantes, de manera similar a lo descrito por nosotros en la cohorte de población general (Figura 30-C). Se excluyeron del análisis 8 PDC que tuvieron un diagnóstico confirmado de COVID-19 en el período comprendido entre las dos extracciones. Todos los pacientes que se infectaron habían sido vacunados con CoronaVac y en 7 se registró un aumento en los niveles de anticuerpos luego de la infección. En algunos pacientes se observó un aumento notable del título de anticuerpos específicos sin que haya un reporte de infección o de la aplicación de una

dosis vacunal de refuerzo, lo cual permite plantear la posibilidad de que hayan cursado una infección por SARS-CoV-2 clínicamente no evidente.

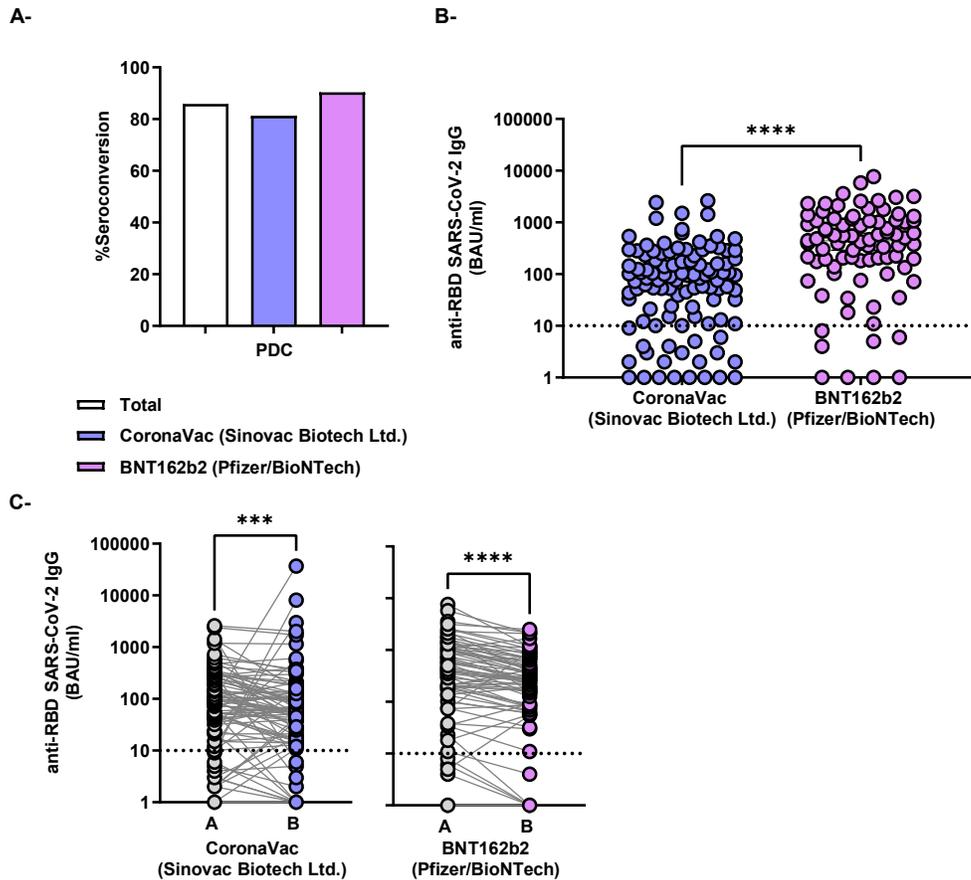


Figura 30. Respuesta a la vacunación primaria contra COVID-19 en PDC. **A-** Se indica la tasa de detección de anticuerpos (%seroconversion) en todos los PDC analizados y separados en función de la vacuna recibida. **B-** Niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 determinados mediante el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA expresados en BAU/ml luego de la vacunación con CoronaVac o BNT162b2, **** $p < 0.0001$ Mann-Whitney test. **C-** Comparación de los niveles de anticuerpos para los mismos PDC temprano luego de la vacunación (A) y a los 3 meses de la determinación inicial (B), *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ Wilcoxon test. En línea punteada se indica el punto de corte del ensayo correspondiente a 10 BAU/ml.

Estos resultados pusieron de manifiesto la necesidad de aplicar dosis vacunales de refuerzo en esta población. En la extracción realizada luego de la aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 se encontró una tasa de seroconversión global del 95,3% (184/193), 94% en los inmunizados inicialmente con CoronaVac (109/116) y 97,4% en los que recibieron BNT162b2 (75/77), con la aplicación de una cuarta dosis

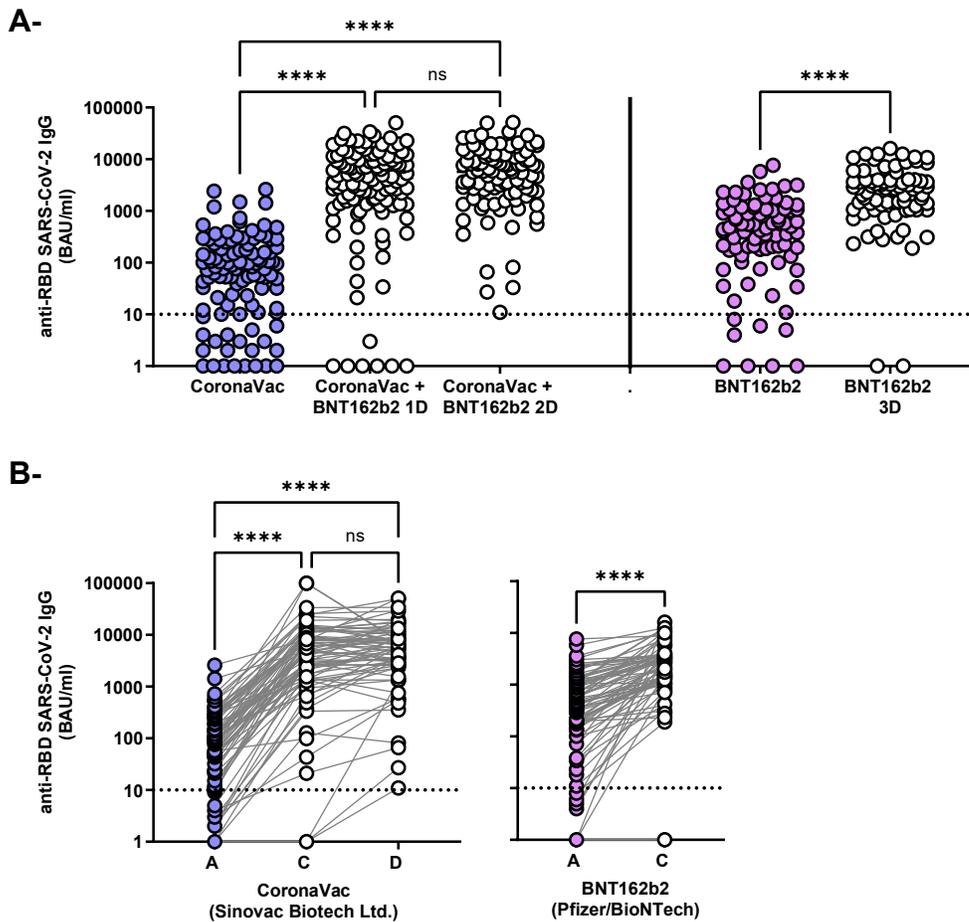


Figura 31. Respuesta a la aplicación de dosis vacunales de refuerzo en PDC. A- Niveles de anticuerpos IgG específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 determinados mediante el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA expresados en BAU/ml luego de la vacunación con CoronaVac o BNT162b, y la aplicación de dosis de refuerzo con BNT162b2, ns no significativo, **** $p < 0.0001$ Kruskal-Wallis test de comparación múltiple. **B-** Evolución de los niveles de anticuerpos desde la determinación inicial post vacunación primaria (A), luego de una dosis de refuerzo con BNT162b2 (C) y de dos dosis de esta vacuna (D), ns no significativo, **** $p < 0.0001$ Wilcoxon test.

de BNT162b2 en los que habían recibido CoronaVac la tasa de seroconversión en este subgrupo asciende al 100% (100/100) (Figura 31-A). La aplicación de una dosis de refuerzo aumenta significativamente los niveles de anticuerpos tanto en aquellos vacunados inicialmente con CoronaVac, de una media de 83 BAU/ml (IQR 15-225) a 4356 BAU/ml (IQR 1366-10364), $p < 0.0001$, como en aquellos que recibieron BNT162b2 de una media de 442 BAU/ml (IQR 138-1068) a una media de 2728 BAU/ml (IQR 1068-3966), $p < 0.0001$ (Figura 31-A). La aplicación de una segunda dosis de BNT162b2 en aquellos inmunizados con CoronaVac que habían recibido un refuerzo previo con la vacuna a ARNm no parece generar un aumento significativo en los niveles de anticuerpos, 4356 BAU/ml (IQR 1366-10364) vs. 5705 BAU/ml (IQR 2401-11819),

$p=0,4728$. Similar a lo reportados por otros grupos de investigación, en nuestra cohorte el esquema de vacunación heteróloga estimula el desarrollo de niveles significativamente más alto de anticuerpos que el de vacunación homóloga, media de 4356 BAU/ml (IQR 1366-10364) y de 2728 BAU/ml (IQR 1068-3966), $p<0,0001$, respectivamente, aunque estos resultados deberían ser analizados en función de las características demográficas de cada grupo (Figura 31-A).

A 90 pacientes que habían sido inmunizados inicialmente con CoronaVac se les estudiaron los niveles de anticuerpos luego de la aplicación de una y en algunos casos dos dosis de refuerzo con BNT162b2 (Figura 31-B). Solo 5 de 18 pacientes inicialmente seronegativos seguían sin presentar anticuerpos detectables luego de una dosis de refuerzo con BNT162b2. De estos, 3 desarrollaron anticuerpos luego de la cuarta dosis y para los otros dos no se dispone de datos. Dentro de los vacunados con BNT162b2, en 77 pacientes se disponía de muestras post vacunación primaria y luego de una dosis de refuerzo. De los que no respondieron a la vacunación inicial solo dos permanecieron sin anticuerpos detectables luego de la tercera dosis (2/8).

4. DISCUSIÓN GENERAL

En respuesta a la pandemia de COVID-19 se han desarrollado y aprobado rápidamente, en algunos casos con autorizaciones de emergencia basadas en informes interinos, numerosos ensayos serológicos para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2, en diversos formatos, predominando los dispositivos de testeo rápido y los inmunoensayos enzimáticos. Nuestro país no fue la excepción a esta tendencia y en marzo de 2020, luego del reporte de los primeros casos de COVID-19 en el territorio nacional, un grupo de investigadores comenzamos a trabajar en el desarrollo y validación de ensayos serológicos. Esta etapa de validación estuvo marcada por una fase inicial de caracterización en el laboratorio, y otra etapa a la que llamamos de aplicación del ensayo en territorio, en la cual se utilizó el ensayo para dar respuesta a preguntas relevantes que surgieron en el transcurso de la pandemia y a su vez sirvieron de retroalimentación para su adaptación y mejoramiento. Ejemplos de esto son: la realización de ensayos de seroprevalencia, la generación de un banco de plasma convaleciente COVID-19 y la evaluación de la respuesta humoral inducida por las vacunas contra SARS-CoV-2 empleadas en nuestro país en diferentes poblaciones.

En lo que respecta al desarrollo de un ensayo serológico inicialmente se exploraron diversas opciones de antígenos virales (proteína N, S y RBD) y diversos formatos como ELISA y LFIA. Estos esfuerzos se terminaron cristalizando en el desarrollo de tres versiones de un ensayo de tipo ELISA en formato de kit comercial para la detección de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 en muestras de plasma y suero humanos: COVID-19 IgG ELISA UY, COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y COVID-19 IgG QUANT ELISA.

El primer hito del grupo consistió en la optimización del protocolo de un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 y su pasaje al formato de kit comercial en conjunto con la compañía ATGen. Durante este proceso se exploraron diversas condiciones de sensibilización, bloqueo, incubación y dilución de las muestras, así como de revelado. El objetivo del grupo era obtener un kit comercial pero también contar con un protocolo de un ensayo serológico de ELISA para su aplicación en una versión “*in house*”, ya que esto permitía una mayor soberanía para adaptarlo a nuevas preguntas que pudiesen surgir. Para esto inicialmente nos basamos en los trabajos de Amanat et al³⁷¹. y el desarrollo de un ensayo de ELISA llamado

COVIDAR IgG en Argentina³⁹⁰. De hecho, para el desarrollo del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY, se emplearon los mismos plásmidos para la expresión de las proteínas S y su dominio RBD en células de mamífero que los que utilizaron estos grupos. Sin embargo, a diferencia del COVIDAR que emplea una combinación de dos antígenos virales en un mismo pocillo³⁹⁰, la proteína S en forma de trímero estabilizado y su RBD, nosotros nos focalizamos en la utilización únicamente del RBD, ya que su producción era más simple. Se ensayaron diversas condiciones de sensibilización, encontrando que una solución de 1 µg/ml de RBD era suficiente para distinguir sueros negativos y positivos, siendo la concentración de antígeno empleada en la primera versión del kit que utilizaba el mRBD como antígeno. Se ensayaron muestras de suero inactivadas por 1h a 56 °C y sin inactivar, sin encontrarse diferencias en los resultados.

Luego de esta primera versión, y dada la experiencia del grupo en la producción de antígenos virales utilizando células de *Drosophila*, se produjo el RBD de SARS-CoV-2 en este sistema de expresión (iRBD), y se ensayó su utilización en el ELISA en lugar del mRBD mostrando un comportamiento similar. Las ventajas de emplear el iRBD eran que se podía producir de manera estable con altos rendimientos³⁸⁹ a un costo inferior que el mRBD, y que se trataba de un antígeno con un proceso de diseño y producción propio. Esto permitía su adaptación frente a nuevos escenarios como ser la aparición de nuevas variantes virales que generaran una respuesta de anticuerpos con baja reactividad cruzada hacia la variante original, y que hicieran necesario el desarrollo de ensayos específicos de variante, así como su utilización en otro tipo de ensayos como los sVNT. A partir de este antígeno se desarrolló la segunda versión del ELISA, llamada COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 que empleaba el iRBD a una concentración de 2 µg/ml, lo que aumentó la reproducibilidad del ensayo. Algo llamativo durante la validación de este antígeno es que se detectó un suero que presentaba reactividad contra el StrepTag empleado en la purificación del iRBD, por esta razón es que se decidió usar el antígeno sin esta marca.

Estas dos primeras versiones permitían la detección cualitativa de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2. Para la caracterización de estos ensayos se emplearon un conjunto de sueros control y sueros de individuos con diagnóstico previo de infección confirmada, y se compararon los resultados obtenidos con otros ensayos serológicos disponibles en el mercado.

La utilización de muestras prepandemia como controles negativos de los ensayos aportó una ventaja significativa para el desarrollo de estos, ya que aseguró que los sueros empleados provenían de individuos que no tenían ninguna posibilidad de haber estado expuestos al agente infeccioso. Como desventaja, utilizar sueros de descarte provenientes de banco de sangre nos limita a una población sesgada a los criterios necesarios para ser donante de sangre, lo cual excluye a menores de 18 años, mayores de 65 años, mujeres embarazadas, y algunos enfermos crónicos, entre otros, los cuales no se puede descartar que presenten una reactividad basal mayor en este ensayo. Durante la puesta a punto de los ensayos de ELISA no se analizó de manera específica la reactividad cruzada del mismo contra otras infecciones. Sería de particular interés conocer que sucedería con la reactividad cruzada frente a otros coronavirus estacionales, ya que presentan cierta similitud con el SARS-CoV-2 y son de circulación frecuente en la población, y contra los virus SARS-CoV y MERS-CoV, cercanamente emparentados. Sin embargo, aunque esto no se analizó de manera específica, al tratarse de muestras provenientes de adultos es esperable que varias de las mismas correspondan a individuos que cuentan con alguna infección previa por coronavirus estacionales. Por otra parte, dada la distribución geográfica de las epidemias por SARS y MERS, parece poco probable que haya alguna muestra perteneciente a individuos con historial de infección previa por estos virus tanto en la seroteca empleada para la optimización de los ensayos como entre las muestras donde se pretendían aplicar los mismos, aunque tampoco puede ser completamente descartado.

Tampoco estudiamos la influencia de posibles interferentes que puedan estar presentes en el suero (si bien su utilización no se recomienda en el folleto informativo de los kits), como ser muestras visiblemente hemolizadas, lipémicas, con altos niveles de bilirrubina, u otras circunstancias, o que presenten anticuerpos antinucleares, anti-ADN doble hebra o factor reumatoide. Este último en particular fue identificado como uno de los interferentes responsable de mayor reactividad en diferentes inmunoensayos y ensayos rápidos para SARS-CoV-2³⁹³. En este sentido, este tipo de diferencias en los conjuntos de sueros empleados como controles negativos podría explicar que la especificidad determinada para el ensayo por nosotros y la encontrada en el análisis por parte del DLSP no sea la misma.

En lo que respecta a la sensibilidad del ensayo, es importante tener presente las características de la respuesta inmune humoral inducida por la infección viral.

Anticuerpos del tipo IgM contra antígenos del SARS-CoV-2 son detectables en un 85% de pacientes inmunocompetentes a los 7 días desde el comienzo de síntomas, mientras que los de tipo IgG se pueden detectar a partir de los 8 días³¹². Por encima del 90% de los individuos resultan positivos para IgG específicas contra el virus luego de 14 días de la enfermedad y estos anticuerpos pueden permanecer detectables por meses y tal vez incluso años¹⁵³. Algunos pacientes inmunocomprometidos pueden demorar más tiempo en seroconvertir o incluso no hacerlo luego de una infección aguda por SARS-CoV-2. En este sentido, es claro que no todos los individuos que fueron diagnosticados con COVID-19 desarrollarán anticuerpos específicos contra el virus, al menos a niveles que puedan ser detectados mediante los ensayos serológicos disponibles que cuantifican IgG. Por otra parte, esta cinética de aparición de anticuerpos de tipo IgG en el curso de la infección por SARS-CoV-2 determina que nuestro ensayo tenga una alta sensibilidad para muestras obtenidas al menos 8 días luego del comienzo de síntomas o diagnóstico, pero no en etapas tempranas de la enfermedad, como fue determinado en el análisis realizado por la DLSP, lo cual se puede deber simplemente a que estos anticuerpos no puedan ser detectados porque todavía no se han generado en cantidades suficientes. Otra dificultad es que no hay ensayos serológicos de referencia, y en los comienzos ni siquiera se disponía de paneles de sueros de referencia, por lo que los resultados de los ensayos son expresados en función de su concordancia con la infección reciente por SARS-CoV-2 determinada mediante ensayos moleculares. Es importante tener estos dos puntos presentes cuando se analiza el comportamiento de los ensayos, ya que pueden explicar las diferencias de sensibilidad encontradas cuando se emplean grupos de sueros con características diferentes.

Cuando comparamos la performance de los kits COVID-19 IgG ELISA UY y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 con otros ensayos serológicos, encontramos que estos son muy buenos discriminando sueros negativos de sueros positivos, con indicios incluso de tener una mayor sensibilidad que el ELISA cualitativo de la compañía Euroimmun que es empleado ampliamente a nivel internacional y validado por la FDA. Si bien todas las muestras empleadas provenían de individuos con más de 15 días desde el diagnóstico de COVID-19 o comienzo de los síntomas, los primeros 90 sueros COVID-19+ empleados para comparar nuestros ensayos con los otros comerciales se componían en gran medida de casos asintomáticos o con enfermedad leve, los cuales pueden desarrollar una respuesta de anticuerpos menor¹⁵⁴. De hecho, un 14% de las muestras con diagnóstico reciente de COVID-19 resultaron negativas para la presencia de anticuerpos con todos los métodos empleados. Esto puede explicar que la sensibilidad

encontrada por nosotros sea menor que la especificada en los ensayos comerciales, y también que cuando ampliamos el número de muestras positivas para caracterizar mejor el kit COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, la sensibilidad fuera ligeramente mayor que la encontrada en la comparación preliminar. A su vez encontramos una muy buena correlación entre el ratio M/CO del suero empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y la capacidad de este de inhibir la unión entre el RBD y el ACE2 en un ensayo de neutralización sustituta (*cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit*, GenScript). Esto era esperable ya que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes generados en respuesta a la infección por SARS-CoV-2 se dirigen justamente contra el RBD y son de clase IgG. Si bien no realizamos ensayos de neutralización por reducción de placas (que son la técnica patrón para evaluar esta función), ni basados en pseudovirus, está descrito ampliamente en la literatura que los ensayos de neutralización sustituta correlacionan muy bien con estos y su realización es mucho más simple^{377,394}.

Si bien desde un principio nos planteamos que el ratio M/CO obtenido en el ensayo de ELISA COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 debía tener una relación con el título de IgG específicas contra el RBD presentes en el suero, se trataba de un ensayo cualitativo. En ese momento el trabajo en conjunto con los bancos de sangre para la obtención de plasma convaleciente de COVID-19 con alto título de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para su utilización terapéutica, y el aumento exponencial en el número de casos de COVID-19, nos impulsó a buscar adaptar este ensayo a una versión cuantitativa o al menos semicuantitativa de manera de poder emplearlo para identificar plasmas con alto título de anticuerpos. La experiencia argentina con la utilización del COVIDAR IgG mostraba que una dilución mayor de los sueros a la indicada en el kit permitía distinguir las muestras con alto título de anticuerpos sirviendo como filtro inicial (comunicación oral). En paralelo, la compañía Euroimmun lanzó una nueva versión semi cuantitativa de su ensayo de ELISA (Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA), que permite expresar los resultados en unidades relativas por ml (RU/ml). Siguiendo estas ideas comparamos los resultados obtenidos empleando nuestro kit de ELISA con tres diluciones diferentes de las muestras (1:10, 1:50 y 1:100), con los obtenidos utilizando el COVIDAR IgG a una dilución 1:200 de los sueros y con el ELISA semicuantitativo de Euroimmun. Si bien encontramos una buena correlación general para las tres diluciones, la dilución 1:100 fue la que presentó una mejor correlación de tipo lineal con los otros dos ensayos. Esto también nos permitió establecer un punto de corte para discriminar sueros de alto título, como se discutirá más adelante.

En diciembre de 2020, el comité de expertos en estandarización de la OMS adoptó el estándar internacional y panel de referencia internacional de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2. Este estándar generado por el NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*) permitió la calibración apropiada de los ensayos inmunoenzimáticos a unidades arbitrarias, reduciendo la variación inter-laboratorios y creando un lenguaje común para reportar los resultados. La adquisición de estos estándares nos permitió desarrollar una tercera versión del ensayo de ELISA llamada COVID-19 IgG Quant ELISA que permitía la determinación cualitativa y cuantitativa de IgG específicas anti-RBD en muestras de suero o plasma humano. Para realizar el ensayo de manera cuantitativa se deben emplear las muestras a una dilución 1:100 y se dispone de una serie de muestras que constituyen estándares secundarios generados a partir de los estándares internacionales, posibilitando expresar los resultados en BAU/ml. Encontramos que nuestro ensayo nos permitía cuantificar muestras de entre 10 y 400 BAU/ml cuando las mismas se ensayaban a esta dilución. A su vez, todas las muestras negativas analizadas mostraron niveles por debajo de 10 BAU/ml. También analizamos el panel de referencia, encontrando resultados que coincidían parcialmente con los hallados en un estudio que involucró 44 laboratorios de 15 países que los utilizaron en diferentes tipos de ensayos serológicos, destacando en particular que logramos cuantificar la muestra 20/140 identificada como de nivel bajo de anticuerpos anti-S, y que fue catalogada como negativa por varios de los ensayos empleados en ese estudio³⁹⁵. Es claro que los resultados obtenidos dependen del tipo de ensayo, el antígeno y las características del método, por lo que, aunque los resultados se obtengan en una unidad arbitraria internacional, no son del todo comparables. Sin embargo, en este estudio comparativo encontraron que la variación entre laboratorios disminuía más de 50 veces para ensayos de neutralización y más de 2000 veces para ensayos de ELISA cuando se usaba el estándar internacional³⁹⁵.

La posibilidad de expresar los resultados en unidades internacionales es particularmente relevante en el contexto de las vacunas contra COVID-19. Por ejemplo, permite comparar la respuesta generada frente a diferentes vacunas con la inducida por la infección, comparar distintos grupos, y también facilitar la comprensión de los distintos trabajos que han ido surgiendo en la temática. En resumen, los ensayos serológicos para la detección de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 son una herramienta valiosa en la lucha contra la pandemia de COVID-19 y pueden proporcionar información

importante sobre la prevalencia de la infección, la respuesta inmunológica y la eficacia de las intervenciones de control de la pandemia.

La utilización del RBD como antígeno presenta algunas ventajas, como el hecho que los anticuerpos anti-S disminuyen más lentamente luego de la infección que los generados contra otros antígenos virales como puede ser la proteína N^{152,167,168}. Además, la presencia de IgGs anti-RBD correlaciona muy bien con la presencia de anticuerpos con capacidad neutralizante en el suero, lo cual tiene sentido ya que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes se dirigen contra esta región de la proteína S^{152,168}. De hecho, nosotros mismos encontramos una muy buena correlación entre los resultados obtenidos con nuestro ensayo y la capacidad de los sueros de inhibir la interacción entre el RBD y el ACE2 en un ensayo sustituto de neutralización. Además, el RBD, a diferencia de otras regiones de la proteína S está poco conservada con otros coronavirus, lo cual disminuye la posibilidad de reactividad cruzada. Si bien la proteína N no parece ser blanco de anticuerpos con capacidad neutralizante, recientemente se demostró que puede aparecer en la superficie de células infectadas y por tanto no se puede excluir la posibilidad de que las respuestas inmunitarias dirigidas contra este antígeno puedan contribuir a la eliminación de células infectadas por el virus³⁹⁶. En otras partes del mundo, donde se han empleado vacunas basadas en la proteína S, ya sea como parte de vectores virales, ARNm o subunidades, se ha planteado que los ensayos dirigidos a detectar anticuerpos contra la proteína N podrían tener un lugar en la era postvacunación para distinguir individuos que se infectaron luego de la vacunación y presentan, por ejemplo, síntomas compatibles con COVID-19 prolongado. En Uruguay, donde una gran parte de la población fue inmunizada inicialmente con una vacuna a virus atenuado, esto no parece ser tan lineal, si bien es cierto que esta vacuna no parece inducir altos títulos de anticuerpos anti-N y se conoce que los anticuerpos dirigidos contra ese antígeno decaen más rápidamente que los dirigidos contra S.

Dadas las características de la presentación clínica de la enfermedad COVID-19, desde formas graves a infecciones totalmente asintomáticas, se estima que hay una proporción de estas últimas que no son diagnosticadas en el momento. El problema de los casos asintomáticos no diagnosticados es que contribuyen a la propagación del virus y enmascaran el alcance real de la infección, dificultando la toma de medidas de salud pública apropiadas. Los ensayos de ELISA desarrollados en nuestro país fueron ampliamente utilizados con el fin de conocer la prevalencia de la infección a partir del

suero y estimar la proporción de estas infecciones asintomáticas. En lo que respecta a los estudios de seroprevalencia, podemos identificar un trabajo coordinado por el MSP realizado sobre el personal de la salud a nivel nacional, del cual participamos en el análisis de las muestras provenientes de la ciudad de Rivera, y al menos otros dos trabajos realizados sobre población general, uno en la ciudad de Salto y otro en Rivera, alcanzando entre los tres a más de 18 mil individuos. Estos trabajos, además de que permitieron estimar de una forma más precisa el impacto real de la epidemia en poblaciones de interés y enriquecerlo con otros parámetros sociológicos, también nos permitieron evaluar el comportamiento del ensayo cuando es aplicado a una población no seleccionada.

La incidencia acumulada de COVID-19 en el personal de la salud de la ciudad de Rivera estudiada por PCR era de 4.3%, mientras que la seroprevalencia encontrada fue de 8.3%, aproximadamente el doble, lo que es acorde a lo reportado en otros ensayos de seroprevalencia realizados en el mundo. En el estudio nacional de seroprevalencia en el personal de la salud, la proporción de funcionarios con anticuerpos positivos anti-SARS-CoV-2 fue del 5.7% (7% varones, 5,2% mujeres) a partir de muestras extraídas entre el 05/02/2021 y el 15/03/2021; la incidencia acumulada de COVID-19 diagnosticado mediante PCR en esta población era del 4,0%. En Rivera se encontró el nivel más alto de seroprevalencia, seguida de una seroprevalencia de 6,8% en Montevideo, lo cual era esperable de acuerdo con la distribución de la tasa de infección a nivel nacional en ese momento y las características particulares de estos lugares.

En lo que respecta a la capacidad de detectar anticuerpos en individuos con diagnóstico positivo de SARS-CoV-2 mediante PCR, el ensayo identificó el 94,2% (49/52) en la cohorte de personal de la salud de Rivera, y un 71.8% (501/698) en la cohorte de personal de la salud a nivel nacional, resultados que avalan su sensibilidad. En ambos trabajos, en los casos de infección confirmada donde no se detectó la presencia de anticuerpos, corresponden mayoritariamente a individuos que cursaron la enfermedad de forma asintomática, o en los cuales habían transcurrido varios meses desde que presentaron la enfermedad. De hecho, en el análisis del personal de la salud de la ciudad de Rivera el ensayo identificó al 100% de los individuos con diagnóstico previo que cursaron la enfermedad de manera sintomática, pero dos tercios de los que la cursaron sin síntomas (6/9). Ha sido reportado que hay una proporción de individuos en los cuales no se detecta la presencia de anticuerpos luego de haber sido diagnosticados con

COVID-19, tratándose en general de personas que cursaron la enfermedad de manera asintomática^{152,159,161}. Sin embargo, cuando comparamos los niveles de anticuerpos entre los individuos con diagnóstico previo de infección por PCR y los que no tenían diagnóstico ni habían reportado síntomas compatibles con COVID-19 (por lo que podemos suponer cursaron la enfermedad de manera asintomática), no encontramos diferencias significativas.

Los ensayos de seroprevalencia también permiten conocer el estado de situación real de la infección previo a la aplicación de medidas de salud pública como es la implementación de una campaña de vacunación. Como se puede observar en el caso del personal de la salud de la ciudad de Rivera, se pasó de una situación en la que el 8.3% de esta población presentaba anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 previo a la vacunación, a una prevalencia de anticuerpos de casi el 100% unos meses más tarde gracias a la introducción de las vacunas, lo que se acompañó también de un aumento en los niveles medios de anticuerpos presentes, 48 BAU/ml (IQR 18-130) vs. 2242 BAU/ml (IQR 990-3602). Algo muy similar se encontró en el trabajo de seroprevalencia y seguimiento serológico en el tiempo realizado en el personal del IP Montevideo, en la cual se observa que se pasó de un 4,5% de individuos positivos para la presencia de anticuerpos previo al inicio de la campaña de vacunación a un 98,9% cuatro meses después de esta, con un incremento en los niveles globales de anticuerpos. La seroprevalencia en esta población se mantuvo cercana al 100% en el transcurso de los dos años del estudio. En la etapa inicial de este estudio el ensayo identificó como positivos a todos los participantes con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 (5/5) y encontró dos positivos sin diagnóstico. Si bien no existe consenso respecto a un punto de corte que indique un nivel de anticuerpos protector, el aumento en los niveles de anticuerpos luego de la vacunación acompañado de los datos de evolución de la infección y los casos graves y muertes asociadas a la enfermedad parece indicar que los individuos vacunados constituyen una población con un nivel mayor de protección.

El ensayo de ELISA desarrollado también fue utilizado durante la conformación de un banco de plasma convaleciente de COVID-19 para su uso con fines terapéuticos en pacientes infectados. Esta colaboración nos permitió analizar un número muy grande de muestras de pacientes con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 mediante

PCR en fase convaleciente, profundizando en la caracterización y adaptación del ensayo de ELISA.

A pesar de la controversia, que persiste hasta el día de hoy, sobre la eficacia o no del tratamiento con plasma para evitar formas graves de la enfermedad por SARS-CoV-2, sí parecía claro que para maximizar su posible utilidad el plasma debía ser utilizado temprano en el curso de la infección y debía contener niveles altos de anticuerpos específicos. Para adoptar un criterio que nos permitiera determinar si un suero contenía niveles altos de anticuerpos comparamos los resultados obtenidos empleando nuestro ensayo a diferentes diluciones de las muestras de suero (1:10, 1:50 y 1:100) con el que obteníamos empleando otros ensayos de referencia para los cuales ya se había definido un valor de corte. Emplear una dilución 1:100 de los sueros en el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 parecía ser la mejor opción para utilizar este ensayo como tamizaje, ya que los resultados mostraban una buena correlación lineal con los obtenidos mediante el empleo del COVIDAR IgG y el Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (Euroimmun). Un ratio M/CO mayor a 2,8 se estableció como punto de corte para indicar que un suero presentaba un alto título de anticuerpos. Si realizamos la comparación con los otros dos ensayos probados, este valor se encuentra por encima del punto de corte especificado por la FDA en el ELISA cuantitativo de Euroimmun para identificar sueros con alto título, aunque por debajo del indicado en la experiencia argentina empleando el COVIDAR IgG. Por otro lado, un ratio M/CO mayor a 2,8 identificaba el 25% del total de las muestras de donantes con mayor título con que contábamos hasta ese momento. De esta forma cumplíamos con la recomendación de la FDA y agregábamos una noción de distribución, eligiendo de entre los donantes aquellos que presentaban niveles más elevados de anticuerpos específicos. En cuanto a las muestras de alto título a ser utilizadas como terapia, del inicial 25% de muestras con un ratio mayor a 2,8, con el correr del tiempo se pasó a un 35%. Esto pudo haber sido consecuencia de que a medida que se disponía de más información, en la campaña de recolección de plasma se incentivaba especialmente la donación de pacientes recientemente recuperados de COVID-19, y sobre todo a aquellos que habían cursado la enfermedad de manera sintomática, e incluso se convocaba a personas que ya habían donado y presentaban alto título de anticuerpos, a hacerlo nuevamente.

Además de los niveles de anticuerpos específicos presentes en el plasma parece claro que la funcionalidad de estos anticuerpos es también relevante para predecir su utilidad

terapéutica. En lo que respecta a su capacidad neutralizante determinamos que las muestras con un ratio M/CO mayor a 2.8 tienden a presentar un porcentaje de inhibición de la interacción RBD-ACE2 mayor al 80% en un ensayo sVNT (GenScript), empleando el RBD de la variante original de Wuhan. En este sentido, se ha reportado que los anticuerpos generados debido a la infección con una variante viral del SARS-CoV-2 pueden no ser tan efectivos neutralizando la infección por otras variantes virales. Si bien sería extremadamente complejo determinar de manera rápida la variante viral con la que se infectaron donante y receptor para lograr una compatibilidad se ha mostrado que una buena estrategia es utilizar plasma obtenido de infectados recientes y de un lugar geográfico cercano al paciente. En el escenario actual, donde el plasma se utiliza en casos puntuales, otra opción podría ser tener caracterizadas las reservas de plasma convaleciente determinando los niveles de anticuerpos capaces de reconocer el RBD de variantes virales de interés que presentan y su capacidad de inhibir la interacción de estos con el ACE2, de esta manera conociendo la variante con la que se encuentra infectado el paciente se podría seleccionar rápidamente el plasma más apropiado para él.

Además de la neutralización, los anticuerpos pueden mediar otras funciones efectoras como ser la activación del complemento, la ADCC y la ADCP, que podrían contribuir a la eficacia del plasma convaleciente en la clínica. En un trabajo de 2021 evidenciaron que además de capacidad neutralizante, el plasma de individuos convalecientes presentaba anticuerpos contra el SARS-CoV-2 capaces de mediar funciones efectoras dependiente del Fc, y que dentro de las muestras de plasma analizadas una proporción tenía particularmente elevada estas características, constituyendo a priori excelentes candidatos para su utilización con fines terapéuticos³⁹⁷. También demostraron que estos plasmas podían ser identificados en función de los niveles de IgG específicos contra la proteína S que presentaban y su capacidad de unirse a los receptores Fcγ³⁹⁷. La ADCC es un mecanismo fundamental para eliminar las células que ya se encuentra infectadas por el virus, pudiendo ser de relevancia para contener la propagación del SARS-CoV-2 en etapas tempranas de la infección. En este sentido, trabajamos en la puesta a punto de un ensayo que nos permitiera determinar la capacidad de mediar ADCC de los anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 presentes en muestras de suero, con el objetivo de evaluar su utilidad como parámetro adicional para la selección de plasmas convalecientes a ser utilizados con fines terapéuticos. Si bien logramos poner a punto un ensayo de activación de células NK dependiente de anticuerpos y encontramos que los anticuerpos anti-RBD presentes en el suero de pacientes convaleciente de COVID-

19 son capaces de mediar este mecanismo efector, el ensayo resulto ser demasiado laborioso para su utilización de rutina. Nos queda pendiente determinar si en nuestro caso esta capacidad de mediar ADCC se correlaciona con algún otro parámetro más fácil de cuantificar, como el perfil de isotipos de IgG específicos presentes en el suero, o si el ensayo reportero de ADCC empleando células Jurkat que utilizamos en el trabajo de caracterización de la respuesta humoral a la vacunación heteróloga podría ser empleado con esta finalidad.

Con respecto a la evolución de los niveles de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en receptores de plasma convaleciente, tuvimos la oportunidad de analizar un conjunto de muestras de suero seriadas que van desde antes de la transfusión hasta 28 días luego de esta. Lamentablemente, al no contar con información de su evolución clínica no podemos sacar conclusiones respecto a qué parámetros de los plasmas utilizados o características inmunológicas de los receptores se podrían asociar con un mayor beneficio de esta intervención. Sí pudimos evidenciar la presencia de IgG anti-RBD a las 24h de la administración del plasma en receptores que no presentaban anticuerpos al momento de la intervención. En la mayoría de los casos estos niveles aumentan en el tiempo, probablemente debido al desarrollo de una respuesta inmune humoral propia, y a los 14 días post transfusión todos los pacientes analizados muestran niveles detectables de anticuerpos IgG específicos contra el RBD de la proteína S. El monitoreo de anticuerpos específicos en los pacientes tratados con plasma convaleciente puede tener varias utilidades. En primer lugar, permite conocer los niveles basales de anticuerpos presentes en el individuo previo a la intervención, siendo más probable que un paciente que no tenga anticuerpos inicialmente o tenga niveles bajos, se beneficie más de este tipo de tratamiento, al tiempo de indicar que probablemente se encuentre en etapas tempranas de la infección. La segunda es que permite evaluar la administración de unidades de plasma adicionales en el tiempo, con la finalidad de mantener los niveles de anticuerpos suministrados exógenamente hasta que el paciente comience a generar anticuerpos específicos propios.

El caso de la paciente doblemente trasplantada de riñón, hospitalizada con COVID-19 y tratada con plasma convaleciente es un ejemplo del uso exitoso de esta terapia. En lo que respecta a la respuesta de anticuerpos se puede observar que al momento de la administración del plasma no fue detectable mediante ELISA la presencia de IgG anti-S, pero sí se observó actividad neutralizante, lo cual se podría atribuir a la presencia de

IgM o IgA específicas. La intervención con plasma provocó un aumento en los niveles de anticuerpos IgG específicos y la capacidad neutralizante en suero, lo cual a su vez se correlacionó con una disminución en la carga viral y en los niveles de citoquinas proinflamatorias. Se ha reportado que en los casos graves de COVID-19, si bien se generan anticuerpos, estos se desarrollan de manera más tardía y lo mismo sucedería en el caso de los pacientes inmunosuprimidos. En estas situaciones, la administración de plasma de sujetos convalecientes podría suplir la no generación de anticuerpos propios en esa ventana de tiempo.

Además de la utilidad de los ensayos serológicos en el contexto de la infección por SARS-CoV-2, los mismos también pueden ser empleados para estudiar la respuesta humoral inducida por las vacunas contra COVID-19. En el momento en el que se comenzó el estudio “Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo”, en el mundo recién se estaban suministrando las primera vacunas contra COVID-19 con autorizaciones de uso de emergencia. Al comienzo de la vacunación contra el SARS-CoV-2 en nuestro país ya había algunos reportes que evidenciaban el desarrollo de anticuerpos en respuesta a la vacunación con BNT16b2, pero qué sucedía en respuesta a la vacunación con CoronaVac era menos evidente. En este contexto decidimos agregar una extracción al programa original de toma de muestras del ensayo para todos aquellos individuos que hubiesen completado un esquema de vacunación primaria con CoronaVac o BNT162b2 y se encontraran en el período de 14 a 21 días luego de la administración de la segunda dosis. Rápidamente evidenciamos que se generaban anticuerpos específicos anti-RBD en respuesta a ambas vacunas en el 100% de los individuos analizados. Los niveles de anticuerpos específicos generados en respuesta a la vacunación eran significativamente más altos que los inducidos por la infección, y los individuos vacunados con BNT162b2 generaban niveles de anticuerpos mayores que aquellos inmunizados con CoronaVac. Con este análisis inicial evidenciamos además que el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA permitía, no solo cuantificar los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD inducidos en respuesta a la infección por SARS-CoV-2, sino también a la vacunación con CoronaVac (Sinovac) y BNT162b2 (Pfizer). Además, los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD expresados en BAU/ml se correlacionaron muy bien con la capacidad neutralizante de los sueros en un ensayo sVNT expresados en UI/ml. Los resultados encontrados en esta población sirvieron además de referencia, permitiéndonos comparar la respuesta a la vacunación en distintos grupos de pacientes con lo que sucedía en un grupo de individuos no inmunosuprimidos y representativos de la población general.

Como ha sido reportado en la bibliografía, cuando evaluamos los niveles de anticuerpos específicos que presentaban los participantes del estudio aproximadamente dos meses y medio después de la vacunación, estos habían decaído de manera significativa. Aunque esto sucedía tanto en aquellos que habían recibido CoronaVac como en los inmunizados con BNT162b2, parecía más preocupante en los primeros, ya que al partir de niveles iniciales más bajos llegaban también a valores inferiores. En función de estos resultados se decidió a nivel gubernamental la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en todos aquellos individuos sanos inmunizados con CoronaVac, lo cual se amplió más adelante a aquellos que habían recibido BNT162b2. En función de esta decisión del MSP, se agregó una nueva etapa de toma de muestra para todos aquellos funcionarios que habían recibido una dosis de refuerzo, desearan conocer sus niveles de anticuerpos, y se encontraran en el lapso de 14-21 días post tercera dosis. La aplicación de una dosis de refuerzo en un esquema de vacunación heteróloga aumentó los niveles de anticuerpos en unas 20 veces temprano luego de la inmunización. Con el transcurso del tiempo y como era esperable los niveles de anticuerpos específicos decaen, pero a valores más altos incluso que los alcanzados luego de la inmunización primaria con CoronaVac. En este trabajo demostramos además que los niveles de IgG anti-RBD correlacionan muy bien con la capacidad del suero de inhibir la interacción RBD-ACE2 en un ensayo sVNT.

A su vez, la aplicación de una tercera dosis también aumentó la capacidad de los sueros de mediar funciones efectoras como ADCP y ADCC en un ensayo reportero, estimulando la generación de anticuerpos polifuncionales. La capacidad de los anticuerpos de mediar funciones efectoras dependientes del Fc es particularmente relevante en el caso de la respuesta a variantes virales ya que esta funcionalidad puede verse menos afectada que la capacidad neutralizante frente a mutaciones en el RBD. Sin embargo, para analizar estos resultados se debe tener presente que en todos los casos se está utilizando RBD como antígeno, por lo cual tiene sentido que haya concordancia en los mismos. Además, se conoce que hay anticuerpos dirigidos contra otras regiones de la proteína S que pueden mediar también funciones efectoras y que no estamos considerando con esta estrategia experimental. En este sentido, hubiese sido interesante evaluar qué hubiera sucedido en estos ensayos si se utilizaban otros antígenos virales o células expresando la proteína S en su superficie, dadas las dificultades de utilizar células infectadas como blanco.

Otro punto sobre el que no profundizamos, pero que generó preocupación en su momento, es qué sucedía con la capacidad de los anticuerpos inducidos por vacunas basadas en la variante original de SARS-CoV-2 de proteger frente a la infección por nuevas variantes virales, como la variante ómicron. Empleando el RBD de la variante ómicron en el ensayo sVNT demostramos que la capacidad de los sueros de inhibir la interacción con este RBD era significativamente menor que la de inhibir la interacción de ACE2 con el RBD de la variante original, sin embargo, esta capacidad se vio incrementada luego de la aplicación de una dosis de refuerzo. Parecería ser que aumentar los niveles de anticuerpos específicos podría ser una estrategia para suplir la pérdida de reactividad frente a variantes virales nuevas del SARS-CoV-2.

En las etapas más tardías del seguimiento se vuelve difícil separar a los participantes en grupos, ya que cada uno presenta un historial muy particular de vacunación e infección. A nivel país se sucedieron dos olas importantes de infección por SARS-CoV-2, una atribuible a la variante P1 y otra a la variante ómicron. Además, aunque se consideraran los diagnósticos confirmados de infección por SARS-CoV-2 no tenemos forma de descartar una infección no diagnosticada a través de un análisis serológico en los participantes vacunados con CoronaVac, ni una nueva infección en aquellos que ya habían cursado la enfermedad. Para suplir esto, consideramos evaluar los niveles de anticuerpos anti-N inmediatamente después de la vacunación con CoronaVac y compararlos con los obtenidos en las subsiguientes extracciones, ya que un incremento sería un indicador de infección probable. Es interesante que en las últimas extracciones parece haber una tendencia a que se homogeneicen los niveles de anticuerpos presentes en los participantes perdiendo importancia el esquema de vacunación original recibido, y seguramente tomando protagonismo la exposición al virus o la aplicación de dosis vacunales de mantenimiento. Sería un punto interesante evaluar qué sucede con la respuesta de los anticuerpos presentes en estas muestras frente a variantes virales más nuevas, como ómicron, y cómo evolucionó esta capacidad de reconocimiento en las sucesivas extracciones, pudiendo servir de insumo para decidir si es necesario aplicar vacunas específicas de variantes en la población.

La administración de las vacunas contra COVID-19 en un contexto de uso de emergencia también generó dudas respecto a su utilidad en poblaciones particulares de individuos que no fueron incluidas en los ensayos clínicos de las mismas, como los

RTOS y los pacientes con ERC. El trabajo colaborativo con el área clínica asistencial y la necesidad de generar a nivel local información que no se encontraba disponible internacionalmente, como el hecho de conocer qué sucedía en respuesta a la vacunación inicial con CoronaVac en pacientes inmunosuprimidos, nos llevó a utilizar el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA para evaluar la respuesta humoral inducida por la vacunación contra COVID-19 en TR, TH y PDC uruguayos.

Si bien reportes iniciales sugerían que los RTOS con COVID-19 severo tenían un riesgo mayor de muerte, múltiples estudios subsecuentes mostraron una tasa de sobrevida similar a la población general cuando los grupos eran correctamente pareados. En este sentido, factores de riesgo como la edad o la presencia de comorbilidades serían determinantes mayores de severidad y muerte frente al COVID-19 en RTOS que factores relacionados con el trasplante en sí, como pudiesen ser el tipo de órgano trasplantado, la inmunosupresión sostenida y el tiempo transcurrido desde el trasplante. Un caso un tanto diferente es el de los pacientes con ERC, en particular aquellos en diálisis crónica, ya que presentan alteraciones inmunológicas asociadas al fallo renal que los predisponen a formas más graves de la enfermedad por COVID-19. Además, se debe tener presente que la población de RTOS y PDC suele tener mayor proporción de individuos que presentan factores de riesgo conocidos para desarrollar COVID-19 severa y morir debido a la enfermedad. Todo esto explicaría que las tasas de ingreso a Unidades de Cuidados Intensivos y muertes debido a la infección por SARS-CoV-2, fuera significativamente superior en estos grupos comparado con la población general, tanto a nivel global como en nuestro país.

A esto se le suma que en los individuos inmunosuprimidos infectados por SARS-CoV-2 se ha demostrado una liberación de partículas virales extendida en el tiempo y una mayor posibilidad de generación de variantes virales, debido a que el control ejercido por la inmunidad en estos pacientes es parcial, lo cual puede tener consecuencias tanto a nivel individual como comunitario.

Por estas razones, los pacientes inmunosuprimidos fueron una población de particular interés para la aplicación de vacunas contra el COVID-19 y han sido priorizados en las campañas de vacunación. Si bien en general la vacunación está recomendada en pacientes inmunosuprimidos, excepto para las vacunas a virus vivo atenuado, la

inmunogenicidad de las vacunas es menor en estos pacientes que en la población general, por lo que pueden requerir de dosis mayores o adicionales para alcanzar los mismos niveles de protección. En nuestro país, y al igual que en diversas partes del mundo, se aplicó en esta población un régimen de vacunación inicial idéntico que el empleado en adultos inmunocompetentes: dos dosis de CoronaVac espaciadas 28 días para aquellos menores de 65 años, y dos dosis de BNT162b2 espaciadas 28 días para aquellos mayores de 65 años o personal de la salud.

Hoy en día, múltiples estudios han mostrado una respuesta subóptima a la vacunación en RTOS y PDC³³³. Mientras que la tasa de seroconversión para RTOS después de la inmunización primaria en general es menor al 58%, existen resultados heterogéneos dependiendo del tipo de órgano trasplantado, la vacuna empleada y las características de la cohorte analizada³³³. Nuestros resultados muestran una tasa de seroconversión en TR de 27,8% con CoronaVac y de 36,5% con BNT162b2, y en TH de 36,5% con CoronaVac y de 72,7% con BNT162b2. En el caso de los PDC, si bien las tasas de seroconversión reportadas internacionalmente son similares a las de la población general, los niveles de anticuerpos alcanzados luego de la vacunación primaria son significativamente más bajos. Nuestros resultados van también en este sentido, con una tasa de seroconversión de 81,3% luego de la vacunación con CoronaVac y 90,4% con BNT162b2. En todos los casos el grupo control presentó una tasa de seroconversión del 100% para ambas vacunas, con niveles de anticuerpos significativamente más altos en aquellos inmunizados con BNT162b2 comparado con los que recibieron un esquema primario con CoronaVac.

Basado en las revisiones sistemáticas y metaanálisis disponibles a agosto de 2023, las tasas de respuesta inmune humoral frente a la vacunación primaria contra COVID-19 en TH varían entre 47,5% y 86,4%³³³. En un metaanálisis que se focaliza exclusivamente en TH y evalúa anticuerpos específicos contra la proteína S o neutralizantes, encuentran que este grupo tiene una tasa de seroconversión menor que la población no trasplantada, con una respuesta inmune humoral promedio del 70% (IC 95% 68-77%) luego de la segunda dosis de vacuna (ARNm, vector viral o inactivada)³⁹⁸. Al momento de realizar nuestro trabajo en TH, existían muy pocos reportes de respuesta a la vacunación con BNT162b2 en esta población, y no se disponía de información respecto a qué sucedía cuando se empleaban vacunas a virus inactivado. En el correr del 2022, un trabajo en TH realizado en China mostró una tasa de seroconversión de 17,14% en

TH un mes luego de la vacunación con CoronaVac³⁹⁹, en otro trabajo reportaron que un 34,78% de los TH participantes vacunados con CoronaVac o BBIBP-CorV presentaban una reacción positiva para la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2⁴⁰⁰, y en un estudio realizado en México un 76,9% de positividad luego de la inmunización con CoronaVac⁸. Para las vacunas a ARNm los metaanálisis disponibles reportan tasas de seroconversión en TH en el rango del 60-70%, cercano a lo observado por nosotros^{353,398,401,402}. A pesar de la gran variabilidad de resultados encontrados, existe acuerdo con respecto a que los TH presentan menores tasas de respuesta y niveles más bajos de anticuerpos frente a la vacunación primaria que la población general. También existe consenso respecto a que los TH muestran tasas de seroconversión y niveles más altos de anticuerpos específicos luego de la vacunación contra COVID-19 que los receptores de trasplante de otros órganos sólidos, como ser los TR.

Con respecto a la eficacia de una tercera dosis de vacuna contra COVID-19 en esta población, hallamos un único metaanálisis que incluye tres estudios observacionales con 151 TH, el cual reportó una tasa de seroconversión del 88% (IC 95% 58-98%)⁴⁰³. En nuestra cohorte encontramos que luego de la aplicación de un esquema de vacunación completo con BNT162b2 (2 dosis) en aquellos TH inmunizados inicialmente con CoronaVac, la tasa de seroconversión fue del 76,9%, contra un 30,8% luego de la vacunación primaria en estos mismos pacientes, destacándose un efecto positivo de la revacunación en este grupo, pero planteando también que a pesar de esto hay un conjunto de pacientes que no desarrollan anticuerpos a niveles detectables. Similar a lo observado en los TR, los TH que presentaban anticuerpos luego de la inmunización primaria, alcanzaron niveles de anticuerpos significativamente más altos luego de la administración de dosis de refuerzo que aquellos que no mostraban una respuesta humoral inicial. Dado el pequeño número de TH con tres dosis de BNT162b2 (n=4) en nuestra cohorte, no podemos sacar conclusiones respecto a la ventaja o no de un esquema de vacunación heteróloga en esta población.

Un elemento central para lograr incrementar la respuesta a la vacunación contra COVID-19 en los RTOS, es comprender cuales son los factores que predisponen a la no respuesta. En este sentido el régimen de inmunosupresión empleado aparece como un factor de relevancia en múltiples trabajos³³⁷. Los estudios que reportan los efectos del uso de corticoesteroides en la respuesta a la vacunación contra COVID-19 en RTOS

son variables³³⁷. En nuestros trabajos no encontramos diferencias significativas asociadas al uso de corticoesteroides. La aplicación de terapias de inducción, incluido el uso de alemtuzumab, timoglobulina, basiliximab y rituximab, se asocian típicamente con bajas tasas de seroconversión y menor respuesta de anticuerpos luego de la vacunación contra COVID-19, siendo responsables, al menos en parte, de la respuesta disminuida que se observa en los pacientes recién trasplantados comparado con aquellos que ya llevaban más tiempo desde el trasplante³³⁷. En este sentido, también encontramos una asociación entre el tiempo transcurrido desde el trasplante y la respuesta de anticuerpos generada frente a la vacunación. En el caso de los TH, de los 8 pacientes que se encontraban en el primer año post-trasplante, 7 fueron negativos para la presencia de anticuerpos luego de la vacunación primaria, aunque esta asociación no fue significativa, seguramente debido al bajo número de pacientes en esta situación. En el caso de lo TR los pacientes que presentaban anticuerpos luego de la aplicación de dos dosis de vacuna presentaban un tiempo desde el trasplante significativamente mayor que en los que no se observó respuesta. Solo 3 pacientes TR se encontraban bajo tratamiento con rituximab, siendo todos seronegativos, y 38 con timoglobulina, de los cuales 29 no presentaron niveles de anticuerpos detectables después de la vacunación primaria. La menor respuesta a la vacunación en etapas tempranas luego del trasplante parece en nuestro caso estar más asociada a la utilización de dosis más altas de inmunosupresores y terapia de triple inmunosupresión que al tipo de agente empleado.

Dentro de los regímenes de mantenimiento, el uso de azatioprina e inhibidores de calcineurina se han asociado con una baja respuesta de anticuerpos frente a la aplicación de dos dosis de vacunas de ARNm en RTOS^{333,337}. El uso de micofenolato de mofetilo, particularmente en altas dosis y en regímenes de triple inmunosupresión, se asocia fuertemente con menores tasas de seroconversión y una respuesta humoral más débil a la vacunación contra COVID-19 en RTOS³³⁷. Esto concuerda con lo observado por nosotros para ambos grupos de trasplantados y frente a la aplicación de distintos esquemas de vacunación. En el caso de los TR, los pacientes que se encuentran bajo tratamiento con esta droga no presentan anticuerpos luego de la aplicación de dosis de refuerzo, o lo hacen recién después de una tercera o cuarta dosis, siendo además un predictor de niveles menores a 264 BAU/ml de IgG anti-RBD. En este contexto, aparece como una alternativa interesante el uso de everolimus, el cual en nuestra cohorte de TR se ha asociado a mayores tasas de seroconversión, tanto frente a la vacunación primaria como a la aplicación de dosis extras. En otro trabajo se reportó

una tasa de seroconversión del 100% en RTOS bajo tratamiento con everolimus comparado con 38% para micofenolato de mofetilo, y niveles más altos de anticuerpos luego de 3 dosis de vacuna. En conclusión, parece claro que el nivel de inmunosupresión y la terapia empleada tiene un impacto significativo en la respuesta a la vacunación contra COVID-19 en RTOS, planteándose el cambio temporal de los fármacos utilizados como una posible intervención para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas en aquellos pacientes no respondedores. Si bien en nuestras cohortes no predomina el uso de agentes depletantes de linfocitos, parece interesante conocer qué sucede con la respuesta a las vacunas en pacientes uruguayos que se encuentran bajo tratamiento con rituximab, por ejemplo.

Otro factor que encontramos asociado a una respuesta disminuida a la vacunación, tanto en trasplantados como en pacientes en diálisis, es una menor tasa de filtrado glomerular, indicador de enfermedad renal, la cual se asocia típicamente a una respuesta inmunológica disminuida. En línea con esto, también encontramos una asociación entre un menor recuento linfocitario y una peor respuesta a la vacunación primaria en TR, y aunque no significativo, la misma tendencia frente a la aplicación de dosis de refuerzo en este grupo. En un trabajo publicado recientemente, donde se profundizó en la caracterización de poblaciones celulares del sistema inmune, mostramos que un número bajo de células B memoria que presentaban cambio de clase se asociaba a la no respuesta de anticuerpos en nuestra cohorte de TR (Anexo I-8.4).

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad renal se asocia al fenómeno de inmunosenescencia acelerada, por lo que la “edad inmunológica” puede ser mayor que la edad numérica y un mejor predictor de una menor respuesta a la vacunación. En el caso de los TR la edad numérica se encontró como un factor predictor de peor respuesta a las vacunas contra COVID-19. Se ha reportado que la población añosa presenta una respuesta subóptima frente a la vacunación contra COVID-19 que decae más rápidamente con el tiempo, reforzando la idea de que un sistema inmunitario envejecido puede dictar la respuesta o no a la vacunación⁴⁰⁴.

En este trabajo se analizó únicamente la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación. Si bien la generación de anticuerpos parece ser un buen correlato de protección inmunológica frente a la infección por SARS-CoV-2, la inducción de una

respuesta inmune celular se ha asociado con un riesgo menor de desarrollar formas graves de la enfermedad. En este sentido, algunos trabajos reportan la generación de linfocitos T específicos en respuesta a la vacunación contra COVID-19 incluso en individuos que no presentan niveles detectables de anticuerpos⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷. Estudiar la respuesta inmune celular estimulada por los diferentes regímenes de vacunación en estos grupos hubiese sido un excelente complemento para abordar el problema en su completitud.

Más allá de los resultados obtenidos, que permitieron conocer la realidad nacional en cuanto a la respuesta inmunitaria generada frente a la vacunación contra COVID-19 en poblaciones vulnerables, y que sirvieron de insumo para la implementación de políticas de vacunación durante la pandemia por SARS-CoV-2 en nuestro país, es relevante destacar que este tipo de trabajos ponen de manifiesto las capacidades de las cuales dispone el Uruguay, cuando se trabaja en conjunto, para abordar y dar seguimiento a problemas de salud pública desde la soberanía nacional.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

A partir del trabajo conjunto de un grupo de investigadores de la UdelaR y el IP Montevideo se desarrollaron tres versiones de un ensayo serológico de tipo ELISA indirecto para la detección cualitativa o cuali/cuantitativa de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 en muestras de suero o plasma humano (COVID-19 IgG ELISA UY, COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y COVID-19 IgG QUANT ELISA), los cuales fueron llevados a un formato de kit comercial por la compañía ATGen y validados para su utilización por el DLSP.

El ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, basado en el antígeno RBD producido en células de insecto en nuestro laboratorio, mostró una alta sensibilidad y especificidad, 88.6% (IC 95% 84,8%-91,7%) y 99,3% (IC 95% 97,6%-99,9%), con una capacidad diagnóstica similar e incluso superior a la de otros ensayos comerciales ampliamente utilizados, para muestras obtenidas a partir de los 8 días del comienzo de síntomas. Además, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el resultado de este ensayo expresado en ratio M/CO y la capacidad de los sueros de inhibir la interacción entre el RBD y ACE2 en un ensayo de tipo sVNT.

Este ensayo se adaptó para generar una versión cuantitativa (COVID-19 IgG QUANT ELISA) a partir de la utilización del estándar internacional de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 y un panel de muestras de referencia del NIBSC permitiendo expresar los resultados de niveles de anticuerpos en BAU/ml. Para este ensayo también se demostró una buena correlación entre los niveles de IgG anti-RBD expresados en BAU/ml y los niveles de anticuerpos neutralizantes presentes determinados mediante un ensayo sVNT cuantitativo.

Estos ensayos de ELISA mostraron también una buena performance en territorio siendo exitosamente utilizados para la realización de ensayos de seroprevalencia, conformación de un banco de plasma convaleciente COVID-19 y monitoreo de la respuesta inmune humoral desarrollada en pacientes en respuesta a la infección por SARS-CoV-2.

El ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA también fue utilizado para la cuantificación y seguimiento en el tiempo de la respuesta de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación contra COVID-19 en diferentes grupos, favoreciendo la toma de decisiones de salud pública basadas en evidencia propia.

Luego de la vacunación con dos dosis de CoronaVac o BNT162b2 se encontró un 100% de seroconversión en la población general. En el caso de pacientes inmunosuprimidos este porcentaje fue menor, con tasas de seroconversión global del 29% en TR, 41,2% en TH y 85,9% en PDC. Las tasas de seroconversión tendieron a ser más altas en aquellos inmunizados con BNT162b2 que en los que recibieron CoronaVac, 36,5% vs. 27,8% en TR, 72,7% vs. 36,5% en TH y 90,4% vs. 81,3% en PDC.

Los niveles de anticuerpos alcanzados luego de la vacunación fueron menores en los vacunados con CoronaVac en comparación con los que recibieron BNT162b2 para todos los grupos, y a su vez fueron inferiores en los trasplantados y pacientes en diálisis comparado con la población general. La media de anticuerpos en aquellos que recibieron BNT162b2 fue del 173 BAU/ml en TR, 66 BAU/ml en TH, 442 BAU/ml en PDC contra 3179 BAU/ml en el grupo control; y en el caso de CoronaVac de 29 BAU/ml en TR, 2 BAU/ml en TH, 83 BAU/ml en PDC y 403 BAU/ml en la población general. Estos resultados sostenían la noción de que estos grupos de pacientes necesitaban de un régimen de vacunación especial contra COVID-19 y se decidió la aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en aquellos individuos inmunosuprimidos vacunados inicialmente con esta misma vacuna y la revacunación con BNT162b2 en aquellos que habían sido inmunizados con CoronaVac.

Al finalizar los esquemas de vacunación heteróloga y homóloga la tasa de seroconversión en TR fue de 71,7% y 70,6%, respectivamente, y de 100% y 97,4% en PDC. En TH la tasa global de seroconversión luego de la administración de dosis de refuerzo fue de un 71,4%.

Los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD específicos alcanzados al finalizar la inmunización en TR dependieron del número de dosis necesarias para la seroconversión, siendo significativamente mayores en el grupo que seroconvirtió

después de dos dosis (2D) vs. 3D y 4D, para todos los puntos de medida, en ambos esquemas de vacunación. En TH aquellos que habían respondido a la inmunización primaria presentaron niveles de anticuerpos más altos que los seronegativos frente al finalizar el esquema de refuerzo.

Los niveles de anticuerpos aumentan significativamente luego de la administración de dosis de refuerzo en todos los grupos, con una tendencia a que los niveles de anticuerpos sean más altos en aquellos que recibieron un régimen de vacunación heteróloga vs. homóloga. Las medias en TR fueron de 2682 BAU/ml vs. 1225 BAU/ml, en el grupo 2D, y 186 BAU/ml vs. 37 BAU/ml, en el grupo 3D, respectivamente. Y para PDC de 4356 BAU/ml vs. 2728 BAU/ml.

En la cohorte de población sana se mostró que a los 80 días post vacunación, si bien todos los participantes permanecían seropositivos, los niveles de anticuerpos específicos habían caído a niveles significativamente menores, 113 BAU/ml vs 403 BAU/ml iniciales. En este contexto se extendió la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 a toda la población inicialmente vacunada con CoronaVac.

Dos semanas luego de la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en la población general inmunizada con CoronaVac los niveles de anticuerpos anti-RBD ascendieron, alcanzando una media de 8877 BAU/ml, lo que representa un incremento de unas 50 veces respecto a los valores encontrados luego de la vacunación inicial. Transcurridos dos meses los valores vuelven a descender, pero con una media de 2622 BAU/ml.

La capacidad de los sueros de inhibir la interacción RBD-ACE2 evidenciada a través de un ensayo sVNT empleando el RBD de la variante ancestral, y de mediar funciones efectoras dependientes del Fc como ADCP y ADCC mostró una dinámica similar a la exhibida por los niveles de anticuerpos. Los sueros obtenidos luego de la aplicación de una dosis de refuerzo mostraron una capacidad mayor que luego de la inmunización primaria de inhibir al RBD de la variante Ómicron, aunque esta fue significativamente menor que lo observado con la variante original.

A pesar de la administración de un esquema vacunal de refuerzo algunos pacientes inmunosuprimidos siguen sin mostrar niveles detectables de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2. Las variables asociadas a la no seroconversión luego de la vacunación primaria fueron la edad, estar bajo triple inmunosupresión, la tasa de filtrado glomerular estimada y el tiempo transcurrido desde el trasplante en el caso de los TR, y una reducción en el filtrado glomerular en TH. En el caso de los TR el tiempo desde el trasplante y encontrarse bajo tratamiento con micofenolato de mofetilo se asoció con presentar un nivel de anticuerpos inferior a 264 BAU/ml luego de la aplicación de un esquema vacunal de refuerzo.

5.2 Perspectivas

Además de los resultados obtenidos es importante destacar cómo el trabajo conjunto y coordinado entre diferentes actores: investigadores, clínicos, pacientes y tomadores de decisión, tuvo un efecto sinérgico y permitió, incluso en un contexto de pandemia, dar respuestas rápidas a problemas relevantes para la realidad nacional. Toda esta experiencia podría ser aplicada no solo frente a patógenos emergentes sino también a problemas de salud pública actuales que permanecen desatendidos.

Una vez pasada la epidemia y en la situación actual, con una circulación endémica del SARS-CoV-2 las aplicaciones de los ensayos serológicos se transforman. Una aplicación que surge naturalmente es su utilización para evaluar los niveles de anticuerpos específicos en la población a través de estudios de seguimiento en el tiempo, como una forma de monitorear los niveles globales de inmunidad frente al SARS-CoV-2 y eventualmente definir la necesidad o no de dosis vacunales de refuerzo. En este escenario la adaptación de estos ensayos para evaluar la reactividad de los anticuerpos frente a variantes virales parece fundamental, pudiendo dar respuesta rápida sobre el reconocimiento o no por parte de la inmunidad generada por las vacunas y exposiciones previas al virus frente a nuevas VOCs que puedan emerger.

La aplicación indiscriminada de dosis de refuerzo vacunales en poblaciones vulnerables también podría ser sustituida por una decisión racional basada en la determinación de los niveles de anticuerpos específicos que presenta cada individuo mediante la aplicación de ensayos como el desarrollado por nosotros. Si bien no contar aún con un

valor que sirva de correlato de protección inmunológico dificulta este abordaje, se podría llegar a un consenso con respecto a valores de corte.

Los ensayos serológicos también podrían tener su lugar para abordar algunas de las consecuencias de la infección por SARS-CoV-2, como el COVID persistente.

-

6. METODOLOGÍA SUPLEMENTARIA

En esta sección se describen de manera concisa los materiales y metodologías que no se encuentran comprendidos dentro de las publicaciones científicas ya que corresponde a resultados no publicados.

6.1. Obtención de muestras de suero de pacientes convalecientes de COVID-19 y sueros humanos preandémicos para la optimización de inmunoensayos

Previo firma de consentimiento informado, se realizó una extracción de sangre periférica a pacientes que hubieran cursado COVID-19 con diagnóstico confirmado mediante PCR y alta médica de la enfermedad. A partir de 5 ml de sangre obtenida mediante venopunción en tubo seco, se separaron alícuotas de suero, las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. Se recolectaron datos demográficos de los pacientes, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 o comienzo de síntomas, y manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las muestras fueron anonimizadas mediante codificación. Se emplearon como control sueros de descarte provistos por el SNS de individuos que concurrieron a donar sangre en el año 2018, previo al surgimiento del SARS-CoV-2. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética en la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Español y fue registrado bajo el Nro. 529973 en el MSP.

6.2. Producción de RBD recombinante

Para la producción del RBD de SARS-CoV-2 en células de mamífero (mRBD) se utilizó el vector pCAGGS conteniendo la secuencia correspondiente al RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 de la cepa Wuhan-Hu-1 con un *tag* de Hexa-histidina en el C terminal, provisto por el grupo de Florian Krammer (Disponible en el repositorio de BEI, #NR-52309). El uso de codones en la secuencia había sido optimizado para su expresión en células de mamífero. Para la expresión y purificación de esta proteína a partir de células HEK293F se siguió una adaptación de un protocolo previamente reportado³⁸⁷.

En el caso de la expresión en células S2 de *Drosophila Melanogaster* el proceso de clonado, expresión y purificación se describe de manera detallada en el trabajo de

Carrion et al³⁸⁹ (Anexo I-8.2). Brevemente, se fusionó la secuencia correspondiente al RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 de la cepa Wuhan optimizada para el uso de codones en *Drosophila* con un sitio de corte para enteroquinasa seguido de un Twin-Strep-Tag (IBA) en el C terminal y se clonó en el vector de expresión pMT/V5-His. Se generaron líneas celulares S2 expresando RBD-ST de manera estable. A partir del sobrenadante de cultivo de estas células se purificó la proteína RBD-ST por cromatografía de afinidad y se cortó el Twin-Strep-Tag mediante agregado de enteroquinasa, por último, se removió el tag mediante una segunda cromatografía de afinidad obteniendo el iRBD puro.

6.3. ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en suero humano

Se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner High Binding, Sigma, Nro. cat. M4561) con 100 µl/pocillo de una solución de mRBD a 1 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Se descartó la solución de sensibilización y se realizaron 5 lavados con 300 µl de una solución de PBS-Tween 0,2%. Se incubaron 250 µl/pocillo del agente bloqueante PBS-Seroalbúmina bovina (BSA) 1% por 1 h a temperatura ambiente (TA). Se realizaron nuevamente 5 lavados. Se prepararon diluciones de las muestras de suero a analizar en una solución PBS-BSA 1%-Tween 0,2%-5% Suero normal de cabra (SNC), se colocaron 100 µl en cada pocillo y se incubó la placa por 1 h a TA con agitación. Transcurrido este tiempo se descartó el contenido y se realizaron 6 lavados. Se sembraron 100 µl por pocillo de un anticuerpo anti-IgG humana-HRP (Sigma, Nro. Cat. AP113P) diluido 1/50000 en PBS-BSA 1%-Tween 0,2%, y se incubó 30 minutos a TA con agitación. Se realizaron 8 lavados y se colocaron 100 µl/pocillo de una solución de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, Nro. Cat. T0440), se incubó por 10 minutos a TA con agitación, protegido de la luz. Finalmente, se detuvo la reacción mediante el agregado de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N, y se realizó la lectura bicromática de absorbancia a 450nm con corrección a 620 nm en lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

6.4. Ensayos serológicos comerciales empleados para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2

Se emplearon los ensayos de ELISA listados en la Tabla 8 siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes, con las siguientes modificaciones: en el caso del COVIDAR IgG las muestras de suero se analizaron a una dilución 1:200 o por titulación a dilución límite; en el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 las muestras se analizaron a una dilución 1:10, salvo que se especifique que se realizó otra dilución (1:50 o 1:100).

Tabla 8. Lista de ensayos serológicos utilizados en el presente trabajo

Ensayo	Antígeno	Isotipo	Formato
Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun)	S1	IgG	ELISA
Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) (Euroimmun)	S1	IgG	ELISA (cuantitativo)
COVIDAR IgG	Spike/RBD	IgG	ELISA
COVID-19 IgG ELISA UY	RBD (mamífero)	IgG	ELISA
COVID-19 IgG ELISA UY 2.0	RBD (insecto)	IgG	ELISA
COVID-19 IgG QUANT ELISA	RBD (insecto)	IgG	ELISA (cualitativo/ cuantitativo)
cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (GenScript)	RBD, ACE2	Total	sVNT
SARS-CoV-2 Antibody Test Strip (Sinocare)	No especificado	IgM/IgG	LFI
Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA (DRG)	N	IgG	ELISA

6.5. Análisis serológico de muestras de suero mediante tiras reactivas

Se analizaron muestras de suero control y de pacientes recuperados de COVID-19 mediante el empleo del ensayo *SARS-CoV-2 Antibody Test Strip* (Sinocare), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se colocaron 10 µl de suero en la tira y transcurridos 15 minutos se realizó su lectura por parte de tres observadores independientes que desconocían la identidad de la muestra. Se realizó además un registro fotográfico de todas las tiras a los 15 minutos de reacción. En caso de discordancia entre los observadores se le adjudicó el resultado indicado por la mayoría.

6.6. Determinación de los parámetros diagnósticos de los ensayos serológicos

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), e índice de Youden (J), empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

$$\text{Especificidad} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

$$\text{VPP} = 100 * (\text{Prevalencia} * \text{Sensibilidad}) / (\text{Prevalencia} * \text{Sensibilidad} + ((1 - \text{Prevalencia}) * (1 - \text{Especificidad})))$$

$$\text{VPN} = 100 * ((1 - \text{Prevalencia}) * \text{Especificidad}) / ((1 - \text{Prevalencia}) * \text{Especificidad} + (\text{Prevalencia} * (1 - \text{Sensibilidad})))$$

$$\text{J} = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

VP, verdadero positivo. FN, falso negativo. VN, verdadero negativo. FP, falso positivo. Las muestras que resultaron como indeterminadas se consideraron negativas para este análisis. En cada figura se especifica el valor de seroprevalencia utilizado para calcular el VPP y VPN. Para establecer el nivel de correlación entre los resultados de dos ensayos se calculó el coeficiente de correlación de Spearman con un intervalo de confianza del 95%. Las curvas ROC se realizaron utilizando un intervalo de confianza del 95% empleando el método Wilson/Brown, y los resultados se reportaron como porcentaje. Para estos análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 10.0.

6.7. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero del personal de la salud de la ciudad de Rivera

En el marco del trabajo titulado “Estudio de seroprevalencia contra el SARS-CoV-2 en personal de salud de Rivera” se recibieron 1204 sueros derivados de muestras de sangre obtenidas mediante venopunción en tubo seco. Las muestras correspondientes al personal de tres de los principales prestadores de salud de la ciudad de Rivera (ASSE, Casmer y Comeri) fueron obtenidas en el mes de febrero de 2021 previa firma de consentimiento informado. Se determinó la presencia de anticuerpos IgG anti-RBD mediante el empleo del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 de acuerdo con las instrucciones provistas en el kit. En las muestras positivas en este primer análisis se determinaron los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en BAU/ml

empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA. En la segunda etapa de este estudio se analizaron 394 muestras de suero provenientes de esta misma población extraídas en los meses de octubre y noviembre de 2021, posteriores a la vacunación, empleando el ensayo COVID-19 IgG QUANT ELISA. Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos expresados en BAU/ml y se consideraron como negativas todas las muestras que presentaron menos de 10 BAU/ml. Los datos se analizaron utilizando el programa Graphpad Prism 10.0.

6.8. Ensayo de tamizaje para la categorización de candidatos a donantes de plasma convaleciente COVID-19

Se analizaron muestras de suero remitidas por el SNS y el Hemocentro de Maldonado correspondientes a candidatos a donantes de plasma convaleciente COVID-19 y de donantes efectivos. Se empleó el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 de acuerdo con las instrucciones provistas en el kit, con la salvedad de que se utilizó una dilución 1:100 de las muestras. Los resultados del análisis se reportaron a los centros como ratio M/CO, los sueros con un ratio M/CO mayor a 2,8 fueron considerados de alto título de anticuerpos específicos.

6.9. Ensayo de activación de células NK dependiente de anticuerpos

Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) humanas a partir de cámaras de reducción de leucocitos (LRSC, *Leukocyte reduction system chambers*) o “*buffy cones*” gentilmente proporcionadas por el SNS. Brevemente, el contenido de la cámara se llevó a un volumen final de 50 ml empleando una solución de PBS-EDTA 2mM, se colocaron 15 ml de Histopaque en un tubo de 50 ml y se agregaron lentamente 25 ml de la sangre diluida. Se centrifugó por 35 minutos a TA y 400 xg sin freno, luego se descartó la capa de plasma y se recuperó la sección correspondiente a las PBMCs. Se realizaron 3 lavados de la fracción celular con PBS-EDTA 2mM-BSA 0,1% y se resuspendieron las células en medio de cultivo para su utilización inmediata en el ensayo o se congelaron en RPMI-20%SFB-10%DMSO para su utilización posterior.

Se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner High Binding, Sigma, Nro. cat. M4561) con 100 µl/pocillo de una solución de iRBD a 4 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Se lavó la placa y se incubaron los sueros de interés por 2 h a 37°C.

Transcurrido este tiempo se procedió al lavado de la placa y se agregaron 1×10^6 PBMCs por pocillo en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo, en cada pocillo se agregó también 1 μ l del anticuerpo anti-CD107-PE (Biolegend), transcurrida 1 h de cultivo se agregó una solución de monensina y brefeldina y se incubaron las células por 3 h más a 37°C y 5% de CO₂ protegidas de la luz. Se recuperaron las células y se procedió al marcado con la sonda de viabilidad Zombie Yellow (Biolegend), se bloquearon los receptores Fc con el reactivo Human TrueStain FcX (Biolegend) y se agregaron los anticuerpos anti-CD3-FITC, anti-CD56-Pacific Blue y anti-CD16-PerCP (Biolegend). Las células se fijaron con una solución de PFA 4% y se mantuvieron en una solución de PBE-PFA 0,25% hasta su adquisición en el citómetro Attune NxT (Thermo). Los datos de citometría se analizaron utilizando el programa FlowJo, LLC (BD). Se realizó una primera estrategia de selección por morfología y se seleccionaron las células únicas, luego se comparó el porcentaje de células CD107+ dentro de la población de células NK (CD56+CD3-) vivas (Zombie Yellow -) empleando el programa GraphPad Prism 10.0.

6.10. Determinación de los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-RBD en el suero de pacientes transfundidos con plasma convaleciente COVID-19

Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes tratados con plasma convaleciente COVID-19 inmediatamente antes de la transfusión, y 24 h, 7 d, 14 d y 28 d luego de esta empleando el ensayo COVID-19 IgG Quant ELISA.

6.11. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de funcionarios del IP Montevideo

Se realizaron cinco extracciones de sangre periférica en tubo seco a integrantes del personal del IP Montevideo programadas en el correr de los años 2021 y 2022, y dos extracciones extra, una luego de culminado el esquema de vacunación primaria (Extracción 2D) y otra luego de la aplicación de una primera dosis de refuerzo (Extracción 3D). La participación fue voluntaria, previa firma de consentimiento informado, y abierta a todos los integrantes del instituto sin restricciones, permitiéndose la incorporación de nuevos participantes al estudio en cualquiera de sus etapas. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Investigación (CEI) del IP

Montevideo (CEI 001-2021) y fue registrado bajo el Nro. 956220 en el MSP. A partir de estas muestras se separó el suero y se determinó la presencia de anticuerpos específicos IgG anti-RBD. Las muestras obtenidas en la extracción A se analizaron empleando el ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y se determinaron los niveles de anticuerpos expresados en BAU/ml en aquellas que resultaron positivas empleando el ensayo COVID-19 IgG Quant ELISA. En el resto de las extracciones las muestras se analizaron directamente empleando el ELISA cuantitativo y se consideraron como negativas aquellas que presentaron un resultado menor a 10 BAU/ml. En algunas de las etapas de extracción se solicitó a los participantes que completaran un formulario para recabar datos demográficos y relacionados con el historial de infección y vacunación contra SARS-CoV-2. Tanto los datos como las muestras fueron anonimizados para su análisis, y los resultados de niveles de anticuerpos fueron devueltos a cada uno de los participantes una vez realizado el ensayo en forma individual por los responsables del proyecto.

6.12. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de TH luego de la administración de dosis vacunales de refuerzo contra COVID-19

Se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos en muestras de suero de TH luego de la aplicación de una dosis de refuerzo con BNT162b2 en aquellos inmunizados inicialmente con esta vacuna, y luego de la revacunación con BNT162b2 en aquellos vacunados inicialmente con CoronaVac, empleando el ensayo COVID-19 IgG Quant ELISA. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism 10.0. El proyecto contó con el aval del CEI institucional y fue registrado en el MSP.

6.13. Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-RBD en el suero de PDC luego de la aplicación de vacunas contra COVID-19

Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos anti-RBD de SARS-CoV-2 en muestras de suero de pacientes en hemodiálisis o en diálisis peritoneal pertenecientes a los centros de diálisis del Hospital de Clínicas y el CASMU (CASMU IAMPP) empleando el ensayo COVID-19 IgG Quant ELISA. La participación fue voluntaria, previa firma de un consentimiento informado. El estudio contó con el aval del CEI

institucional y fue registrado en el MSP. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con diagnóstico previo de infección por SARS-CoV-2 o sospecha clínica de infección al momento de la primera extracción. Los participantes diagnosticados con COVID-19 en el transcurso del estudio no fueron excluidos, pero se dejó registro de la infección. Se realizaron cinco extracciones entre junio de 2021 y agosto de 2022, la extracción A fue realizada tempranamente luego de completada la vacunación primaria con CoronaVac o BNT162b2, la extracción B fue realizada previo a la administración de dosis vacunales de refuerzo, la extracción C fue llevada adelante luego de la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 y la extracción D fue realizada luego de la administración de una segunda dosis de refuerzo con BNT162b2 en aquellos inmunizados inicialmente con CoronaVac. Por último, se realizó una quinta extracción en agosto de 2022 con el objetivo de analizar la evolución de los niveles de anticuerpos en el tiempo y luego de la aplicación de una quinta dosis de vacuna la cual no es analizada en este trabajo. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad Prim 10.0.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology* vol. 19 155–170 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6> (2021).
2. Zhang, Y. Z. & Holmes, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* **181**, 223–227 (2020).
3. Mistry, P. *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Frontiers in Immunology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.809244> (2022).
4. Xiao, K. *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* **583**, 286–289 (2020).
5. Shi, J. *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. <https://www.science.org>.
6. Oreshkova, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
7. Sit, T. H. C. *et al.* Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* **586**, 776–778 (2020).
8. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* **395**, 565–574 (2020).
9. Chan, J. F. W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* **9**, 221–236 (2020).
10. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
11. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. & Garry, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* vol. 26 450–452 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9> (2020).
12. Coutard, B. *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* **176**, (2020).
13. Wrobel, A. G. *et al.* SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 763–767 (2020).
14. Walls, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).
15. Shang, J. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* **581**, 221–224 (2020).
16. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* **5**, 562–569 (2020).

17. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **94**, (2020).
18. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
19. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. doi:10.1073/pnas.2003138117/-/DCSupplemental.
20. Ou, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **11**, (2020).
21. Lukassen, S. *et al.* SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells . *EMBO J* **39**, (2020).
22. Sungnak, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* **26**, 681–687 (2020).
23. Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R. & Daniel, S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res* **178**, 104792 (2020).
24. Fan, X., Cao, D., Kong, L. & Zhang, X. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. *Nat Commun* **11**, 3618 (2020).
25. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 11727–11734 (2020).
26. Kim, D. *et al.* A high-resolution temporal atlas of the SARS-CoV-2 transcriptome and transcriptome. *Nat Commun* **12**, 5120 (2021).
27. Finkel, Y. *et al.* The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature* **589**, 125–130 (2021).
28. Yadav, R. *et al.* Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* **10**, 821 (2021).
29. Klein, S. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* **11**, 5885 (2020).
30. Cortese, M. *et al.* Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe* **28**, 853-866.e5 (2020).
31. Ghosh, S. *et al.* β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell* **183**, 1520-1535.e14 (2020).
32. Sanche, S. *et al.* High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis* **26**, 1470–1477 (2020).
33. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
34. Zhang, W. *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* **9**, 386–389 (2020).

35. Gao, Y. *et al.* Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* **76**, 428–455 (2021).
36. Puhach, O., Meyer, B. & Eckerle, I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol* (2022) doi:10.1038/s41579-022-00822-w.
37. Fernandes, Q. *et al.* Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann Med* **54**, 524–540 (2022).
38. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA* **323**, 1239 (2020).
39. Williamson, E. J. *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430–436 (2020).
40. Hilbrands, L. B. *et al.* COVID-19-related mortality in kidney transplant and dialysis patients: Results of the ERACODA collaboration. *Nephrology Dialysis Transplantation* **35**, 1973–1983 (2020).
41. Cravedi, P. *et al.* COVID-19 and kidney transplantation: Results from the TANGO International Transplant Consortium. *American Journal of Transplantation* **20**, 3140–3148 (2020).
42. Crespo, M. *et al.* Respiratory and Gastrointestinal COVID-19 Phenotypes in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2225–2233 (2020) doi:10.1097/TP.0000000000003413.
43. Jager, K. J. *et al.* Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe. *Kidney Int* **98**, 1540–1548 (2020).
44. Elias, M. *et al.* COVID-19 infection in kidney transplant recipients: Disease incidence and clinical outcomes. *Journal of the American Society of Nephrology* **31**, 2413–2423 (2020).
45. Raja, M. A. *et al.* COVID-19 in solid organ transplant recipients: A systematic review and meta-analysis of current literature. *Transplantation Reviews* vol. 35 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trre.2020.100588> (2021).
46. Kremer, D. *et al.* A systematic review and meta-analysis of COVID-19 in kidney transplant recipients: Lessons to be learned. *American Journal of Transplantation* **21**, 3936–3945 (2021).
47. Trapani, S. *et al.* Incidence and outcome of SARS-CoV-2 infection on solid organ transplantation recipients: A nationwide population-based study. *American Journal of Transplantation* **21**, 2509–2521 (2021).
48. Mohan, S., King, K. L., Husain, S. A. & Schold, J. D. COVID-19-associated mortality among kidney transplant recipients and candidates in the United States. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 1695–1703 (2021).
49. Goffin, E. *et al.* COVID-19-related mortality in kidney transplant and haemodialysis patients: A comparative, prospective registry-based study. *Nephrology Dialysis Transplantation* **36**, 2094–2105 (2021).
50. 1-s2.0-S0302283820304656-main. doi:10.1016/j.eururo.2020.06.036.

51. Thauinat, O. *et al.* IMPact of the COVID-19 epidemic on the moRTAlity of kidney transplant recipients and candidates in a French Nationwide registry sTudy (IMPORTANT). *Kidney Int* **98**, 1568–1577 (2020).
52. Kim, W. & Wang, T. C. Reply. *Gastroenterology* vol. 161 727–728 Preprint at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.04.027> (2021).
53. Demir, E. *et al.* COVID-19 in kidney transplant recipients: A multicenter experience in Istanbul. *Transplant Infectious Disease* **22**, (2020).
54. Rodriguez-Cubillo, B. *et al.* Should cyclosporine be useful in renal transplant recipients affected by SARS-CoV-2? *American Journal of Transplantation* **20**, 3173–3181 (2020).
55. Belli, L. S. *et al.* Protective Role of Tacrolimus, Deleterious Role of Age and Comorbidities in Liver Transplant Recipients With Covid-19: Results From the ELITA/ELTR Multi-center European Study. *Gastroenterology* **160**, 1151-1163.e3 (2021).
56. Guisado-Vasco, P. *et al.* Clinical characteristics and outcomes among hospitalized adults with severe COVID-19 admitted to a tertiary medical center and receiving antiviral, antimalarials, glucocorticoids, or immunomodulation with tocilizumab or cyclosporine: A retrospective observational study (COQUIMA cohort). *EClinicalMedicine* **28**, (2020).
57. Ortiz, A. *et al.* Chronic kidney disease is a key risk factor for severe COVID-19: a call to action by the ERA-EDTA. *Nephrology Dialysis Transplantation* **36**, 87–94 (2021).
58. Geetha, D. *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the kidney community: lessons learned and future directions. *Nat Rev Nephrol* (2022) doi:10.1038/s41581-022-00618-4.
59. Jager, K. J. *et al.* Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe. *Kidney Int* **98**, 1540–1548 (2020).
60. Hilbrands, L. B. *et al.* COVID-19-related mortality in kidney transplant and dialysis patients: results of the ERACODA collaboration. *Nephrology Dialysis Transplantation* **35**, 1973–1983 (2020).
61. Alberici, F. *et al.* A report from the Brescia Renal COVID Task Force on the clinical characteristics and short-term outcome of hemodialysis patients with SARS-CoV-2 infection. *Kidney Int* **98**, 20–26 (2020).
62. Ng, J. H. *et al.* Outcomes of patients with end-stage kidney disease hospitalized with COVID-19. *Kidney Int* **98**, 1530–1539 (2020).
63. Couchoud, C. *et al.* Low incidence of SARS-CoV-2, risk factors of mortality and the course of illness in the French national cohort of dialysis patients. *Kidney Int* **98**, 1519–1529 (2020).
64. De Meester, J. *et al.* Incidence, Characteristics, and Outcome of COVID-19 in Adults on Kidney Replacement Therapy: A Regionwide Registry Study. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, 385–396 (2021).
65. Semenzato, L. *et al.* Chronic diseases, health conditions and risk of COVID-19-related hospitalization and in-hospital mortality during the first wave of the epidemic in France:

- a cohort study of 66 million people. *The Lancet Regional Health - Europe* **8**, 100158 (2021).
66. Williamson, E. J. *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430–436 (2020).
 67. Jiang, H.-J. *et al.* COVID-19 in Peritoneal Dialysis Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 121–123 (2021).
 68. Sachdeva, M. *et al.* COVID-19 in Hospitalized Patients on Chronic Peritoneal Dialysis: A Case Series. *Am J Nephrol* **51**, 669–674 (2020).
 69. Keller, N. *et al.* Impact of first-wave CORonaVirus disease 2019 infection in patients on haemoDIALysis in Alsace: the observational COVIDIAL study. *Nephrology Dialysis Transplantation* **35**, 1338–1411 (2020).
 70. Lano, G. *et al.* Risk factors for severity of COVID-19 in chronic dialysis patients from a multicentre French cohort. *Clin Kidney J* **13**, 878–888 (2020).
 71. Goicoechea, M. *et al.* COVID-19: clinical course and outcomes of 36 hemodialysis patients in Spain. *Kidney Int* **98**, 27–34 (2020).
 72. *Día Mundial del Riñón 2023*. <https://www.comta.com.uy/DossierPrensa.pdf> (2023).
 73. Puhach, O., Meyer, B. & Eckerle, I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol* (2022) doi:10.1038/s41579-022-00822-w.
 74. Aranha, C., Patel, V., Bhor, V. & Gogoi, D. Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *J Med Virol* **93**, 6794–6797 (2021).
 75. Farina, N. *et al.* COVID-19: Pharmacology and kinetics of viral clearance. *Pharmacol Res* **161**, 105114 (2020).
 76. Qutub, M. *et al.* Duration of viable SARS-CoV-2 shedding from respiratory tract in different human hosts and its impact on isolation discontinuation policies revision; a narrative review. *Clin Infect Pract* **13**, 100140 (2022).
 77. De Vriese, A. S. & Reynders, M. IgG Antibody Response to SARS-CoV-2 Infection and Viral RNA Persistence in Patients on Maintenance Hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases* **76**, 440–441 (2020).
 78. Shaikh, A., Zeldis, E., Campbell, K. N. & Chan, L. Prolonged SARS-CoV-2 Viral RNA Shedding and IgG Antibody Response to SARS-CoV-2 in Patients on Hemodialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 290–292 (2021).
 79. O’Sullivan, E. D. *et al.* Prolonged SARS-CoV-2 viral shedding in patients with chronic kidney disease. *Nephrology* **26**, 328–332 (2021).
 80. Benotmane, I., Risch, S., Doderer-Lang, C., Caillard, S. & Fafi-Kremer, S. Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19. *American Journal of Transplantation* **21**, 2871–2875 (2021).
 81. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>.

82. el Observador. Salud Pública confirmó primeros cuatro casos de coronavirus en Uruguay. *13 de Marzo de 2020*.
83. Presidencia de Uruguay. Gobierno declaró emergencia sanitaria por coronavirus y anunció las primeras medidas. *13 de marzo de 2020*.
84. BBC. Coronavirus en Uruguay: la singular y exitosa estrategia del país para contener la pandemia sin cuarentena obligatoria. *29 de mayo de 2020*.
85. Subrayado. MSP confirma presencia de variante ómicron en Uruguay. *29 de diciembre de 2021*.
86. MSP. *Semana epidemiológica 19 y 20 – 07/05/23 AL 20/05/23 - Casos de covid-19*. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/semana-epidemiologica-19-20-070523-200523-casos-covid-19> (2023).
87. Burki, T. Understanding variants of SARS-CoV-2. *The Lancet* **397**, 462 (2021).
88. Raman, R., Patel, K. J. & Ranjan, K. COVID-19: Unmasking Emerging SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and Therapeutic Strategies. *Biomolecules* **11**, 993 (2021).
89. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
90. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> (2022).
91. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812-827.e19 (2020).
92. Plante, J. A. *et al.* Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* **592**, 116–121 (2021).
93. Zhou, B. *et al.* SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* **592**, 122–127 (2021).
94. Garcia-Beltran, W. F. *et al.* Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell* **184**, 2372-2383.e9 (2021).
95. Legros, V. *et al.* A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol* **18**, 318–327 (2021).
96. Volz, E. *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* **593**, 266–269 (2021).
97. Tegally, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438–443 (2021).
98. Fujino, T. *et al.* Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg Infect Dis* **27**, (2021).
99. Faria, N. R. *et al.* *Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. Mélo die Monod* vol. 25 <http://pangolin.cog-uk.io>.

100. Mlcochova, P. *et al.* SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* **599**, 114–119 (2021).
101. Cherian, S. *et al.* SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms* **9**, 1542 (2021).
102. Brown, C. M. *et al.* Outbreak of SARS-CoV-2 Infections, Including COVID-19 Vaccine Breakthrough Infections, Associated with Large Public Gatherings — Barnstable County, Massachusetts, July 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **70**, 1059–1062 (2021).
103. World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (2021).
104. Institut Pasteur de Montevideo. Inicia trabajo del Grupo de Trabajo Interinstitucional de Vigilancia SARS-CoV2. <https://pasteur.uy/noticias/inicia-trabajo-del-grupo-de-trabajo-interinstitucional-de-vigilancia-sars-cov2/> (2021).
105. Insitut Pasteur de Montevideo. Grupo de Trabajo Interinstitucional (GTI) en Vigilancia de SARS-CoV-2 detecta variante P.1. <https://pasteur.uy/noticias/grupo-de-trabajo-interinstitucional-gti-en-vigilancia-de-sars-cov-2-detecta-variante-p-1/> (2021).
106. Rego, N. *et al.* Real-Time Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants of Concern, Uruguay. *Emerg Infect Dis* **27**, 2957–2960 (2021).
107. Insitut Pasteur de Montevideo. One year monitoring Sars-CoV-2 variants. <https://pasteur.uy/en/news/one-year-monitoring-sars-cov-2-variants/> (2022).
108. Kanneganti, T. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. *Immunol Rev* **297**, 5–12 (2020).
109. Minkoff, J. M. & tenOever, B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* (2023) doi:10.1038/s41579-022-00839-1.
110. Wang, Y. *et al.* Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 5235–5244 (2020).
111. Sette, A. & Crotty, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* **184**, 861–880 (2021).
112. Diamond, M. S. & Kanneganti, T.-D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23**, 165–176 (2022).
113. Asano, T. *et al.* X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol* **6**, (2021).
114. van der Made, C. I. *et al.* Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA* **324**, 663 (2020).
115. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol* **22**, 829–838 (2021).
116. Yin, X. *et al.* MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* **34**, 108628 (2021).

117. Pfaender, S. *et al.* LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease. *Nat Microbiol* **5**, 1330–1339 (2020).
118. Martin-Sancho, L. *et al.* Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction. *Mol Cell* **81**, 2656–2668.e8 (2021).
119. Ireland, D. D. C., Stohlman, S. A., Hinton, D. R., Atkinson, R. & Bergmann, C. C. Type I Interferons Are Essential in Controlling Neurotropic Coronavirus Infection Irrespective of Functional CD8 T Cells. *J Virol* **82**, 300–310 (2008).
120. Cervantes-Barragán, L. *et al.* Type I IFN-Mediated Protection of Macrophages and Dendritic Cells Secures Control of Murine Coronavirus Infection. *The Journal of Immunology* **182**, 1099–1106 (2009).
121. Boudewijns, R. *et al.* STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *Nat Commun* **11**, 5838 (2020).
122. Pairo-Castineira, E. *et al.* Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature* **591**, 92–98 (2021).
123. Zhang, Q. *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science (1979)* **370**, (2020).
124. Manry, J. *et al.* The risk of COVID-19 death is much greater and age dependent with type I IFN autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, (2022).
125. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (1979)* **370**, (2020).
126. Loske, J. *et al.* Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. *Nat Biotechnol* **40**, 319–324 (2022).
127. Cheemarla, N. R. *et al.* Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
128. Sposito, B. *et al.* The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. *Cell* **184**, 4953–4968.e16 (2021).
129. Laing, A. G. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* **26**, 1623–1635 (2020).
130. Qin, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases* **71**, 762–768 (2020).
131. Rodrigues, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
132. Lucas, C. *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **584**, 463–469 (2020).
133. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (1979)* **369**, 718–724 (2020).

134. Karki, R. & Kanneganti, T.-D. The ‘cytokine storm’: molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Trends Immunol* **42**, 681–705 (2021).
135. Karki, R. *et al.* Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell* **184**, 149-168.e17 (2021).
136. Ackermann, M. *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *New England Journal of Medicine* **383**, 120–128 (2020).
137. Rowley, A. H. Understanding SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children. *Nat Rev Immunol* **20**, 453–454 (2020).
138. Poor, H. D. Pulmonary Thrombosis and Thromboembolism in COVID-19. *Chest* **160**, 1471–1480 (2021).
139. Kaneko, N. *et al.* Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell* **183**, 143-157.e13 (2020).
140. Zohar, T. *et al.* Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality. *Cell* **183**, 1508-1519.e12 (2020).
141. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
142. Kalil, A. C. *et al.* Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **384**, 795–807 (2021).
143. Rosas, I. O. *et al.* Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *New England Journal of Medicine* **384**, 1503–1516 (2021).
144. Goldblatt, D., Alter, G., Crotty, S. & Plotkin, S. A. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev* **310**, 6–26 (2022).
145. Rydzynski Moderbacher, C. *et al.* Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* **183**, 996-1012.e19 (2020).
146. Suthar, M. S. *et al.* Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Rep Med* **1**, 100040 (2020).
147. Ripperger, T. J. *et al.* Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity* **53**, 925-933.e4 (2020).
148. Premkumar, L. *et al.* The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol* **5**, (2020).
149. Long, Q.-X. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 845–848 (2020).

150. Piccoli, L. *et al.* Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell* **183**, 1024-1042.e21 (2020).
151. Gudbjartsson, D. F. *et al.* Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *New England Journal of Medicine* **383**, 1724–1734 (2020).
152. Wajnberg, A. *et al.* Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science (1979)* **370**, 1227–1230 (2020).
153. Post, N. *et al.* Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* **15**, e0244126 (2020).
154. Carsetti, R. *et al.* Different Innate and Adaptive Immune Responses to SARS-CoV-2 Infection of Asymptomatic, Mild, and Severe Cases. *Front Immunol* **11**, (2020).
155. Lucas, C. *et al.* Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat Med* **27**, 1178–1186 (2021).
156. Liu, L. *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* **584**, 450–456 (2020).
157. Gaebler, C. *et al.* Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* **591**, 639–644 (2021).
158. Rogers, T. F. *et al.* Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science (1979)* **369**, 956–963 (2020).
159. Robbiani, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* **584**, 437–442 (2020).
160. Ng, K. W. *et al.* Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science (1979)* **370**, 1339–1343 (2020).
161. Dan, J. M. *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (1979)* **371**, (2021).
162. Addetia, A. *et al.* Neutralizing Antibodies Correlate with Protection from SARS-CoV-2 in Humans during a Fishery Vessel Outbreak with a High Attack Rate. *J Clin Microbiol* **58**, (2020).
163. Garcia-Beltran, W. F. *et al.* COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* **184**, 476-488.e11 (2021).
164. Larsen, M. D. *et al.* Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science (1979)* **371**, (2021).
165. Chakraborty, S. *et al.* Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nat Immunol* **22**, 67–73 (2021).
166. Koch, T., Mellinghoff, S. C., Shamsrizi, P., Addo, M. M. & Dahlke, C. Correlates of Vaccine-Induced Protection against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)* **9**, 238 (2021).
167. L’Huillier, A. G. *et al.* Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection among hospital workers: a prospective longitudinal study. *Clinical Microbiology and Infection* **27**, 784.e1-784.e8 (2021).

168. Gallais, F. *et al.* Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine* **71**, 103561 (2021).
169. Grandjean, L. *et al.* Long-Term Persistence of Spike Protein Antibody and Predictive Modeling of Antibody Dynamics After Infection With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Clinical Infectious Diseases* **74**, 1220–1229 (2022).
170. Chan, R. W. Y. *et al.* Mucosal Antibody Response to SARS-CoV-2 in Paediatric and Adult Patients: A Longitudinal Study. *Pathogens* **11**, 397 (2022).
171. Hennings, V. *et al.* The presence of serum anti-SARS-CoV-2 IgA appears to protect primary health care workers from COVID-19. *Eur J Immunol* **52**, 800–809 (2022).
172. Crotty, S. Hybrid immunity. *Science (1979)* **372**, 1392–1393 (2021).
173. Bergamaschi, L. *et al.* Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity* **54**, 1257-1275.e8 (2021).
174. Notarbartolo, S. *et al.* Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional, and repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19. *Sci Immunol* **6**, (2021).
175. Chen, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 2620–2629 (2020).
176. Kuri-Cervantes, L. *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol* **5**, (2020).
177. Su, Y. *et al.* Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell* **183**, 1479-1495.e20 (2020).
178. Diao, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* **11**, (2020).
179. Grau-Expósito, J. *et al.* Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2. *Nat Commun* **12**, 3010 (2021).
180. Le Bert, N. *et al.* Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
181. Peng, Y. *et al.* Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol* **21**, 1336–1345 (2020).
182. Tarke, A. *et al.* Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med* **2**, 100204 (2021).
183. Boppana, S. *et al.* SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathog* **17**, e1009761 (2021).
184. Juno, J. A. *et al.* Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 1428–1434 (2020).

185. Cohen, K. W. *et al.* Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med* **2**, 100354 (2021).
186. Wheatley, A. K. *et al.* Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun* **12**, 1162 (2021).
187. Lineburg, K. E. *et al.* CD8+ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope cross-react with selective seasonal coronaviruses. *Immunity* **54**, 1055-1065.e5 (2021).
188. Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23**, 186–193 (2022).
189. Alberici, F. *et al.* SARS-CoV-2 infection in dialysis and kidney transplant patients: immunological and serological response. *J Nephrol* **35**, 745–759 (2022).
190. Miarons, M. *et al.* COVID-19 in Solid Organ Transplantation: A Matched Retrospective Cohort Study and Evaluation of Immunosuppression Management. *Transplantation* 138–150 (2021) doi:10.1097/TP.0000000000003460.
191. Sharma, P. *et al.* COVID-19 Outcomes among Solid Organ Transplant Recipients: A Case-control Study. *Transplantation* 128–137 (2021) doi:10.1097/TP.0000000000003447.
192. Molnar, M. Z. *et al.* Outcomes of critically ill solid organ transplant patients with COVID-19 in the United States. *American Journal of Transplantation* **20**, 3061–3071 (2020).
193. Favà, A. *et al.* SARS-CoV-2-specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant patients. *American Journal of Transplantation* **21**, 2749–2761 (2021).
194. Mahalingasivam, V. *et al.* A Systematic Review of COVID-19 and Kidney Transplantation. *Kidney Int Rep* **6**, 24–45 (2021).
195. Phadke, V. K., Scanlon, N., Jordan, S. C. & Rouphael, N. G. Immune Responses to SARS-CoV-2 in Solid Organ Transplant Recipients. doi:10.1007/s40472-021-00322-5/Published.
196. Candon, S. *et al.* T cell and antibody responses to SARS-CoV-2: Experience from a French transplantation and hemodialysis center during the COVID-19 pandemic. *American Journal of Transplantation* **21**, 854–863 (2021).
197. Bertrand, D. *et al.* SARS-CoV-2-specific Humoral and Cellular Immunities in Kidney Transplant Recipients and Dialyzed Patients Recovered From Severe and Nonsevere COVID-19. *Transplant Direct* **7**, E792 (2021).
198. Favà, A. *et al.* A comprehensive assessment of long-term SARS-CoV-2–specific adaptive immune memory in convalescent COVID-19 Solid Organ Transplant recipients. *Kidney Int* **101**, 1027–1038 (2022).
199. Candon, S. *et al.* T cell and antibody responses to SARS-CoV-2: Experience from a French transplantation and hemodialysis center during the COVID-19 pandemic. *American Journal of Transplantation* **21**, 854–863 (2021).

200. Fernández-Ruiz, M. *et al.* T cell–mediated response to SARS-CoV-2 in liver transplant recipients with prior COVID-19. *American Journal of Transplantation* **21**, 2785–2794 (2021).
201. Cantarelli, C. *et al.* Immune responses to SARS-CoV-2 in dialysis and kidney transplantation. *Clin Kidney J* **15**, 1816–1828 (2022).
202. Jayant, K. *et al.* The impact of covid-19 on kidney transplant recipients in pre-vaccination and delta strain era: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm10194533> (2021).
203. Predecki, M. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology* **31**, 2753–2756 (2020).
204. Hartzell, S. *et al.* Evidence of potent humoral immune activity in COVID-19-infected kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation* **20**, 3149–3161 (2020).
205. Benotmane, I. *et al.* In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *American Journal of Transplantation* **20**, 3162–3172 (2020).
206. Burack, D. *et al.* Prevalence and predictors of SARS-CoV-2 antibodies among solid organ transplant recipients with confirmed infection. *American Journal of Transplantation* **21**, 2254–2261 (2021).
207. Silvano, J. *et al.* Viral Clearance and Serological Response to SARS-CoV-2 in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* **53**, 1180–1186 (2021).
208. Canas, J. J. *et al.* Longitudinal SARS-CoV-2 seroconversion and functional heterogeneity in a pediatric dialysis unit. *Kidney International* vol. 99 484–486 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.11.014> (2021).
209. Sjøfteland, J. M. *et al.* Longevity of anti-spike and anti-nucleocapsid antibodies after COVID-19 in solid organ transplant recipients compared to immunocompetent controls. *American Journal of Transplantation* **22**, 1245–1252 (2022).
210. Cravedi, P. *et al.* Delayed kinetics of IgG, but Not IgA, antispikes antibodies in transplant recipients following SARS-CoV-2 Infection. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, (2021).
211. Devresse, A. *et al.* Immunosuppression and SARS-CoV-2 Infection in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Direct* vol. 8 E1292 Preprint at <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001292> (2022).
212. Anton Pampols, P. *et al.* Immunosuppression minimization in kidney transplant recipients hospitalized for COVID-19. *Clin Kidney J* **14**, 1229–1235 (2021).
213. Gandolfini, I. *et al.* Anti-HLA and anti-SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients with COVID-19. *Transplant International* vol. 34 596–599 Preprint at <https://doi.org/10.1111/tri.13829> (2021).
214. Schmidt-Lauber, C., Günster, C., Huber, T. B., Spoden, M. & Grahmmer, F. Collateral Effects and Mortality of Kidney Transplant Recipients during the COVID-19 Pandemic. *Kidney360* **3**, 325–336 (2022).

215. Kato, S. *et al.* Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**, 1526–1533 (2008).
216. Valeri, A. M. *et al.* Presentation and Outcomes of Patients with ESKD and COVID-19. *Journal of the American Society of Nephrology* **31**, 1409–1415 (2020).
217. Khatri, M. *et al.* Outcomes among Hospitalized Chronic Kidney Disease Patients with COVID-19. *Kidney360* **2**, 1107–1114 (2021).
218. Gisby, J. *et al.* Longitudinal proteomic profiling of dialysis patients with COVID-19 reveals markers of severity and predictors of death. *Elife* **10**, (2021).
219. De Vriese, A. S. *et al.* Longevity and correlation with disease severity of the humoral and cellular response to SARS-CoV-2 infection in haemodialysis patients. *Clin Kidney J* **14**, 2446–2448 (2021).
220. Anft, M. *et al.* SARS-CoV-2–reactive cellular and humoral immunity in hemodialysis population. *Kidney Int* **99**, 1489–1490 (2021).
221. Clarke, C. L. *et al.* Longevity of SARS-CoV-2 immune responses in hemodialysis patients and protection against reinfection. *Kidney Int* **99**, 1470–1477 (2021).
222. Shankar, S. *et al.* SARS-CoV-2-Specific T Cell Responses Are Not Associated with Protection against Reinfection in Hemodialysis Patients. *Journal of the American Society of Nephrology* **33**, 883–887 (2022).
223. El Karoui, K. & De Vriese, A. S. COVID-19 in dialysis: clinical impact, immune response, prevention, and treatment. *Kidney Int* **101**, 883–894 (2022).
224. Forbes, S. *et al.* Persistence of antibody response to SARS-CoV-2 in a cohort of haemodialysis patients with COVID-19. *Nephrology Dialysis Transplantation* **36**, 1292–1297 (2021).
225. Sakhi, H. *et al.* Kinetics of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies in Hemodialysis Patients Six Months after Infection. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, 1033–1036 (2021).
226. De Vriese, A. S. *et al.* Longevity and correlation with disease severity of the humoral and cellular response to SARS-CoV-2 infection in haemodialysis patients. *Clin Kidney J* **14**, 2446–2448 (2021).
227. Cohen, D. E. *et al.* Antibody Status, Disease History, and Incidence of SARS-CoV-2 Infection Among Patients on Chronic Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, 1880–1886 (2021).
228. Banham, G. D. *et al.* Hemodialysis Patients Make Long-Lived Antibodies against SARS-CoV-2 that May Be Associated with Reduced Reinfection. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, 2140–2142 (2021).
229. Lumley, S. F. *et al.* Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine* **384**, 533–540 (2021).
230. Vacunas COVID-19 OMS. <https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul/covid-19>.

231. Monitor Vacunas COVID-19. <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/6/>.
232. Chi, W. Y. *et al.* COVID-19 vaccine update: vaccine effectiveness, SARS-CoV-2 variants, boosters, adverse effects, and immune correlates of protection. *Journal of Biomedical Science* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00853-8> (2022).
233. el Sahly, H. M. *et al.* Efficacy of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine at Completion of Blinded Phase. *New England Journal of Medicine* **385**, 1774–1785 (2021).
234. Thomas, S. J. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *New England Journal of Medicine* **385**, 1761–1773 (2021).
235. Sadoff, J. *et al.* Final Analysis of Efficacy and Safety of Single-Dose Ad26.COVS.2. *New England Journal of Medicine* **386**, 847–860 (2022).
236. Ella, R. *et al.* Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **398**, 2173–2184 (2021).
237. al Kaabi, N. *et al.* Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **326**, 35–45 (2021).
238. Palacios, R. *et al.* Title Efficacy and safety of a COVID-19 inactivated vaccine in healthcare 2 professionals in Brazil: The PROFISCOV study 3 4. <https://ssrn.com/abstract=3822780>.
239. Tanriover, M. D. *et al.* Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet* **398**, 213–222 (2021).
240. Fadlyana, E. *et al.* A phase III, observer-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and immunogenicity of SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18–59 years: An interim analysis in Indonesia. *Vaccine* **39**, 6520–6528 (2021).
241. Dunkle, L. M. *et al.* Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico. *New England Journal of Medicine* **386**, 531–543 (2022).
242. Heath, P. T. *et al.* Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **385**, 1172–1183 (2021).
243. Halperin, S. A. *et al.* Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: an international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* **399**, 237–248 (2022).
244. Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 13 759–780 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd4278> (2014).
245. Vogel, A. B. *et al.* BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature* **592**, 283–289 (2021).

246. Pallesen, J. *et al.* Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E7348–E7357 (2017).
247. Kirchdoerfer, R. N. *et al.* Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. *Sci Rep* **8**, (2018).
248. Wrapp, D. *et al.* *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.* <https://www.gisaid>. (2019).
249. Cohn, B. A., Cirillo, P. M., Murphy, C. C., Krigbaum, N. Y. & Wallace, A. W. *SARS-CoV-2 vaccine protection and deaths among US veterans during 2021.*
250. Goldberg, Y. *et al.* Waning Immunity after the BNT162b2 Vaccine in Israel. *New England Journal of Medicine* **385**, e85 (2021).
251. Cho, D. *CBER Assessment of booster dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine (0.3 mL) administered following a primary COVID-19 immunization series in individuals 18 years of age and older.* (2021).
252. *Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Moderna and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccines for Children Down to 6 Months of Age.* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-moderna-and-pfizer-biontech-covid-19-vaccines-children>.
253. Walter, E. B. *et al.* Evaluation of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine in Children 5 to 11 Years of Age. *New England Journal of Medicine* **386**, 35–46 (2022).
254. Frenc, R. W. *et al.* Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine in Adolescents. *New England Journal of Medicine* **385**, 239–250 (2021).
255. Jackson, L. A. *et al.* An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *New England Journal of Medicine* **383**, 1920–1931 (2020).
256. Zhang, Y. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* **21**, 181–192 (2021).
257. Mok, C. K. P. *et al.* Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID-19 vaccines in Hong Kong. *Respirology* **27**, 301–310 (2022).
258. Jantarabenjakul, W. *et al.* Short-term immune response after inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac®, Sinovac) and ChAdOx1 nCoV-19 (Vaxzevria®, Oxford-AstraZeneca) vaccinations in health care workers. *Asian Pac J Allergy Immunol* **40**, 269–277 (2022).
259. Zeng, G. *et al.* Immunogenicity and safety of a third dose of CoronaVac, and immune persistence of a two-dose schedule, in healthy adults: interim results from two single-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 clinical trials. *Lancet Infect Dis* **22**, 483–495 (2022).
260. Cheng, S. M. S. *et al.* Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nat Med* **28**, 486–489 (2022).

261. Novavax Announces Initiation of PREVENT-19 COVID-19 Vaccine Phase 3 Trial Booster Study. <https://ir.novavax.com/2021-12-21-Novavax-Announces-Initiation-of-PREVENT-19-COVID-19-Vaccine-Phase-3-Trial-Booster-Study>.
262. Planas, D. *et al.* Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature* **602**, 671–675 (2022).
263. Andrews, N. *et al.* Duration of Protection against Mild and Severe Disease by Covid-19 Vaccines. *New England Journal of Medicine* **386**, 340–350 (2022).
264. Rosenberg, E. S. *et al.* Covid-19 Vaccine Effectiveness in New York State. *New England Journal of Medicine* **386**, 116–127 (2022).
265. Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H. & Bertollini, R. Effectiveness of mRNA-1273 and BNT162b2 Vaccines in Qatar. *New England Journal of Medicine* **386**, 799–800 (2022).
266. Moreira, E. D. *et al.* Safety and Efficacy of a Third Dose of BNT162b2 Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **386**, 1910–1921 (2022).
267. Gruell, H. *et al.* mRNA booster immunization elicits potent neutralizing serum activity against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nat Med* **28**, 477–480 (2022).
268. Garcia-Beltran, W. F. *et al.* mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell* **185**, 457-466.e4 (2022).
269. Lustig, Y. *et al.* Superior immunogenicity and effectiveness of the third compared to the second BNT162b2 vaccine dose. *Nat Immunol* **23**, 940–946 (2022).
270. Spitzer, A. *et al.* Association of a Third Dose of BNT162b2 Vaccine with Incidence of SARS-CoV-2 Infection among Health Care Workers in Israel. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **327**, 341–349 (2022).
271. Cele, S. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron has extensive but incomplete escape of Pfizer BNT162b2 elicited neutralization and requires ACE2 for infection. *medRxiv* (2021) doi:10.1101/2021.12.08.21267417.
272. Qi, X. *et al.* Human Infection with an Avian-Origin Influenza A (H10N3) Virus. *New England Journal of Medicine* **386**, 1087–1088 (2022).
273. Accorsi, E. K. *et al.* Association between 3 Doses of mRNA COVID-19 Vaccine and Symptomatic Infection Caused by the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **327**, 639–651 (2022).
274. Wang, K. *et al.* Memory B cell repertoire from triple vaccinees against diverse SARS-CoV-2 variants. *Nature* **603**, 919–925 (2022).
275. Muecksch, F. *et al.* Increased memory B cell potency and breadth after a SARS-CoV-2 mRNA boost. *Nature* **607**, 128–134 (2022).
276. Levine-Tiefenbrun, M. *et al.* Viral loads of Delta-variant SARS-CoV-2 breakthrough infections after vaccination and booster with BNT162b2. *Nat Med* **27**, 2108–2110 (2021).

277. Kuhlmann, C. *et al.* Breakthrough infections with SARS-CoV-2 omicron despite mRNA vaccine booster dose. *The Lancet* vol. 399 625–626 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00090-3) (2022).
278. Shroff, R. T. *et al.* Immune responses to two and three doses of the BNT162b2 mRNA vaccine in adults with solid tumors. *Nat Med* **27**, 2002–2011 (2021).
279. Shapiro, L. C. *et al.* Efficacy of booster doses in augmenting waning immune responses to COVID-19 vaccine in patients with cancer. *Cancer Cell* vol. 40 3–5 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.11.006> (2022).
280. Kamar, N. *et al.* Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine* **385**, 661–662 (2021).
281. Collier, D. A. *et al.* Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* **596**, 417–422 (2021).
282. Zeng, C. *et al.* COVID-19 mRNA booster vaccines elicit strong protection against SARS-CoV-2 Omicron variant in patients with cancer. *Cancer Cell* vol. 40 117–119 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.014> (2022).
283. Naranbhai, V. *et al.* Neutralization breadth of SARS-CoV-2 viral variants following primary series and booster SARS-CoV-2 vaccines in patients with cancer. *Cancer Cell* **40**, 103-108.e2 (2022).
284. Arbel, R. *et al.* Effectiveness of a second BNT162b2 booster vaccine against hospitalization and death from COVID-19 in adults aged over 60 years. *Nat Med* **28**, 1486–1490 (2022).
285. Maramattom, B. V., Philips, G., Thomas, J. & Santhamma, S. G. N. Inflammatory myositis after ChAdOx1 vaccination. *The Lancet Rheumatology* vol. 3 e747–e749 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00312-X](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00312-X) (2021).
286. Maramattom, B. v. *et al.* Guillain-Barré Syndrome following ChAdOx1-S/nCoV-19 Vaccine. *Ann Neurol* **90**, 312–314 (2021).
287. Hanson, K. E. *et al.* Incidence of Guillain-Barré Syndrome after COVID-19 Vaccination in the Vaccine Safety Datalink. *JAMA Netw Open* E228879 (2022) doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.8879.
288. Schultz, N. H. *et al.* Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine* **384**, 2124–2130 (2021).
289. Chan, B. *et al.* Risk of Vaccine-Induced Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) following the AstraZeneca/COVISHIELD Adenovirus Vector COVID-19 Vaccines. <https://covid19-sciencetable.ca/sciencebrief/risk-of-vaccine-induced-thrombotic-thrombocytopenia-vitt-following-the-astrazeneca-covishield-adenovirus-vector-covid-19-vaccines/> (2021) doi:10.47326/ocsat.2021.02.28.1.0.
290. Greinacher, A. *et al.* Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine* **384**, 2092–2101 (2021).
291. Barda, N. *et al.* Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *New England Journal of Medicine* **385**, 1078–1090 (2021).

292. Mevorach, D. *et al.* Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccine against Covid-19 in Israel. *New England Journal of Medicine* **385**, 2140–2149 (2021).
293. Shay, D. K., Shimabukuro, T. T. & Destefano, F. Myocarditis occurring after immunization with mrna-based covid-19 vaccines. *JAMA Cardiology* vol. 6 1115–1117 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.2821> (2021).
294. Ryan, M. *et al.* Myocarditis following immunization with mrna covid-19 vaccines in members of the us military. *JAMA Cardiol* **6**, 1202–1206 (2021).
295. Vacunación COVID-19. <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
296. Mathieu, E. *et al.* A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat Hum Behav* **5**, 947–953 (2021).
297. Monitor Uruguay se vacuna. <https://monitor.uruguaysevacuna.gub.uy/>.
298. Plotkin, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology* vol. 17 1055–1065 Preprint at <https://doi.org/10.1128/CVI.00131-10> (2010).
299. Wang, Z. *et al.* mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* **592**, 616–622 (2021).
300. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet* **397**, 671–681 (2021).
301. Ramasamy, M. N. *et al.* Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *The Lancet* **396**, 1979–1993 (2020).
302. Hsieh, C.-L. *et al.* Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science (1979)* **369**, 1501–1505 (2020).
303. Juraszek, J. *et al.* Stabilizing the closed SARS-CoV-2 spike trimer. *Nat Commun* **12**, 244 (2021).
304. Lederer, K. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity* **53**, 1281-1295.e5 (2020).
305. Wisniewski, A. V., Campillo Luna, J. & Redlich, C. A. Human IgG and IgA responses to COVID-19 mRNA vaccines. *PLoS One* **16**, e0249499 (2021).
306. Rogliani, P., Chetta, A., Cazzola, M. & Calzetta, L. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies: A Network Meta-Analysis across Vaccines. *Vaccines (Basel)* **9**, 227 (2021).
307. Tanriover, M. D. *et al.* Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet* **398**, 213–222 (2021).
308. Fadlyana, E. *et al.* A phase III, observer-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and immunogenicity of SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy

- adults aged 18–59 years: An interim analysis in Indonesia. *Vaccine* **39**, 6520–6528 (2021).
309. Saadat, S. *et al.* Binding and Neutralization Antibody Titers After a Single Vaccine Dose in Health Care Workers Previously Infected With SARS-CoV-2. *JAMA* **325**, 1467 (2021).
310. Krammer, F. *et al.* Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *New England Journal of Medicine* **384**, 1372–1374 (2021).
311. Goel, R. R. *et al.* Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. *Sci Immunol* **6**, (2021).
312. Lin, B. *et al.* Immunology of SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Clinica Chimica Acta* **545**, 117390 (2023).
313. Tregoning, J. S., Flight, K. E., Higham, S. L., Wang, Z. & Pierce, B. F. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol* **21**, 626–636 (2021).
314. Oberhardt, V. *et al.* Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Nature* **597**, 268–273 (2021).
315. Sahin, U. *et al.* BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* **595**, 572–577 (2021).
316. Skelly, D. T. *et al.* Two doses of SARS-CoV-2 vaccination induce robust immune responses to emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Nat Commun* **12**, 5061 (2021).
317. Parry, H. *et al.* Differential immunogenicity of BNT162b2 or ChAdOx1 vaccines after extended-interval homologous dual vaccination in older people. *Immunity & Ageing* **18**, 34 (2021).
318. Parry, H. *et al.* Immunogenicity of single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 at 5–6 weeks post vaccine in participants aged 80 years or older: an exploratory analysis. *Lancet Healthy Longev* **2**, e554–e560 (2021).
319. Pozzetto, B. *et al.* Immunogenicity and efficacy of heterologous ChAdOx1–BNT162b2 vaccination. *Nature* **600**, 701–706 (2021).
320. Stuart, A. S. V *et al.* Immunogenicity, safety, and reactogenicity of heterologous COVID-19 primary vaccination incorporating mRNA, viral-vector, and protein-adjuvant vaccines in the UK (Com-COV2): a single-blind, randomised, phase 2, non-inferiority trial. *The Lancet* **399**, 36–49 (2022).
321. Heitmann, J. S. *et al.* A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature* **601**, 617–622 (2022).
322. Folegatti, P. M. *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* **396**, 467–478 (2020).
323. Mazzone, A. *et al.* First-dose mRNA vaccination is sufficient to reactivate immunological memory to SARS-CoV-2 in subjects who have recovered from COVID-19. *Journal of Clinical Investigation* **131**, (2021).

324. Rice, A. *et al.* Intranasal plus subcutaneous prime vaccination with a dual antigen COVID-19 vaccine elicits T-cell and antibody responses in mice. *Sci Rep* **11**, 14917 (2021).
325. García-Montero, C. *et al.* An Updated Review of SARS-CoV-2 Vaccines and the Importance of Effective Vaccination Programs in Pandemic Times. *Vaccines (Basel)* **9**, 433 (2021).
326. Bergwerk, M. *et al.* Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *New England Journal of Medicine* **385**, 1474–1484 (2021).
327. Earle, K. A. *et al.* Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine* **39**, 4423–4428 (2021).
328. Khoury, D. S. *et al.* Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **27**, 1205–1211 (2021).
329. Feng, S. *et al.* Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **27**, 2032–2040 (2021).
330. Gilbert, P. B. *et al.* Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science (1979)* **375**, 43–50 (2022).
331. Feng, S. *et al.* Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **27**, 2032–2040 (2021).
332. Regev-Yochay, G. *et al.* Correlates of protection against COVID-19 infection and intensity of symptomatic disease in vaccinated individuals exposed to SARS-CoV-2 in households in Israel (ICoFS): a prospective cohort study. *Lancet Microbe* **4**, e309–e318 (2023).
333. Tan, T. T. *et al.* Effectiveness of vaccination against SARS-CoV-2 and the need for alternative preventative approaches in immunocompromised individuals: a narrative review of systematic reviews. *Expert Rev Vaccines* **22**, 341–365 (2023).
334. Sakuraba, A., Luna, A. & Micic, D. A Systematic Review and Meta-Analysis of Serologic Response following Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccination in Solid Organ Transplant Recipients. *Viruses* **14**, 1822 (2022).
335. Meshram, H. S. *et al.* Humoral and cellular response of COVID-19 vaccine among solid organ transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. *Transplant Infectious Disease* **24**, (2022).
336. Li, J. *et al.* Factors Associated With COVID-19 Vaccine Response in Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Transplantation* **106**, 2068–2075 (2022).
337. Manothummetha, K. *et al.* Immunogenicity and Risk Factors Associated With Poor Humoral Immune Response of SARS-CoV-2 Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplant. *JAMA Netw Open* **5**, e226822 (2022).
338. Stumpf, J. *et al.* Humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 vaccination in renal transplant versus dialysis patients: A prospective, multicenter observational study using

- mRNA-1273 or BNT162b2 mRNA vaccine. *The Lancet Regional Health - Europe* **9**, (2021).
339. Grupper, A. *et al.* Humoral Response to the Third Dose of Sars-Cov-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* (2022) doi:10.1016/j.transproceed.2022.02.011.
340. al Jurdi, A. *et al.* Non-Invasive Monitoring for Rejection in Kidney Transplant Recipients After SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Front Immunol* **13**, (2022).
341. Furian, L. *et al.* Differences in Humoral and Cellular Vaccine Responses to SARS-CoV-2 in Kidney and Liver Transplant Recipients. *Front Immunol* **13**, (2022).
342. Magicova, M. *et al.* Determinants of Immune Response to Anti-SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study. *Transplantation* **106**, 842–852 (2022).
343. Hall, V. G. *et al.* Outcomes of SARS-CoV-2 Infection in Unvaccinated Compared with Vaccinated Solid Organ Transplant Recipients: A Propensity Matched Cohort Study. *Transplantation* **106**, 1622–1628 (2022).
344. Mazuecos, A. *et al.* Breakthrough Infections Following mRNA SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* **106**, 1430–1439 (2022).
345. Villanego, F. *et al.* Trends in COVID-19 Outcomes in Kidney Transplant Recipients during the Period of Omicron Variant Predominance. *Transplantation* vol. 106 E304–E305 Preprint at <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004126> (2022).
346. print.
347. del Bello, A. *et al.* Efficiency of a boost with a third dose of anti-SARS-CoV-2 messenger RNA-based vaccines in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation* vol. 22 322–323 Preprint at <https://doi.org/10.1111/ajt.16775> (2022).
348. la Milia, V. *et al.* Humoral and T-cell response to SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccination in a cohort of kidney transplant recipients and their cohabitant living kidney donor partners. *Clin Kidney J* **15**, 820–821 (2022).
349. Maggiore, U., Riella, L. V., Azzi, J. & Cravedi, P. Mortality in solid organ transplant recipients with COVID-19: More than meets the eye. *American Journal of Transplantation* vol. 22 1496–1497 Preprint at <https://doi.org/10.1111/ajt.16942> (2022).
350. Qin, C. X. *et al.* Risk of Breakthrough SARS-CoV-2 Infections in Adult Transplant Recipients. *Transplantation* vol. 105 E265–E266 Preprint at <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003907> (2021).
351. Benning, L. *et al.* Neutralizing antibody response against the B.1.617.2 (delta) and the B.1.1.529 (omicron) variants after a third mRNA SARS-CoV-2 vaccine dose in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation* **22**, 1873–1883 (2022).
352. al Jurdi, A. *et al.* Suboptimal antibody response against SARS-CoV-2 Omicron variant after third dose of mRNA vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int* **101**, 1282–1286 (2022).

353. Luo, D. *et al.* Immunogenicity of COVID-19 vaccines in chronic liver disease patients and liver transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. *Liver International* **43**, 34–48 (2023).
354. Schrezenmeier, E. *et al.* Temporary antimetabolite treatment hold boosts SARS-CoV-2 vaccination-specific humoral and cellular immunity in kidney transplant recipients. *JCI Insight* **7**, (2022).
355. Van Praet, J. *et al.* Predictors and Dynamics of the Humoral and Cellular Immune Response to SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Hemodialysis Patients: A Multicenter Observational Study. *Journal of the American Society of Nephrology* **32**, 3208–3220 (2021).
356. Carr, E. J. *et al.* Review of Early Immune Response to SARS-CoV-2 Vaccination Among Patients With CKD. *Kidney Int Rep* **6**, 2292–2304 (2021).
357. Goupil, R. *et al.* Short-term antibody response after 1 dose of BNT162b2 vaccine in patients receiving hemodialysis. *Can Med Assoc J* **193**, E793–E800 (2021).
358. Simon, B. *et al.* Haemodialysis patients show a highly diminished antibody response after COVID-19 mRNA vaccination compared with healthy controls. *Nephrology Dialysis Transplantation* **36**, 1709–1716 (2021).
359. Schrezenmeier, E. *et al.* Immunogenicity of COVID-19 Tozinameran Vaccination in Patients on Chronic Dialysis. *Front Immunol* **12**, (2021).
360. Rincon-Arevalo, H. *et al.* Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Sci Immunol* **6**, eabj1031 (2021).
361. Yanay, N. B. *et al.* Experience with SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine in dialysis patients. *Kidney Int* **99**, 1496–1498 (2021).
362. Grupper, A. *et al.* Humoral Response to the Pfizer BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 1037–1042 (2021).
363. Kevadiya, B. D. *et al.* Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater* **20**, 593–605 (2021).
364. Toor, S. M., Saleh, R., Sasidharan Nair, V., Taha, R. Z. & Elkord, E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology* **162**, 30–43 (2021).
365. U.S. Food & Drug Administration. In Vitro Diagnostics EUAs - Serology and Other Adaptive Immune Response Tests for SARS-CoV-2. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-serology-and-other-adaptive-immune-response-tests-sars-cov-2>.
366. Shi, A. C. & Ren, P. SARS-CoV-2 serology testing: Progress and challenges. *J Immunol Methods* **494**, 113060 (2021).
367. Weissleder, R., Lee, H., Ko, J. & Pittet, M. J. COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med* **12**, (2020).

368. Ang, G. Y., Chan, K. G., Yean, C. Y. & Yu, C. Y. Lateral Flow Immunoassays for SARS-CoV-2. *Diagnostics* **12**, 2854 (2022).
369. Shah, K. & Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med* **77**, C98–C101 (2016).
370. Yilmaz, G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology* **21**, 187–196 (2001).
371. Amanat, F. *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med* **26**, 1033–1036 (2020).
372. Okba, N. M. A. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis* **26**, 1478–1488 (2020).
373. Gong, F., Wei, H., Li, Q., Liu, L. & Li, B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Front Mol Biosci* **8**, (2021).
374. Rungrojcharoenkit, K. *et al.* Standardization of in-house anti-IgG and IgA ELISAs for the detection of COVID-19. *PLoS One* **18**, e0287107 (2023).
375. Perkmann, T. *et al.* Spike Protein Antibodies Mediate the Apparent Correlation between SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antibodies and Neutralization Test Results. *Microbiol Spectr* **9**, (2021).
376. Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M. & Langlois, M.-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front Immunol* **11**, (2020).
377. Gattinger, P. *et al.* Neutralization of SARS-CoV-2 requires antibodies against conformational receptor-binding domain epitopes. *Allergy* **77**, 230–242 (2022).
378. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. & Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 3–20 (2022).
379. Lau, E. H. Y. *et al.* Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* **12**, 63 (2021).
380. Bewley, K. R. *et al.* Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nat Protoc* **16**, 3114–3140 (2021).
381. Gattinger, P., Ohradanova-Repic, A. & Valenta, R. Importance, Applications and Features of Assays Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Int J Mol Sci* **24**, 5352 (2023).
382. Chen, C. *et al.* Research progress in methods for detecting neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Anal Biochem* **673**, 115199 (2023).
383. Tan, C. W. *et al.* A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol* **38**, 1073–1078 (2020).
384. Gattinger, P. *et al.* Antibodies in serum of convalescent patients following mild COVID-19 do not always prevent virus-receptor binding. *Allergy* **76**, 878–883 (2021).

385. Abe, K. T. *et al.* A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. *JCI Insight* **5**, (2020).
386. Duhalde Vega, M. *et al.* PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease. *Sci Adv* **8**, (2022).
387. Stadlbauer, D. *et al.* SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Curr Protoc Microbiol* **57**, (2020).
388. Se presentaron los test serológicos de COVID-19 desarrollados en Uruguay. <https://udelar.edu.uy/portal/2020/07/se-presentaron-los-test-serologicos-de-covid-19-desarrollados-en-uruguay/> (2020).
389. Carrión, F. *et al.* Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus-cell interface. *Protein Science* (2023) doi:10.1002/pro.4721.
390. Ojeda, D. S. *et al.* Emergency response for evaluating SARS-CoV-2 immune status, seroprevalence and convalescent plasma in Argentina. *PLoS Pathog* **17**, (2021).
391. Aldunate, F. *et al.* What have we learned from a case of convalescent plasma treatment in a two-time kidney transplant recipient COVID-19 patient? A case report from the perspective of viral load evolution and immune response. *Frontiers in Nephrology* **3**, (2023).
392. Rabinowich, L. *et al.* Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J Hepatol* **75**, 435–438 (2021).
393. Dimech, W. *et al.* Comprehensive, Comparative Evaluation of 35 Manual SARS-CoV-2 Serological Assays. *Microbiol Spectr* **11**, (2023).
394. Gattinger, P. *et al.* Vaccine based on folded receptor binding domain-PreS fusion protein with potential to induce sterilizing immunity to SARS-CoV-2 variants. *Allergy* **77**, 2431–2445 (2022).
395. Mattiuzzo Giada. *Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody*. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>.
396. López-Muñoz, A. D., Kosik, I., Holly, J. & Yewdell, J. W. Cell surface SARS-CoV-2 nucleocapsid protein modulates innate and adaptive immunity. *Sci Adv* **8**, (2022).
397. Natarajan, H. *et al.* Markers of Polyfunctional SARS-CoV-2 Antibodies in Convalescent Plasma. *mBio* **12**, (2021).
398. Yoo, J.-J., Yon, D. K., Lee, S. W., Shin, J. Il & Kim, B. K. Humoral Immunogenicity to SARS-CoV-2 Vaccination in Liver Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Biol Sci* **18**, 5849–5857 (2022).
399. Tu, Z. H. *et al.* Evaluating the Response and Safety of Inactivated COVID-19 Vaccines in Liver Transplant Recipients. *Infect Drug Resist* **15**, 2469–2474 (2022).
400. Duan, B. *et al.* Immunogenicity profiling and distinct immune response in liver transplant recipients vaccinated with SARS-CoV-2 inactivated vaccines. *Front Immunol* **13**, (2022).

401. Luo, X., Lessomo, F. Y. N., Yu, Z. & Xie, Y. Factors influencing immunogenicity and safety of SARS-CoV-2 vaccine in liver transplantation recipients: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* **14**, (2023).
402. Cheung, K. S. *et al.* COVID-19 vaccine immunogenicity among chronic liver disease patients and liver transplant recipients: A meta-analysis. *Clin Mol Hepatol* **28**, 890–911 (2022).
403. Gkoufa, A., Lekakis, V., Papatheodoridis, G. & Cholongitas, E. Seroconversion following a booster dose of COVID-19 vaccine in liver transplant recipients. A systematic review and meta-analysis. *Pol Arch Intern Med* (2023) doi:10.20452/pamw.16455.
404. Ford, B. N. & Savitz, J. Depression, aging, and immunity: implications for COVID-19 vaccine immunogenicity. *Immunity & Ageing* **19**, 32 (2022).
405. Wherry, E. J. & Barouch, D. H. T cell immunity to COVID-19 vaccines. *Science* (1979) **377**, 821–822 (2022).
406. Gray, G. *et al.* Effectiveness of Ad26.COV2.S and BNT162b2 Vaccines against Omicron Variant in South Africa. *New England Journal of Medicine* **386**, 2243–2245 (2022).
407. Cele, S. *et al.* Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* **602**, 654–656 (2022).

8. ANEXO I- PUBLICACIONES CIENTÍFICAS VINCULADAS A LA TESIS

8.1 Publicación 5

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

CORONAVIRUS

PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease

Maite Duhalde Vega^{1,2,†}, Daniela Olivera^{1,2,†}, Gustavo Gastão Davanzo^{3,†}, Mauricio Bertullo⁴, Verónica Noya⁵, Gabriela Fabiano de Souza⁶, Stéfanie Primon Muraro⁶, Icaro Castro⁷, Ana Paula Arévalo⁸, Martina Crispo⁸, Germán Galliussi⁹, Sofia Russo^{1,2}, David Charbonnier¹, Florencia Rammauro^{2,10}, Mathías Jeldres^{1,2}, Catalina Alamón¹¹, Valentina Varela¹¹, Carlos Batthyany⁹, Mariela Bollati-Fogolín¹², Pablo Oppezzo¹³, Otto Pritsch^{2,10}, José Luiz Proença-Módena⁶, Helder I. Nakaya⁷, Emiliano Trias¹¹, Luis Barbeito¹¹, Ignacio Anegon¹⁴, María Cristina Cuturi^{14,§}, Pedro Moraes-Vieira^{3,§}, Mercedes Segovia^{1,2,*§}, Marcelo Hill^{1,2,*§}

Severe COVID-19 is associated with hyperinflammation and weak T cell responses against SARS-CoV-2. However, the links between those processes remain partially characterized. Moreover, whether and how therapeutically manipulating T cells may benefit patients are unknown. Our genetic and pharmacological evidence demonstrates that the ion channel TMEM176B inhibited inflammasome activation triggered by SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2-related murine β -coronavirus. *Tmem176b*^{-/-} mice infected with murine β -coronavirus developed inflammasome-dependent T cell dysfunction and critical disease, which was controlled by modulating dysfunctional T cells with PD-1 blockers. In critical COVID-19, inflammasome activation correlated with dysfunctional T cells and low monocytic TMEM176B expression, whereas PD-L1 blockade rescued T cell functionality. Here, we mechanistically link T cell dysfunction and inflammation, supporting a cancer immunotherapy to reinforce T cell immunity in critical β -coronavirus disease.

INTRODUCTION

Coordinated innate and adaptive immunity triggered by pathogenic human and animal β -coronaviruses are thought to prevent severe disease through conserved mechanisms (1–6). Accordingly, when severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) arises, it is associated with dysregulated innate immunity (hyperinflammation), weak T cell responses, and high viral load (3, 5, 7–10). Thus, dysfunctional innate and adaptive immune responses may lead to uncontrolled viral replication and life-threatening disease. Nevertheless, whether

hyperinflammation affects T cell immunity needs further research. Monoclonal antibodies blocking the proinflammatory interleukin-6 (IL-6) receptor may add some therapeutic benefit in COVID-19 patients, although seemingly contradictory results have been reported (11–13). However, this therapy does not necessarily control viral load (14). CD8⁺ T cell responses have the potential capacity to control viral replication by killing infected cells (15). Nevertheless, therapeutic strategies aiming to reinforce T cell responses in β -coronavirus disease have not been developed. This scenario may be explained because (i) it is still unclear whether impaired T cell immunity causes severe disease (9) and (ii) the mechanisms leading to low T cell responses remain only partially understood (16, 17). Thus, characterizing these issues may help to repurpose and/or develop rational immunotherapies targeting T cells in critical COVID-19 patients.

T cells appear to be dysfunctional in COVID-19, although contradictory data have been published in this field (8, 18–23). Exhausted T cells are a specific lineage of dysfunctional cells characterized by impaired effector mechanisms and transcriptional, epigenetic, and metabolic programs as well as the expression of inhibitory receptors such as programmed cell death 1 (PD-1) (24, 25). Therapeutically, T cell exhaustion can be modulated by blocking PD-1 and its cognate ligand PD-L1 (26). PD-1/PD-L1 blockade improves disease-free and overall survival in several human cancers (27). However, it remains unknown whether PD-1/PD-L1 blockade may benefit COVID-19 patients (28). A mechanistic understanding of T cell dysfunction in β -coronavirus disease is necessary to validate and rationalize this approach. The efficacy of PD-1/PD-L1 blockers may be determined, at least in part, by the inflammatory context (29). Thus, characterizing potential links between inflammation and T cell dysfunction may help to select COVID-19 patients who could benefit from PD-1/PD-L1 blockade. We have proposed that

¹Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ²Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, 11800 Montevideo, Uruguay. ³Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil. ⁴Intensive Care Unit, CASMU, 11600 Montevideo, Uruguay. ⁵Laboratory of Molecular Biology, Sanatorio Americano, 11600 Montevideo, Uruguay. ⁶Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil. ⁷Hospital Israelita Albert Einstein, SP, Brazil. ⁸Laboratory Animals Biotechnology, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ⁹Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹⁰Laboratory of Immunovirology, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹¹Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹²Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹³Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹⁴INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology; Université de Nantes; CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), 44093 Nantes, France.

*Corresponding author. Email: msegovia@pasteur.edu.uy (M.S.); mhill@pasteur.edu.uy (M.H.)

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Institute of Biological Chemistry and Chemical Physics (UBA-CONICET), Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Junín 956 (C1113AAD), Buenos Aires, Argentina.

§These authors contributed equally to this work as co-senior authors.

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
License 4.0 (CC BY).

Downloaded from https://www.science.org on November 30, 2023

T cell exhaustion may be controlled by inflammasomes in cancer (29). Inflammasomes are cytosolic multiprotein complexes that sense cellular stress. Once activated, they cleave caspase-1, which then processes pro-IL-1 β and pro-IL-18, among other substrates, to yield the active and secreted forms of these cytokines (30). In myeloid cells, NLRP3 inflammasomes are inhibited through ionic mechanisms by the CD20-like MS4A family member TMEM176B, an intracellular acid-sensitive nonspecific cation channel (29, 31–34). Furthermore, *TMEM176B* was found to be overexpressed in monocytes from nonpneumonia versus its expression in those from pneumonia COVID-19 patients (35). We therefore speculated that TMEM176B-regulated inflammasomes may trigger T cell dysfunction in β -coronavirus infection.

Here, we show that TMEM176B controls inflammasome activation triggered by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and SARS-CoV-2-related murine hepatitis virus (MHV)-A59. Moreover, unleashed inflammasome activation leads to T cell dysfunction in the context of β -coronavirus infection. Last, PD-1/PD-L1 blockade restores T cell functionality in vitro in critical COVID-19 patients and in vivo in MHV-A59-infected *Tmem176b*^{-/-} mice.

RESULTS

TMEM176B is a protective host factor in β -coronavirus infection by controlling inflammasome activation

We first analyzed published single-cell RNA sequencing data from bronchioalveolar lavage (BAL) samples from moderately and severely ill patients (36). The expression of *TMEM176B* and the homologous gene *TMEM176A* was significantly down-regulated in BAL macrophages from severely ill patients versus in those from moderately ill patients (Fig. 1A). In contrast, *IL1B*, *NLRP3*, and *IL1R2* were up-regulated in BAL macrophages from severely ill patients (Fig. 1A). Next, we determined TMEM176B protein expression in CD14⁺ monocytes of peripheral blood from healthy donors (HDs), non-intensive care unit (non-ICU) patients, and ICU patients (fig. S1 and table S1). TMEM176B expression was inversely correlated with plasma active caspase-1 levels in the ICU patients but not in the non-ICU patients (Fig. 1B). Because TMEM176B controls inflammasome activation through ionic mechanisms (31), we then assessed whether TMEM176B may control inflammasome activation triggered by the SARS-CoV-2 ion channel envelope (E) protein. Transfection of THP-1 cells with SARS-CoV-2 E protein triggered IL-1 β secretion (Fig. 1C) and caspase-1 activation (fig. S2A), which were inhibited by cotransfecting cells with *TMEM176B* (Fig. 1, D and E) without affecting cell viability (fig. S2B). Thus, data from patients and genetic in vitro experiments support a role for TMEM176B in controlling SARS-CoV-2-induced inflammasome activation.

To further study a potential role for TMEM176B as a host-protective factor in β -coronavirus disease, we then worked with MHV-A59. MHV-A59 is a widely used β -coronavirus model that has been shown to induce conserved innate and adaptive immune responses in relationship to SARS-CoV-2 (1–6, 37). Moreover, liver injury is a frequent extrapulmonary manifestation of critically ill COVID-19 patients (38). We first observed that MHV-A59 peaked at 5 days post-infection (dpi) in the liver of wild-type (WT) mice (fig. S3A). *Tmem176b* expression was induced by MHV-A59 in the liver of WT mice peaking at 3 dpi (fig. S3B). Moreover, in infected animals, *Tmem176b* colocalized with major histocompatibility complex

(MHC) II staining, suggesting its expression by dendritic cells (DCs) in the liver (fig. S3C). The analysis of the survival rates revealed that *Tmem176b*^{-/-} mice were highly susceptible to MHV-A59, in clear contrast to WT animals that controlled the infection (Fig. 1F). Compared to WT animals, *Tmem176b*^{-/-} mice also showed increased levels of MHV RNA in the liver (Fig. 1G) and plasma glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity (Fig. 1H). Inflammasome activation has been shown to be associated with a worse outcome in MHV-infected mice (39). Thus, *Tmem176b* may protect the host by inhibiting MHV-induced inflammasome activation. Accordingly, we found that the livers of infected *Tmem176b*^{-/-} mice showed higher levels of active IL-1 β (17 kDa) and caspase-1 (20 kDa) than those of WT animals (Fig. 1, I and J). Flow cytometry analysis showed enhanced caspase-1 activation in CD11b⁺ and CD11b⁺ conventional DCs from *Tmem176b*^{-/-} mice compared to those from WT animals (Fig. 1, K and L, and fig. S4). Moreover, *Tmem176b* controlled the ability of MHV-A59 to activate NLRP3 inflammasomes in bone marrow-derived DCs (BMDCs) in vitro (fig. S5). Thus, *Tmem176b* regulates inflammasome activation in DCs induced by MHV-A59 infection in vitro and in vivo. We then wished to directly demonstrate a role for enhanced inflammasome activation in the worse outcome of *Tmem176b*^{-/-} mice. IL-1 β blockade (Fig. 1M) and *Casp1* deletion (Fig. 1N) significantly diminished the viral load and improved mouse survival in *Tmem176b*^{-/-} animals (Fig. 1O). Furthermore, inflammasome activation in *Tmem176b*^{-/-} mice may lead to impaired immunity against MHV-A59. Accordingly, depletion of CD8⁺ T cells abolished the improvement in survival and viral load control obtained with anti-IL-1 β antibody treatment (Fig. 1, M and O, and fig. S6). These results suggest that unleashed inflammasome activation in *Tmem176b*^{-/-} DCs impairs MHV control, likely by regulating CD8⁺ T cells.

Inflammasome-dependent CD8⁺ T cell exhaustion in *Tmem176b*^{-/-} mice infected with MHV-A59

To further support a pathogenic mechanism involving DCs and CD8⁺ T cells in MHV-A59-infected *Tmem176b*^{-/-} mice, we performed adoptive cell transfer (ACT) experiments. We observed that ACT of *Tmem176b*^{-/-} splenic DCs from infected mice into WT recipients infected with MHV-A59 decreased survival (Fig. 2A). Moreover, ACT of CD8⁺ T cells from infected WT animals rescued the survival of infected *Tmem176b*^{-/-} mice (Fig. 2A). Thus, enhanced inflammasome activation in DCs impairs anti-MHV-A59 immunity mediated by CD8⁺ T cells. Accordingly, *Tmem176b*^{-/-} mice had lower MHV-specific in vivo CD8-dependent cytotoxicity than WT and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} animals (Fig. 2, B and C). In agreement with a detrimental role of inflammasome activation in CD8⁺ T cell responses against MHV-A59, *Casp1*^{-/-} mice showed reinforced anti-MHV-A59 CD8⁺ T cell responses versus those in C57BL/6JN WT controls (fig. S7).

We then aimed to characterize the mechanisms by which CD8⁺ T cell responses were modulated by inflammasomes in MHV-A59 infection. We analyzed exhausted CD8⁺ T lymphocytes within MHV-A59-specific cells in infected animals. We observed increased progenitor exhausted MHV-specific CD8⁺ T cells (CD44⁺ PD-1⁺ TCF-1⁺ TOX⁺) in *Tmem176b*^{-/-}, compared to WT mice, but not in *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-} animals (Fig. 2, D and E). *Casp1* deletion in *Tmem176b*^{-/-} animals rescues the survival, viral load, in vivo CD8-dependent cytotoxicity, and relative number of exhausted CD8⁺ T cells, demonstrating a role for inflammasomes in the enhanced

Downloaded from https://www.science.org on November 30, 2023

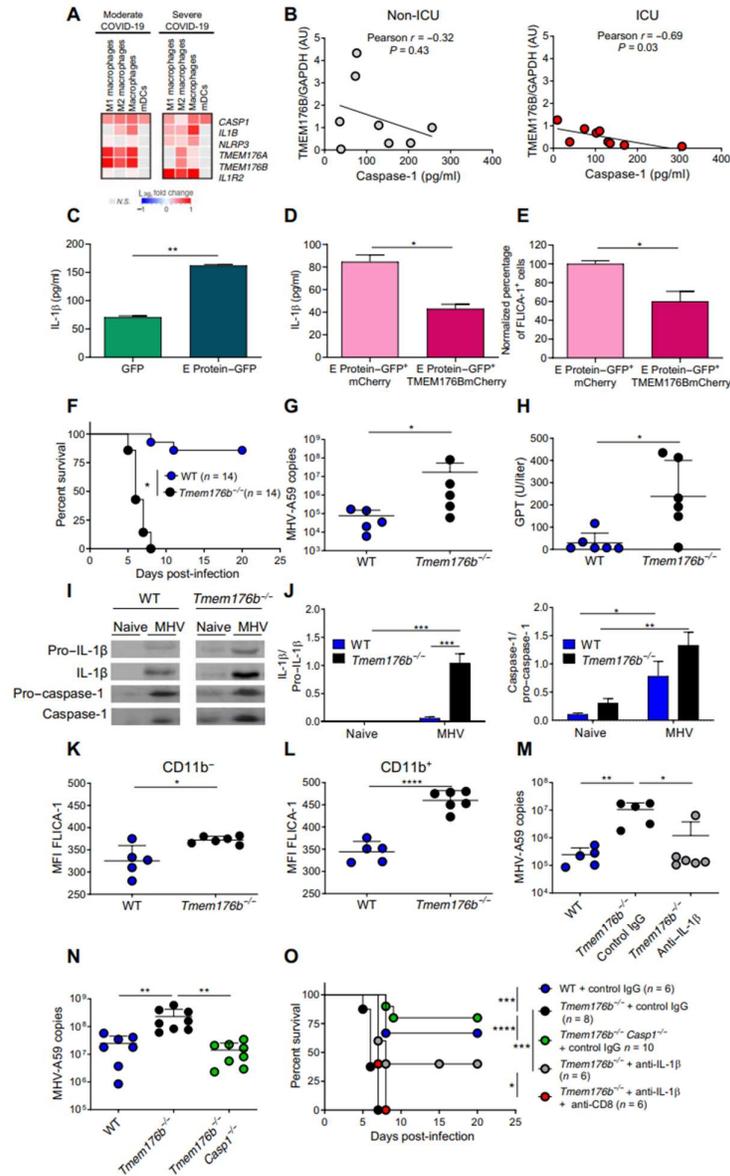


Fig. 1. TMEM176B is a protective host factor in β -coronavirus infection by controlling inflammasome activation. (A) Heatmaps of indicated transcripts. Analysis of published data (36). (B) Correlation study of TMEM176B/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ratio in CD14⁺ cells with plasmatic active caspase-1. AU, arbitrary units. (C) E protein triggers IL-1 β secretion by THP-1 monocytes. One experiment representative of three is shown. (** $P < 0.01$, Student's t test. (D and E) IL-1 β secretion and active caspase-1 triggered by E protein were inhibited by TMEM176B in THP-1 monocytes. One experiment representative of three is shown in (D), and a pool of two experiments is shown in (E). * $P < 0.05$, Student's t test. (F) Survival of MHV-A59-infected mice. * $P < 0.05$, log-rank (Mantel-Cox) test. (G) Viral load in the liver at 5 days post-infection (dpi). * $P < 0.05$, Student's t test. (H) Serum plasma glutamic-pyruvic transaminase (GPT) transaminase activity at 5 dpi. * $P < 0.05$, Student's t test. (I) Western blot study in the liver at 5 dpi. (J) Semiquantification of Western blot bands. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) test. (K and L) Percentage of FLICA-1⁺ cells within CD11c⁺ MHC II⁺ CD11b⁻ and CD11b⁺ cells. * $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$, Student's t test. (M and N) Viral load in the liver at 5 dpi. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, one-way ANOVA test. (O) Survival in infected mice. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, log-rank (Mantel-Cox) test.

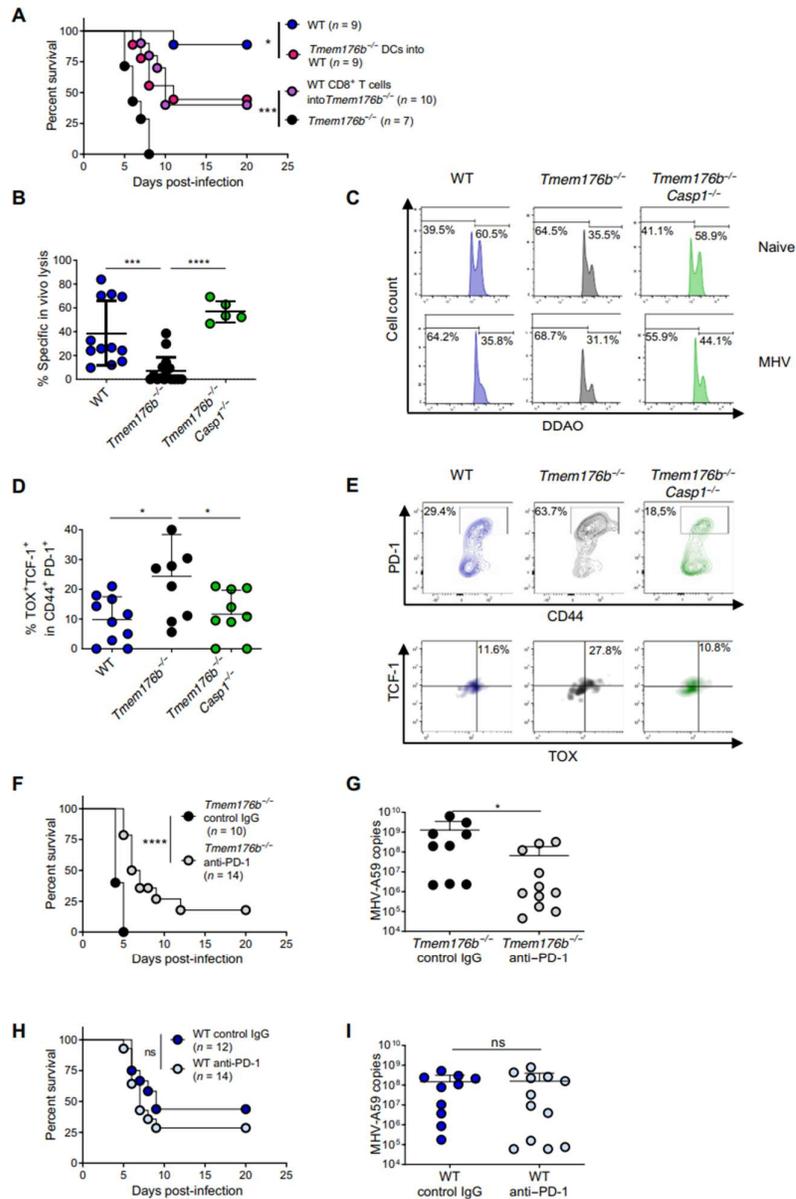


Fig. 2. Inflammation-dependent T cell exhaustion in *Tmem176b*^{-/-} mice infected with MHV-A59. (A) Survival of MHV-A59-infected WT and *Tmem176b*^{-/-} mice left untreated. In another group, infected WT mice were adoptively transferred with splenic DCs from infected *Tmem176b*^{-/-} animals, and *Tmem176b*^{-/-} mice were adoptively transferred with CD8⁺ T cells from infected WT animals. **P* < 0.05; ****P* < 0.001, log-rank (Mantel-Cox) test. (B) Percentage of MHV-A59-specific CD8-dependent in vivo lysis was calculated with the formula described in Materials and Methods. Twelve WT, 16 *Tmem176b*^{-/-}, and 5 *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} mice were studied at 5 dpi. ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001, one-way ANOVA test. (C) Representative histograms of the experiments shown in (B). (D) Percentage of liver-infiltrating TOX⁺ TCF-1⁺ within PD-1⁺ CD44⁺ cells, gated in CD8⁺ MHV-A59-specific T cells. Animals from two independent experiments were analyzed. **P* < 0.05, one-way ANOVA test. (E) Representative dot plots of the animals analyzed in (D). (F) Survival of *Tmem176b*^{-/-} mice infected with MHV-A59 and treated with control IgG or anti-PD-1 antibody. *****P* < 0.0001, log-rank (Mantel-Cox) test. (G) Viral load in the liver at 5 dpi with MHV-A59 in *Tmem176b*^{-/-} mice treated with control IgG or anti-PD-1 antibodies. **P* < 0.05, Mann-Whitney test. (H) Survival of WT mice infected with MHV-A59 and treated with control IgG or anti-PD-1 antibody. ns, nonsignificant. Log-rank (Mantel-Cox) test. (I) Viral load in the liver at 5 dpi with MHV-A59 in WT mice treated with control IgG or anti-PD-1 antibodies. Mann-Whitney test.

susceptibility of *Tmem176b*^{-/-} mice to MHV-A59 infection and restricted CD8⁺ T cell responses in those animals. Our observations thus support a role for inflammasome-dependent T cell exhaustion as a pathogenic mechanism in *Tmem176b*^{-/-} mice. T cell exhaustion was first shown to be partially reversed by PD-1 blockade during chronic viral infection (26). We then studied whether PD-1 blockade could improve the outcome of *Tmem176b*^{-/-} mice infected with murine β -coronavirus. Anti-PD-1 antibodies improved the survival and viral load of *Tmem176b*^{-/-} animals upon MHV-A59 infection (Fig. 2, F and G) but lacked efficacy against mild/moderate disease in WT animals (Fig. 2, H and I). Thus, our results show that the inflammasome-exhausted T cell axis regulated by TMEM176B is a key mechanism in determining biological responses to PD-1/PD-L1 blockade.

Pharmacological modulation of the inflammasome/dysfunctional T cell axis triggered by SARS-CoV-2 in vitro

Having provided genetic evidence that TMEM176B controls inflammasome activation triggered by SARS-CoV-2 and MHV-A59 and that this cation channel plays a host-protective role by limiting the inflammasome/dysfunctional T cell axis, we then wished to pharmacologically modulate this pathway. We hypothesized that triggering TMEM176B activity in human monocytes would block SARS-CoV-2-induced inflammasome activation and T cell dysfunction. We found that the flavonoid isquercitin (ISQ) triggers TMEM176B-dependent ion transport (Fig. 3A). ISQ treatment inhibited SARS-CoV-2-induced IL-1 β secretion (Fig. 3B) without affecting viral load (Fig. 3C). ISQ also inhibited caspase-1 activation (Fig. 3, D and E), showing that this flavonoid inhibits SARS-CoV-2-induced inflammasome activation in human CD14⁺ monocytes. Accordingly, the related compound quercetin was recently shown to control liver infection by MHV-A59 in mice (1). Moreover, quercetin therapy resulted in clinical improvement in two COVID-19 clinical trials (NCT04578158 and NCT04861298) (40, 41). We then assessed whether conditioned culture medium (CCM) from SARS-CoV-2-infected human primary monocytes could modulate alloreactive T cells. We observed that compared to CCM from uninfected (Mock) monocytes, CCM from infected monocytes induced PD-1 expression by CD8⁺ (Fig. 3F) and CD4⁺ (fig. S8) T cells. ISQ treatment of infected monocytes impaired SARS-CoV-2-induced CD8⁺ (Fig. 3F) and CD4⁺ (fig. S8) PD-1 expression. Moreover, PD-1 blockade significantly increased interferon- γ (IFN- γ) production by CD8⁺ (Fig. 3, G and H) and CD4⁺ (fig. S8) T cells in the presence of CCM from infected monocytes but not in the presence of CCM from uninfected cells. Thus, pharmacological activation of TMEM176B and PD-1/PD-L1 blocker treatment can abrogate T cell modulation induced by soluble factors produced by SARS-CoV-2-infected monocytes. We previously showed that blockade of IL-1 β controls T cell modulation by the CCM of SARS-CoV-2-infected monocytes (18). Thus, our results suggest that T cell dysfunction driven by TMEM176B-unleashed inflammasomes is triggered by SARS-CoV-2 in human monocytes.

The inflammasome/dysfunctional T cell axis is associated with severity of COVID-19

We then studied whether inflammasome activation may correlate with exhausted T cells in critical COVID-19. PD-1 expression and T cell exhaustion are thought to be driven by high levels of the transcriptional regulator thymocyte selection-associated high mobility

group box (TOX), whereas the functional role of low TOX levels in nonexhausted human T cells remains unknown (42–45). We first studied CD8⁺ T cell activation (CD38⁺ HLA-DR⁺) in HDs and in ICU versus non-ICU COVID-19 patients (figs. S9 and S10). We then analyzed PD-1 and TOX expression within the activated CD8⁺ T cells. ICU patients showed an increase in PD-1⁺ TOX⁺ cell percentages compared to those in non-ICU patients (Fig. 4, A and B) and HDs (fig. S9). We also observed a strong correlation between TOX and genes coding for inhibitory receptors in peripheral blood from severely ill COVID-19 patients but not from moderately ill COVID-19 patients from a previously published cohort (Fig. 4C and fig. S11) (46). In our cohort, we observed a significant positive correlation between the mean fluorescence intensity (MFI) for TOX and PD-1 within CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ T cells in the ICU patients but not in the non-ICU patients (Fig. 4D), suggesting that PD-1 is under the control of TOX in ICU patients. Thus, TOX⁺ CD8⁺ T cells may be exhausted in critically ill patients. We then found that exhaustion and inflammasome-related gene expression were highly correlated in severely ill patients but not in moderately ill patients from the McClain cohort (Fig. 4E and fig. S12) (46). Moreover, relative frequencies of PD-1⁺ TOX⁺ cells in CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ T lymphocytes positively correlated with plasma active caspase-1 levels in the ICU but not in the non-ICU patients (Fig. 4F). However, other inflammatory parameters did not correlate with the percentages of those cells in ICU patients (fig. S13). Thus, exhausted CD8⁺ T cells may be specifically controlled by inflammasomes in critically ill patients. In noncritically ill patients, the percentage of PD-1⁺ TOX⁺ cells within CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ T lymphocytes might be regulated by inflammasome-independent mechanisms (Fig. 4F and fig. S13). Active plasma caspase-1 levels, PD-1⁺ TOX⁺ CD8⁺ T cell levels, and TMEM176B expression by CD14⁺ monocytes were all not associated with humoral immune responses in ICU patients (fig. S14) or comorbidities (fig. S15). We then assessed whether in vitro PD-L1 blockade may abrogate T cell dysfunction in critically ill patients. Treatment of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from ICU COVID-19 patients with SARS-CoV-2 peptides was associated with increased percentages of PD-1⁺ TOX⁺ cells (Fig. 4G) but failed to significantly trigger IFN- γ production (Fig. 4H). In contrast, PD-L1 blockade rescued IFN- γ production in antigenic peptide-treated cells (Fig. 4H) but did not modify the percentage of PD-1⁺ TOX⁺ cells (Fig. 4G). Similar results were observed when tumor necrosis factor (TNF) production was assessed by flow cytometry (fig. S16). Moreover, in vitro PD-L1 blockade was not associated with a generalized increase in proinflammatory cytokine production by PBMCs from critical COVID-19 patients (fig. S17).

DISCUSSION

In this work, we report that PD-1/PD-L1 blockade overcomes inflammasome-dependent T cell dysfunction in critical β -coronavirus disease. We show a conserved pathogenic process that relates innate and adaptive immune dysfunction in critical β -coronavirus disease. Specifically, we linked inflammasomes to T cell exhaustion in infection by two β -coronaviruses, SARS-CoV-2 and MHV-A59. Moreover, TMEM176B was identified as a key regulator in this pathway. Our results help us understand how T cell dysfunction is regulated by inflammation while providing a mechanistic basis that supports a pathogenic role for inflammasomes in β -coronavirus disease.

Downloaded from https://www.science.org on November 30, 2023

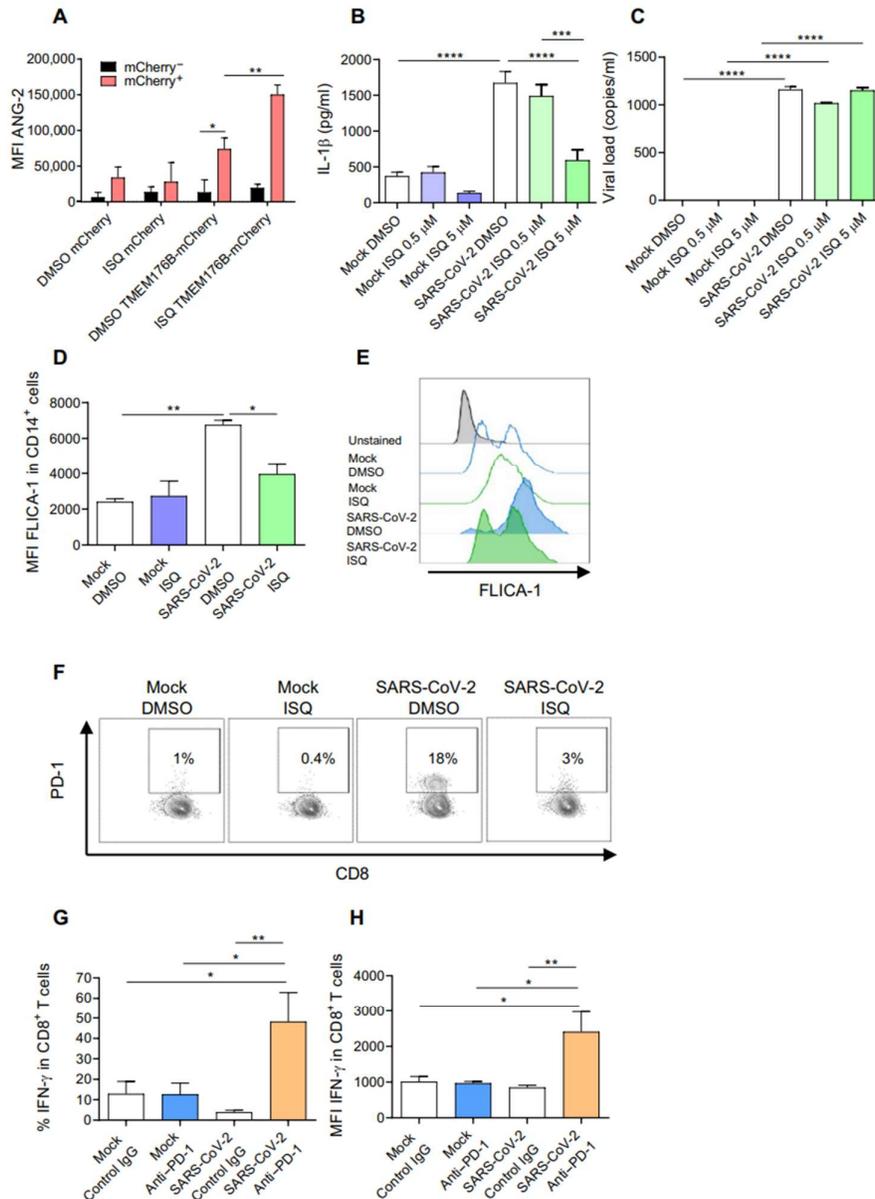


Fig. 3. Pharmacological modulation of the inflammasome/dysfunctional T cell axis triggered by SARS-CoV-2 in vitro. (A) Flow cytometry study of *TMEM176B*-dependent Na⁺ transport in CHO cells loaded with the Na⁺-sensitive probe Asante NaTRIUM Green-2 (ANG-2). Cells were treated with 5 μM of the flavonoid isoquercetin (ISQ) or dimethyl sulfoxide (DMSO; vehicle control). MFI, mean fluorescence intensity. One experiment representative of four is shown. **P* < 0.05; ***P* < 0.01, two-way ANOVA test. (B) Study of IL-1β secretion by human primary monocytes infected with SARS-CoV-2 ± ISQ. Mock, not infected. One experiment representative of three is shown. *****P* < 0.0001; *****P* < 0.0001, one-way ANOVA test. (C) Study of viral load in human primary monocytes infected with SARS-CoV-2 ± 5 μM ISQ. One experiment representative of three is shown. *****P* < 0.0001, one-way ANOVA test. (D) Study of FLICA-1 MFI (active caspase-1) from a pool of three independent experiments, where human primary monocytes were not infected (Mock) or infected with SARS-CoV-2 and treated with DMSO (vehicle control) or with 5 μM ISQ. **P* < 0.05; ***P* < 0.01, one-way ANOVA test. (E) Representative flow cytometry histograms of the experiments shown in (D). One experiment representative of three is shown. (F) Study of PD-1 expression by CD8⁺ TCR-β⁺ cells cocultured with allogeneic monocytes ± cell culture medium (CCM) from SARS-CoV-2-infected monocytes ± 5 μM ISQ. One experiment representative of three is shown. (G and H) Flow cytometry study of IFN-γ expression by CD8⁺ T cells cocultured with allogeneic monocytes ± CCM from uninfected monocytes (Mock) or SARS-CoV-2-infected cells ± anti-PD-1 or control antibody (20 μg/ml). The percentage of IFN-γ⁺ cells is shown in (G), and the MFI of positive cells is shown in (H). The graphics show one experiment representative of three. **P* < 0.05; ***P* < 0.01, one-way ANOVA test.

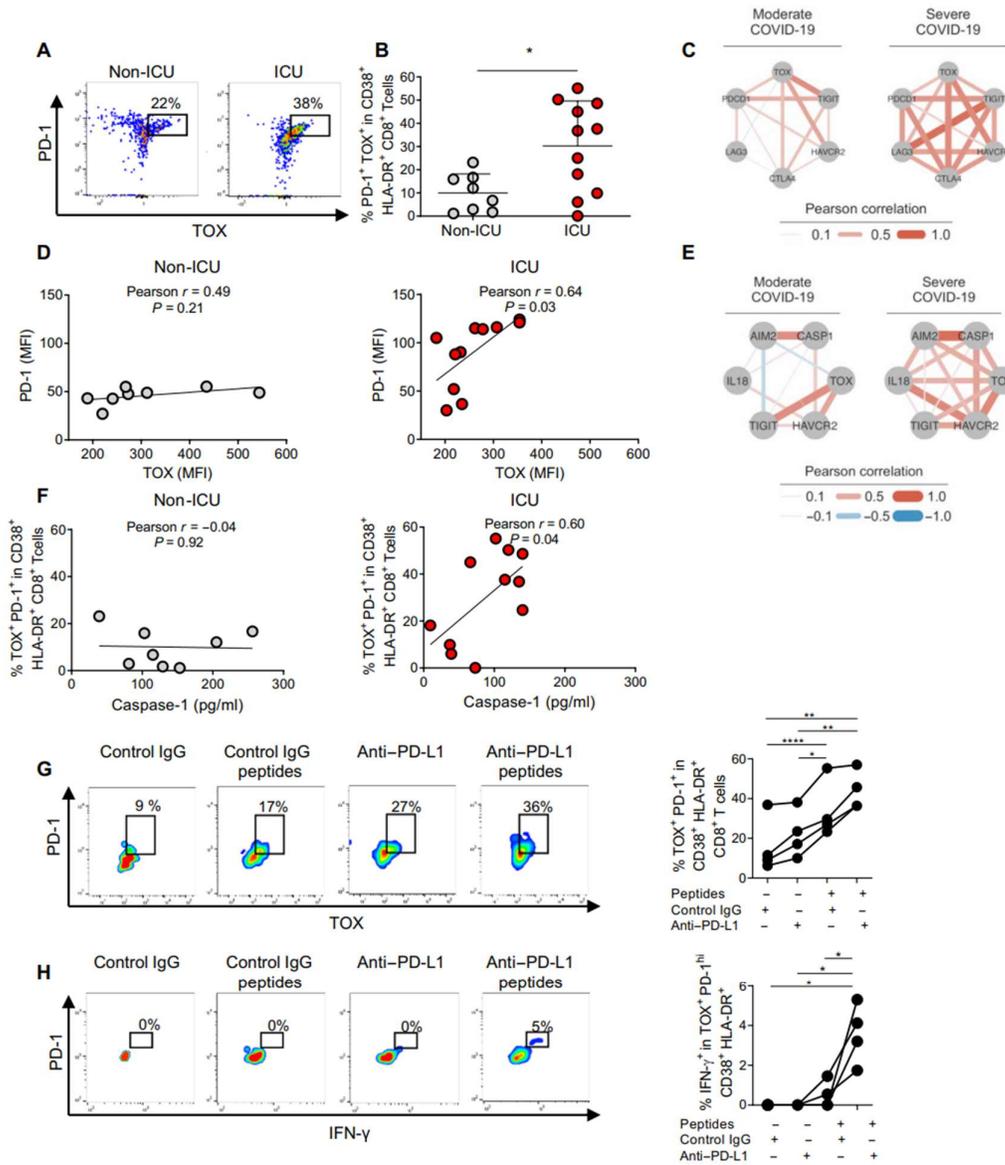


Fig. 4. Exhausted T cells correlate with plasmatic active caspase-1 in critical COVID-19 and can be modulated by anti-PD-L1 antibodies. (A) Representative dot plots of a flow cytometry study of PD-1 and TOX in CD8⁺ TCR-β⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ cells in non-ICU and ICU patients. (B) The graphic shows the individual percentages of PD-1⁺ TOX⁺ cells within CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ TCR-β⁺ for each studied patient. **P* < 0.05, Student's *t* test. (C) Network plot representing Pearson correlations of the indicated genes. Transcriptomic data from peripheral blood were analyzed from McClain *et al.* (46). (D) Correlation study between the MFI determined by flow cytometry of PD-1 and TOX within CD8⁺ TCR-β⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ cells in non-ICU and ICU patients. (E) Network plot representing Pearson correlations of the indicated genes. Transcriptomic data from peripheral blood were analyzed from McClain *et al.* (46). (F) Correlation study between the percentage of PD-1⁺ TOX⁺ cells in CD8⁺ TCR-β⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ cells and plasmatic active caspase-1 in non-ICU and ICU patients. (G) Flow cytometry study of the percentage of PD-1⁺ TOX⁺ cells within CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ T cells from four lymphopenic ICU patients. Cells were incubated for 24 hours with control IgG (20 μg/ml; human IgG1) or anti-PD-L1 antibody. Then, 6 nmol of SARS-CoV-2 peptides was added or not to the culture for 6 hours. Representative dot plots are shown in the left panel. Data for the four studied patients are shown in the right panel. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001, one-way ANOVA test. (H) Flow cytometry study of IFN-γ production by CD8⁺ TCR-β⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ PD-1⁺ TOX⁺ cells from the same ICU patients studied in (G) under the same *in vitro* treatments. Representative dot plots are shown in the left panel. Data for the four studied patients are shown in the right panel. **P* < 0.05, one-way ANOVA test.

Although MHV-A59 and SARS-CoV-2 are β -coronaviruses, they are still very different viruses. Thus, the common findings involving both viruses highlight a conserved pathogenic mechanism and therapeutic response. Active plasma caspase-1 and IL-18 levels have been associated with disease severity (47). Moreover, IL-1 receptor blockade led to improved overall and mechanical ventilation-free survival in severe but not mild-to-moderate COVID-19 patients (48–50). However, it was recently shown that blockade of IL-1 β and IL-18 resulted in increased mortality in SARS-CoV-2-infected transgenic hACE2 mice, suggesting that these inflammasome-related cytokines may play a protective role in this model (51). These results seem to contradict our observations as well as clinical outcomes obtained with IL-1 receptor antagonists. Nevertheless, the relevance of the hACE2 model to the study of inflammasome activation has been questioned (2, 3). Specifically, the fact that the transgene is not expressed by leukocytes (52) is a clear difference from natural SARS-CoV-2 infection in humans. Thus, the lack of leukocyte infection in hACE2 animals may not completely reproduce inflammasome activation in COVID-19 patients. Moreover, SARS-CoV-2 infection of hACE2 transgenic mice does not recapitulate the multiorgan viral spread seen in COVID-19 patients, whereas the MHV-A59 infection model does (2, 38).

Although T cell exhaustion has been classically associated with chronic viral infections, it is important to state that exhausted T cells can arise within a few days of infections with viral strains that result in chronic infections (45). Our results suggest that in a strong acute inflammatory environment, particularly with unleashed inflammasome activation, the clinical outcome of coronavirus disease can be worsened through mechanisms dependent on the generation of T cell exhaustion. Similarly, acute hyperinflammation in sepsis has also been proposed to be associated with exhausted T cells (53–55). Nevertheless, because only a 24-hour incubation with anti-PD-L1 blockers rescued T cell functionality, it is possible that the exhaustion status is not fully established in critical COVID-19 patients. However, we propose that PD-1/PD-L1 blockade may add clinical benefit in acute critical COVID-19. In clinical settings, although prior PD-1 blockade in cancer patients suffering from COVID-19 may improve T cell functionality against SARS-CoV-2 antigens (56), this therapy has not been shown to improve the clinical outcome of the viral disease when administered before infection (28, 57). Moreover, therapy with immune checkpoint blockers before infection was a predictor of hospitalization and severe COVID-19 in an observational study including 423 cancer patients (58). Thus, whether cancer patients being treated with PD-1/PD-L1 blockers that are infected with SARS-CoV-2 may obtain some benefit in COVID-19 outcome needs further research. Because PD-1/PD-L1 blockade may exacerbate the cytokine storm in severely ill patients, it has been suggested that clinical studies assessing anti-PD-1/PD-L1 therapy in COVID-19 should focus on mild disease (28). However, the pathogenic mechanisms reported here contradict this view. Our results in mice and in peripheral blood samples from COVID-19 patients add evidence supporting the use of PD-1/PD-L1 blockade therapy in critical β -coronavirus disease. However, there is a reasonable concern that PD-1/PD-L1 blockade in a hyperinflammatory scenario may lead to immunopathology. Nevertheless, a phase 1b clinical trial has shown that PD-1/PD-L1 blockade in sepsis is safe (59).

In conclusion, our study highlights a novel therapeutic strategy for COVID-19 based on the repurposing of a current cancer immunotherapy. This strategy is mechanistically supported by T cell

dysfunction driven by TMEM176B-unleashed inflammasomes in critical disease.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and kits

ISQ was from Quercegen Pharmaceuticals LLC. Nigericine, adenosine triphosphate (ATP), and lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4 were from Sigma-Aldrich. DDAO-SE [7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)] and Lipofectamine 2000 were from Thermo Fisher Scientific. FLICA 660 Caspase-1 Assay (FLICA-1) was from Immunochemistry. Random primers, TRIzol Reagent, and M-MLV Reverse Transcriptase were purchased to Invitrogen. Fast SYBR Green Master Mix was from Applied Biosystems. Active (p20) human caspase-1 kit was from R&D Systems. IL-1 β levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (BD OptEIA kit, BD Biosciences, San Jose, CA; 559603). Human CD14 positive selection kit, mouse CD8 negative selection kit, and CD11c positive selection kit were from Miltenyi. GPT quantification kit was from Human Diagnostics worldwide. PepTivator SARS-Cov-2 Prot_S P1 and Prot_S B1.1.529 Mutation Pools and PepTivator SARS-CoV-2 Select were from Miltenyi.

Viruses

MHV-A59 was provided by L. Retegui (UBA-CONICET, Argentina). MHV-A59 viruses were expanded in murine L929 cells [American Type Culture Collection (ATCC)] to a concentration of 1×10^7 plaque-forming units (PFU)/ml. The virus-containing supernatants were stored at -80°C until use.

HIAE-02 SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (GenBank accession number MT126808.1) virus was isolated from the second confirmed case in Brazil and donated by E. L. Durigon. SARS-CoV-2 virus stocks were propagated in the Vero cell line, and supernatant was harvested at 2 to 3 dpi. The viral titers were determined by plaque assays on Vero cells. Vero CCL-81 cells were cultivated in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin and incubated at 37°C with 5% CO_2 atmosphere.

Cells

BMDCs were generated from BM precursors from male and female C57BL/6 mice. BM cells from WT, *Tmem176b*^{-/-}, and *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} animals were cultured for 8 days in the presence of low doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (0.4 ng/ml) (31). By day 8, adherent cells were harvested and used for in vitro experiments. BMDCs were $>95\%$ CD11c⁺ CD11b⁺ MHC II^{int}. BMDCs were infected with MHV-A59 at different MOIs (multiplicities of infection) in vitro. Human THP-1 monocytes (TIB-202) and Chinese hamster CHO-K1 (CCL-61) cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA).

In vitro inflammasome activation

BMDCs were infected with MHV-A59 and human primary monocytes with SARS-CoV-2 for 24 hours. THP-1 monocytes were transfected with plasmid coding for envelope (E) protein from SARS-CoV-2 or control [green fluorescent protein (GFP)] plasmid. The presence of IL-1 β was assessed in culture supernatants by ELISA (BioLegend, 432603; R&D Systems, Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA). To determine caspase-1 activation, BMDCs, THP-1

cells, and primary human monocytes were stained with FLICA-1 and analyzed by flow cytometry.

THP-1 transfection and inflammasome activation

THP-1 monocytes were nucleofected with the GFP or SARS-CoV-2-E protein-GFP coding pcDNA3.1 plasmids using the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V-Lonza and Nucleofector 2b Device (Amaxa). In another set of experiments, THP-1 monocytes were cotransfected with SARS-CoV-2-E protein-GFP-pcDNA3.1 and pmCherry-N1 or TMEM176B-pmCherry-N1 plasmids. Sixteen hours later, cells were treated for 24 hours with lipopolysaccharide (0.25 µg/ml). Supernatants were collected to determine IL-1β by ELISA, and cell viability was assessed by flow cytometry using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Mice and experimental design

ARRIVE guidelines were followed for experimental research using mice. All animal protocols were approved by the institutional animal care and use committee of Institut Pasteur Montevideo (006-21). All mice in this study are on the C57BL/6 background, female and male, 8 to 10 weeks old. Sample size was determined using G*Power software (www.gpower.hhu.de). Mice were randomly distributed into experimental groups. *Tmem176b*^{-/-} mice were generated in the 129/SvJ strain, and heterozygous mice were backcrossed for 10 generations onto the C57BL/6 background (Janvier, Saint Berthevin, France) as reported (31). *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} mice were generated as previously described through CRISPR-Cas9 technology (31). *Nlrp3*^{-/-} (B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/J; 021302) and *Casp1/11*^{-/-} (B6N.129S2-Casp1tm1Flv/J; 016621) were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). *Nlrp3*^{-/-} animals were compared to 000664 C57BL/6J and *Casp1/11*^{-/-} mice to 005304 C57BL/6NJ. Mice were maintained in micro-isolator cages (IsoCageN, Techniplast, Milano, Italy), with autoclaved water and food (5K67 LabDiet, PMI Nutrition International, USA) supplied ad libitum and housed in the animal facility at the Institut Pasteur Montevideo. In vivo experiments, *Casp1/11*^{-/-} mice were intraperitoneally injected with 1200 PFU of MHV-A59 and *Tmem176b*^{-/-} mice were injected with 800 PFU. In neutralization experiments, mice were treated with anti-IL-1β antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN; clone AF-401-NA; 1 µg/5 days since day -2) or anti-PD-1 (clone RMP1-14 BP0146, Bio X Cell, West Lebanon, NH) (200 µg intraperitoneally/3 days) or rat IgG2a control antibody (clone 2A3 BP0089, Bio X Cell) or anti-CD8a (clone YTS169.4 BE0117, Bio X Cell; RRID:AB_10950145) (100 µg intraperitoneally/3 days from day -2) in depletion experiments. Mice were euthanized by cervical dislocation on the indicated days to obtain samples. Blinded processing of the samples and analysis of data were performed.

Western blot analysis

Liver extracts (50 µg of protein) were submitted to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose sheets (GE Life Sciences, Pittsburg, PA). After transfer, nonspecific antibody-binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin, 30 mM Tris, 0.14 M NaCl, and 0.1% (v/v) Tween 20 (pH 8.0) for 1 hour at room temperature with shaking. Specific antibody incubation was overnight at 4°C (anti-IL-1β, clone H-153, sc-7884, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX; RRID:AB_2124476; anti-caspase-1, AdipoGen Life Sciences, San Diego, CA; clone gasper-1; RRID:AB_2755041). Bound antibody was revealed with

peroxidase-labeled anti-mouse (115-035-003, Jackson Immuno Research, West Grove, PA; RRID:AB_10015289) or anti-rabbit (111-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; RRID:AB_2313567) and Pierce ECL reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Human CD14⁺ monocytes were studied with anti-TMEM176B (Abcam, 103929, rabbit polyclonal antibody; RRID:AB_10712259).

In vivo cytotoxic T lymphocyte assay

The assay was described previously (31). Briefly, splenocytes from naive mice were stained with DDAO. Control target cells were labeled with a low concentration of DDAO (0.08 µM), whereas target cells loaded with MHV-A59-specific peptide (RCQIFANI, S598-605) were labeled with a 10-fold concentration of DDAO (0.8 µM). The two cell populations are then mixed in equal numbers and transferred intravenously into syngeneic mice infected with MHV-A59 5 days before. Animals were euthanized 4 hours later, and cell suspensions were made from spleen and analyzed. The cell suspensions are then assessed by flow cytometry for the proportions of transferred cells. The % specific lysis was calculated as follows: % specific lysis = $(1 - [r_{\text{naive}}/r_{\text{infected}}]) \times 100$, where $r = \% \text{DDAO}_{\text{low}} \text{ cells} / \% \text{DDAO}_{\text{high}} \text{ cells}$.

TMEM176B activity assay

CHO cells were transfected with pmCherry-N1 or huTMEM176B-pmCherry-N1 plasmids using Lipofectamine LTX with Plus Reagent for 4 hours, washed, and cultured for 24 hours. Cells were then loaded with 1 mM ANG-2 (Asante NaTRIUM Green-2) for 30 min at 37°C, washed, and incubated for 30 min in 140 mM Na⁺-containing phosphate buffer or 140 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG) to substitute Na⁺ in the presence of different doses of tested drugs or vehicle controls. Cells were then analyzed by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer equipped with a 488-nm laser. ANG-2 emission was detected using a 530/30-nm band-pass filter, and mCherry was determined using a 670-nm long-pass filter. FlowJo vX.0.7 software was used for data analysis. MFI from NMDG-containing solutions was subtracted to MFI from Na⁺-containing solutions.

Flow cytometry

Caspase-1 activity from virus-infected BMDCs was determined using FLICA 660 Caspase-1 Assay (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN). For in vivo determination of CD8⁺ T cell infiltration, the following antibodies were used: anti-mouse CD8a (clone 53-6.7, 100714, BioLegend; RRID:AB_312753), anti-mouse T cell receptor (TCR) β chain (clone H57-597, 109226, BioLegend; RRID:AB_1027649), anti-mouse TCF-1 (clone C63D9, 6444S, Cell Signaling), anti-mouse TOX (clone TXX10, 50-6502-82, Invitrogen), anti-mouse/human CD44 (clone 30-F11, 103147, BioLegend; RRID:AB_256245), and anti-mouse CD279 (clone J43, 109110, BioLegend; RRID:AB_572017). Total liver and spleen recovered cells were stained with the indicated antibody for 20 min at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS)-0.2% FBS-0.1% sodium azide. Cells were washed two times with PBS-0.2% FBS-0.1% sodium azide and then analyzed using BD Aria FUSION (BD Biosciences) or CyAn ADP (Beckman Coulter) flow cytometer. For MHV-specific CD8⁺ T cell analysis, phycoerythrin (PE)-conjugated tetramers (RCQIFANI, S598-605, H-2Kb) prepared by the National Institutes of Health (NIH) Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA) were used. Total liver cells were stained with PE-conjugated tetramer (1:100 dilution). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Human PBMCs were stained with anti-TCR α/β (clone IP26, 351708, BioLegend; RRID:AB_10612569), anti-CD8 (clone RPA-T8, 344714, BioLegend; RRID:AB_2044006), anti-HLA-DR (clone L243, 307616, BioLegend; RRID:AB_493588), anti-PD-1 (clone EH12.2H7, 329916, BioLegend; RRID:AB_2283437), anti-CD38 (clone HIT2, 303504, BioLegend; RRID:AB_314356), anti-TOX (clone REA473, 130-120-785, Miltenyi), REA control antibody (I) human IgG1 (130-118-147, Miltenyi), anti-IFN- γ (clone B27, 506541, BioLegend; RRID:AB_2801101), anti-TNF (clone Mab11, 502928, BioLegend; RRID:AB_2561315), and mouse IgG1 κ isotype control (clone MOPC-21, 400144, BioLegend). Cytokines in the culture supernatant were quantified using a bead-based multiplex kit from BioLegend (740809, LegendPlex Human Inflammation Panel 1).

Quantitative real-time polymerase chain reaction in mouse studies

Total RNA was isolated with TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) from spleen and liver. Samples were analyzed in the Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA) using Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). The reactions were performed according to the following settings: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, followed by cycles of 60°C for 1 min. The following primers were used: MHV, GGAACCTCTCGTTGGG-CATTATACT (forward) and ACCACAAGATTATCATTTCACACATA (reverse).

Immunofluorescence staining

Mouse liver cryosections (20 μ m) were fixed in acetone, and the staining procedure used blocking buffer, followed by primary antibody stainings (anti-TMEM176B, Proteingroup, 19825-1; anti-MHC II, Serotec, MCA45R) and secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, Invitrogen, A-11029, or biotinylated anti-rabbit, Sigma-Aldrich, SAB3700936/streptavidin, Alexa Fluor 568 conjugate, Thermo Fisher Scientific, S11226). Sections were washed three times with PBS after each of the incubations. Nuclei were counterstained using DAPI. For negative controls, we incubated sections with isotype immunoglobulin G (IgG) control or PBS instead of primary antibodies. Images were acquired using an LSM 880 confocal microscope and Zen blue microscopy software (Zeiss).

Patients and HDs

All patients had a positive polymerase chain reaction (PCR) test for SARS-CoV-2. They were enrolled in accordance with the Institutional Review Board of CASMU and Sanatorio Americano (IPM-COVID19-001) and with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from patients and HDs after the nature and possible consequences of the studies were explained. HDs had a negative PCR test for SARS-CoV-2 and were negative for anti-SARS-CoV-2 antibodies. Patients and donors were not vaccinated against SARS-CoV-2. PBMCs were isolated with Ficoll/Hypaque density gradient centrifugation. CD14⁺ cells were enriched using a CD14 human positive selection kit from Miltenyi. Enrichments were typically >80%.

Buffy coats from Unicamp’s Hematology and Hemotherapy Center (SP-Campinas, Brazil) were used to isolate PBMCs. Buffy coats were diluted (1:1) with PBS. Twenty-five milliliters of mixture was carefully transferred to a 50-ml tube containing 7.5 ml of Ficoll, which was centrifuged at 2700 rpm for 20 min at room temperature,

without breaking. The layers of PBMCs were collected with a pipette and transferred to a new 50-ml tube and washed with PBS. The pellet was then incubated with a lysis buffer for 5 min for red blood cell removal and then washed with PBS. Total PBMCs were cultured as adherent monolayers (1.5×10^6 cells/ml) in RPMI 1640 supplemented with 1% penicillin-streptomycin. After 2 to 3 hours of adhesion, cells were washed with PBS and incubated until infection with RPMI 1640 containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C with 5% CO₂ atmosphere. This study was approved by the Brazilian Committee for Ethics in Human Studies (CAEE 31622420.0.0000.5404).

Charlson comorbidity index was calculated using www.mdcalc.com/charlson-comorbidity-index-cci. World Health Organization clinical progression scale (WHO-CPS) score was used as reported by the WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 infection (60).

Human lymphocyte isolation and mixed lymphocyte reaction

PBMCs isolated from buffy coats of healthy volunteers were used. Briefly, 5×10^5 cells were cocultured with 0.5×10^5 cells from another patient to allogenic reaction. The cells were incubated with pembrolizumab (20 μ g/ml) or IgG control or with different conditioned media. After 72 hours, cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (0.1 μ g/ml) and calcium ionophore (0.5 μ g/ml) (A23187) in the presence of brefeldin A (10 μ g/ml) for 4 hours. Cells were transferred to a clean conical 96-well plate, centrifuged at 2000 rpm for 5 min, and labeled with fixable viability stain, anti-CD3–BV421, anti-CD8–PECy7, and anti-CD4–APC (allophycocyanin) in PBS + 2% FBS for 20 min on ice. One hundred microliters of PBS + 2% FBS were added, and the cells were centrifuged at 2000 rpm for 5 min. Cells were permeabilized for 20 min using the Fixation/Permeabilization Kit (BD) and washed with Perm Wash buffer. The cells were incubated with anti-IFN- γ –BV605. Cells were then acquired by flow cytometry (FACSymphony, Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) and analyzed using FlowJo software.

Reagents and infection with SARS-CoV-2

Cells were infected with mock control or SARS-CoV-2 (MOI 0.1) under continuous agitation at 15 rpm for 1 hour for virus adsorption. After infection, cells were washed twice with prewarmed PBS. Cells were incubated with ISQ (0.5 and 5 μ M) in RPMI containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin for 24 hours at 37°C with 5% CO₂ atmosphere.

RNA extraction, viral load, and gene expression analyses in SARS-CoV-2 experiments

Total RNA extractions were performed using TRIzol Reagent according to the manufacturer’s instructions. RNA concentration was determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Extracted total RNA was reverse-transcribed using a GoScript Reverse Transcriptase cDNA synthesis kit according to the manufacturer’s instructions. For viral load detection, we used specific SARS-CoV-2 N1 primers targeting the N1 region. Standard curve was generated using serial dilutions of SARS-CoV-2. Viral load and gene expression quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) were performed using SYBR Green Supermix. All qRT-PCRs were performed using the Bio-Rad CFX394 Touch Real-Time PCR Detection System on 384-well plates.

Downloaded from <https://www.science.org> on November 30, 2023

Human IL-1 β ELISA

IL-1 β levels were measured in the supernatant of PBMCs infected or not with SARS-CoV-2 following the manufacturer’s instructions (R&D Systems, Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA).

Generation of conditioned medium

Conditioned medium was generated by incubating PBMCs with mock control or SARS-CoV-2 as described previously. Supernatant from each condition was collected and placed under ultraviolet light for 30 min for residual virus inactivation. Supernatants were stored in -80°C until use in human T cell experiments.

In vitro stimulation of PBMCs with SARS-CoV-2 peptides

Two million cells per well were seeded in U-bottom 96-well microplates in RPMI culture medium complemented with 10% autologous serum. Anti-PD-L1 or control human IgG1 was added at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Twenty-four hours later, 0.6 nmol of each peptide was incubated for 6 hours from a pool of SARS-CoV-2 peptides from M, N, E, and S WT proteins and from P.1 or Omicron S protein. Brefeldin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added for the last 4 hours of culture. Exhausted T cells, IFN- γ , and TNF production were studied by flow cytometry.

Anti-SARS-CoV-2 antibody ELISA

Specific IgG levels against the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike were determined in plasma samples from HDs, non-ICU patients, and ICU patients by using the COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (developed by Universidad de la República, Institut Pasteur Montevideo and ATGen Company), according to the manufacturer’s instructions. Quantitative test results were expressed in binding antibody units per milliliter, referred to the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code: 20/136) used for test calibration.

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using either one-way analysis of variance (ANOVA), two-way ANOVA, Student’s *t* test, or Mann-Whitney test as indicated in the figure legends. When the experimental design included three or more groups, ANOVA test was used. Survival curves were compared with the log-rank (Mantel-Cox) test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abn6545>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. C. D. Camell, M. J. Yousefzadeh, Y. Zhu, L. G. P. L. Prata, M. A. Huggins, M. Pierson, L. Zhang, R. D. O’Kelly, T. Pirtskhalava, P. Xun, K. Ejima, A. Xue, U. Tripathi, J. M. Espindola-Netto, N. Giorgadze, E. J. Atkinson, C. L. Inman, K. O. Johnson, S. H. Cholensky, T. W. Carlson, N. K. LeBrasseur, S. Khosla, M. G. O’Sullivan, D. B. Allison, S. C. Jameson, A. Meves, M. Li, Y. S. Prakash, S. E. Chiarella, S. E. Hamilton, T. Tchkonina, L. J. Niedernhofer, J. L. Kirkland, P. D. Robbins, Senolytics reduce coronavirus-related mortality in old mice. *Science* **373**, eabe4832 (2021).
2. S. Grabherr, B. Ludewig, N. B. Pikor, Insights into coronavirus immunity taught by the murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1062–1070 (2021).
3. S. Lee, R. Channappanavar, T.-D. Kanneganti, Coronaviruses: Innate immunity, inflammasome activation, inflammatory cell death, and cytokines. *Trends Immunol.* **41**, 1083–1099 (2020).
4. A. Sariol, S. Perlman, Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity* **53**, 248–263 (2020).

5. M. Zheng, R. Karki, E. P. Williams, D. Yang, E. Fitzpatrick, P. Vogel, C. B. Jonsson, T.-D. Kanneganti, TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **22**, 829–838 (2021).
6. S. Ryu, I. Shchukina, Y.-H. Youm, H. Qing, B. Hilliard, T. Dlugos, X. Zhang, Y. Yasumoto, C. J. Booth, C. Fernández-Hernando, Y. Suárez, K. Khanna, T. L. Horvath, M. O. Dietrich, M. Artyomov, A. Wang, V. D. Dixit, Ketogenic diet restrains aging-induced exacerbation of coronavirus infection in mice. *eLife* **10**, e66522 (2021).
7. T. S. Rodrigues, K. S. G. de Sá, A. Y. Ishimoto, A. Becerra, S. Oliveira, L. Almeida, A. V. Gonçalves, D. B. Perucello, W. A. Andrade, R. Castro, F. P. Veras, J. E. Toller-Kawahisa, D. C. Nascimento, M. H. F. de Lima, C. M. S. Silva, D. B. Caetite, R. B. Martins, I. A. Castro, M. C. Pontelli, F. C. de Barros, N. B. do Amaral, M. C. Giannini, L. P. Bonjorno, M. I. F. Lopes, R. C. Santana, F. C. Vilar, M. Auxiliadora-Martins, R. Luppino-Assad, S. C. L. de Almeida, F. R. de Oliveira, S. S. Batah, L. Siyuan, M. N. Benatti, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, L. D. Cunha, F. G. Frantz, T. Kohlsdorf, A. T. Fabro, E. Arruda, R. D. R. de Oliveira, P. Louzada-Junior, D. S. Zamboni, Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* **218**, e20201707 (2021).
8. D. Mathew, J. R. Giles, A. E. Baxter, D. A. Oldridge, A. R. Greenplate, J. E. Wu, C. Alanio, L. Kuri-Cervantes, M. B. Pampena, K. D’Andrea, S. Manne, Z. Chen, Y. J. Huang, J. P. Reilly, A. R. Weisman, C. A. G. Ittner, O. Kuthuru, J. Dougherty, K. Nzingha, N. Han, J. Kim, A. Pattekar, E. C. Goodwin, E. M. Anderson, M. E. Weirick, S. Gouma, C. P. Arevalo, M. J. Bolton, F. Chen, S. F. Lacey, H. Ramage, S. Cherry, S. E. Hensley, S. A. Apostolidis, A. C. Huang, L. A. Vella; UPenn COVID processing unit, M. R. Betts, N. J. Meyer, E. J. Wherry, Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* **369**, eabc8511 (2020).
9. C. Rydzynski Moderbacher, S. I. Ramirez, J. M. Dan, A. Grifoni, K. M. Hastie, D. Weiskopf, S. Belanger, R. K. Abbott, C. Kim, J. Choi, Y. Kato, E. G. Crotty, C. Kim, S. A. Rawlings, J. Mateus, L. P. V. Tse, A. Frazier, R. Baric, B. Peters, J. Greenbaum, E. Ollmann Saphire, D. M. Smith, A. Sette, S. Crotty, Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* **183**, 996–1012.e19 (2020).
10. Y. Liu, L.-M. Yan, L. Wan, T.-X. Xiang, A. Le, J.-M. Liu, M. Peiris, L. L. M. Poon, W. Zhang, Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 656–657 (2020).
11. J. H. Stone, M. J. Frigault, N. J. Serling-Boyd, A. D. Fernandes, L. Harvey, A. S. Foulkes, N. K. Horick, B. C. Healy, R. Shah, A. M. Bensaci, A. E. Woolley, S. Nikiforow, N. Lin, M. Sagar, H. Schragar, D. S. Huckins, M. Axelrod, M. D. Pincus, J. Fleisher, C. A. Sacks, M. Dougan, C. M. North, Y.-D. Halvorsen, T. K. Thurber, Z. Dagher, A. Scherer, R. S. Wallwork, A. Y. Kim, S. Schoenfeld, P. Sen, T. G. Neilan, C. A. Perugino, S. H. Unizony, D. S. Collier, M. A. Matza, J. M. Yin, K. A. Bowman, E. Meyerowitz, A. Zafar, Z. D. Drobni, M. B. Bolster, M. Kohler, K. M. D’Silva, J. Dau, M. M. Lockwood, C. Cubbison, B. N. Weber, M. K. Mansour; BACC bay tocilizumab trial investigators, Efficacy of tocilizumab in patients hospitalized with covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2333–2344 (2020).
12. O. Hermine, X. Mariette, P.-L. Tharaux, M. Resche-Rigon, R. Porcher, P. Ravaud; CORIMUNO-19 Collaborative Group, Effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and moderate or severe pneumonia: A randomized clinical trial. *JAMA Intern. Med.* **181**, 32–40 (2021).
13. The REMAP-CAP Investigators, Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1491–1502 (2021).
14. M. Masía, M. Fernández-González, S. Padilla, P. Ortega, J. A. García, V. Agulló, J. García-Abellán, G. Telenti, L. Guillén, F. Gutiérrez, Impact of interleukin-6 blockade with tocilizumab on SARS-CoV-2 viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19: A prospective cohort study. *EBioMedicine* **60**, 102999 (2020).
15. B. Israelow, T. Mao, J. Klein, E. Song, B. Menasche, S. B. Omer, A. Iwasaki, Adaptive immune determinants of viral clearance and protection in mouse models of SARS-CoV-2. *Sci. Immunol.* **6**, eabl4509 (2021).
16. Z. Chen, E. John Wherry, T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 529–536 (2020).
17. A. C. Karlsson, M. Humbert, M. Buggert, The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. *Sci. Immunol.* **5**, eabe8063 (2020).
18. A. C. Codo, G. G. Davanzo, L. de B. Monteiro, G. F. de Souza, S. P. Muraro, J. V. Virgilio-da-Silva, J. S. Prodonoff, V. C. Carregari, C. A. O. de Biagi Junior, F. Crunfli, J. L. Restrepo, P. H. Vendramini, G. Reis-de-Oliveira, K. B. dos Santos, D. A. Toledo-Teixeira, P. L. Parise, M. C. Martini, R. E. Marques, H. R. Carmo, A. Borin, L. D. Coimbra, V. O. Boldrini, N. S. Brunetti, A. S. Vieira, E. Mansour, R. G. Ulaf, A. F. Bernardes, T. A. Nunes, L. C. Ribeiro, A. C. Palma, M. V. Agrela, M. L. Moretti, A. C. Sposito, F. B. Pereira, L. A. Velloso, M. A. R. Vinolo, A. Damasio, J. L. Proença-Módena, R. F. Carvalho, M. A. Mori, D. Martins-de-Souza, H. I. Nakaya, A. S. Farias, P. M. Moraes-Vieira, Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /Glycolysis-dependent axis. *Cell Metab.* **32**, 498–499 (2020).
19. M.-S. Rha, H. W. Jeong, J.-H. Ko, S. J. Choi, I.-H. Seo, J. S. Lee, M. Sa, A. R. Kim, E.-J. Joo, J. Y. Ahn, J. H. Kim, K.-H. Song, E. S. Kim, D. H. Oh, M. Y. Ahn, H. K. Choi, J. H. Jeon,

- J.-P. Choi, H. B. Kim, Y. K. Kim, S.-H. Park, W. S. Choi, J. Y. Choi, K. R. Peck, E.-C. Shin, PD-1-expressing SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells are not exhausted, but functional in patients with COVID-19. *Immunity* **54**, 44–52.e3 (2021).
20. A. J. Wilk, A. Rustagi, N. Q. Zhao, J. Roque, G. J. Martinez-Colón, J. L. McKechnie, G. T. Ivison, T. Ranganath, R. Vergara, T. Hollis, L. J. Simpson, P. Grant, A. Subramanian, A. J. Rogers, C. A. Blish, A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1070–1076 (2020).
21. H.-Y. Zheng, M. Zhang, C.-X. Yang, N. Zhang, X.-C. Wang, X.-P. Yang, X.-Q. Dong, Y.-T. Zheng, Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 541–543 (2020).
22. M. Zheng, Y. Gao, G. Wang, G. Song, S. Liu, D. Sun, Y. Xu, Z. Tian, Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 533–535 (2020).
23. R. Zhou, K. K.-W. To, Y.-C. Wong, L. Liu, B. Zhou, X. Li, H. Huang, Y. Mo, T.-Y. Luk, T. T.-K. Lau, P. Yeung, W.-M. Chan, A. K.-L. Wu, K.-C. Lung, O. T.-Y. Tsang, W.-S. Leung, I. F.-N. Hung, K.-Y. Yuen, Z. Chen, Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity* **53**, 864–877.e5 (2020).
24. C. U. Blank, W. N. Haining, W. Held, P. G. Hogan, A. Kallies, E. Lugli, R. C. Lynn, M. Philip, A. Rao, N. P. Restifo, A. Schietinger, T. N. Schumacher, P. L. Schwartzberg, A. H. Sharpe, D. E. Speiser, E. J. Wherry, B. A. Youngblood, D. Zehn, Defining ‘T cell exhaustion’. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 665–674 (2019).
25. L. M. McLane, M. S. Abdel-Hakeem, E. J. Wherry, CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
26. D. L. Barber, E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, R. Ahmed, Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
27. A. Ribas, J. D. Wolchok, Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
28. M. Aldea, J.-M. Michot, F.-X. Danlos, A. Ribas, J.-C. Soria, Repurposing of anticancer drugs expands possibilities for antiviral and anti-inflammatory discovery in COVID-19. *Cancer Discov.* **11**, 1336–1344 (2021).
29. M. Hill, M. Segovia, S. Russo, M. Girotti, G. A. Rabinovich, The paradoxical roles of inflammation during PD-1 blockade in cancer. *Trends Immunol.* **41**, 982–993 (2020).
30. F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, The inflammasome. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
31. M. Segovia, S. Russo, M. Jeldres, Y. D. Mahmoud, V. Perez, M. Duhalde, P. Charnet, M. Rousset, S. Victoria, F. Veigas, C. Louvet, B. Vanhove, R. A. Floto, I. Anegón, M. C. Cuturi, M. R. Girotti, G. A. Rabinovich, M. Hill, Targeting TMEM176B enhances antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers by unleashing inflammasome activation. *Cancer Cell* **35**, 767–781.e6 (2019).
32. M. Segovia, C. Louvet, P. Charnet, A. Savina, G. Tilly, L. Gautreau, L. Carretero-Iglesia, G. Berioui, I. Cebrian, T. Cens, L. Hepburn, E. Chiffolleau, R. A. Floto, I. Anegón, S. Amigorena, M. Hill, M. C. Cuturi, Autologous dendritic cells prolong allograft survival through *Tmem176b*-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant.* **14**, 1021–1031 (2014).
33. M. Segovia, S. Russo, M. R. Girotti, G. A. Rabinovich, M. Hill, Role of inflammasome activation in tumor immunity triggered by immune checkpoint blockers. *Clin. Exp. Immunol.* **200**, 155–162 (2020).
34. I. Mattioli, A. Mantovani, M. Locati, The tetraspan MS4A family in homeostasis, immunity, and disease. *Trends Immunol.* **42**, 764–781 (2021).
35. K. Pekayvaz, A. Leunig, R. Kaiser, M. Joppich, S. Brams, A. Janjic, O. Popp, D. Nixdorf, V. Fumagalli, N. Schmidt, V. Polewka, A. Anjum, V. Knottenberg, L. Eivers, L. E. Wange, C. Gold, M. Kirchner, M. Muenchhoff, J. C. Hellmuth, C. Scherer, R. Rubio-Acero, T. Eser, F. Deák, K. Puchinger, N. Kuhl, A. Linder, K. Saar, L. Tomas, C. Schulz, A. Wieser, W. Enard, I. Kroidl, C. Geldmacher, M. von Bergwelt-Baildon, O. T. Keppler, M. Munschauer, M. Iannaccone, R. Zimmer, P. Mertins, N. Hubner, M. Hoelscher, S. Massberg, K. Stark, L. Nicolai, Protective immune trajectories in early viral containment of non-pneumonic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* **13**, 1018 (2022).
36. M. Liao, Y. Liu, J. Yuan, Y. Wen, G. Xu, J. Zhao, L. Cheng, J. Li, X. Wang, F. Wang, L. Liu, I. Amit, S. Zhang, Z. Zhang, Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 842–844 (2020).
37. M. Zheng, E. P. Williams, R. K. S. Malireddi, R. Karki, B. Banoth, A. Burton, R. Webby, R. Channappanavar, C. B. Jonsson, T.-D. Kanneganti, Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. *J. Biol. Chem.* **295**, 14040–14052 (2020).
38. A. Gupta, M. V. Madhavan, K. Sehgal, N. Nair, S. Mahajan, T. S. Sehrawat, B. Birkdeli, N. Ahluwalia, J. C. Ausiello, E. Y. Wan, D. E. Freedberg, A. J. Kirtane, S. A. Parikh, M. S. Maurer, A. S. Nordvig, D. Acclii, J. M. Bathon, S. Mohan, K. A. Bauer, M. B. Leon, H. M. Krumholz, N. Uriel, M. R. Mehra, M. S. V. Elkind, G. W. Stone, A. Schwartz, D. D. Ho, J. P. Bilezikian, D. W. Landry, Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1017–1032 (2020).
39. S. Guo, C. Yang, B. Diao, X. Huang, M. Jin, L. Chen, W. Yan, Q. Ning, L. Zheng, Y. Wu, Y. Chen, The NLRP3 inflammasome and IL-1 β accelerate immunologically mediated pathology in experimental viral fulminant hepatitis. *PLOS Pathog.* **11**, e1005155 (2015).
40. F. Di Pierro, G. Derosa, P. Maffioli, A. Bertuccioli, S. Togni, A. Riva, P. Allegrini, A. Khan, S. Khan, B. A. Khan, N. Altaf, M. Zahid, I. D. Ujjan, R. Nigar, M. I. Khushk, M. Phulpoto, A. Lail, B. R. Devrajani, S. Ahmed, Possible therapeutic effects of adjuvant quercetin supplementation against early-stage COVID-19 infection: A prospective, randomized, controlled, and open-label study. *IJGM* **14**, 2359–2366 (2021).
41. F. Di Pierro, S. Iqtadar, A. Khan, S. Ullah Mumtaz, M. Masud Chaudhry, A. Bertuccioli, G. Derosa, P. Maffioli, S. Togni, A. Riva, P. Allegrini, S. Khan, Potential clinical benefits of quercetin in the early stage of COVID-19: Results of a second, pilot, randomized, controlled and open-label clinical trial. *Int. J. Gen. Med.* **14**, 2807–2816 (2021).
42. F. Alfei, K. Kanev, M. Hofmann, M. Wu, H. E. Ghoneim, P. Roelli, D. T. Utzschneider, M. von Hoesslin, J. G. Cullen, Y. Fan, V. Eisenberg, D. Wohlleber, K. Steiger, D. Merkle, M. Delorenzi, P. A. Knolle, C. J. Cohen, R. Thimme, B. Youngblood, D. Zehn, TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* **571**, 265–269 (2019).
43. A. C. Scott, F. Dündar, P. Zumbo, S. S. Chandran, C. A. Klebanoff, M. Shakiba, P. Trivedi, L. Menocal, H. Appleby, S. Camara, D. Zamarin, T. Walther, A. Snyder, M. R. Femia, E. A. Comen, H. Y. Wen, M. D. Hellmann, N. Anandasabapathy, Y. Liu, N. K. Altorki, P. Lauer, O. Levy, M. S. Glickman, J. Kaye, D. Betel, M. Philip, A. Schietinger, TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270–274 (2019).
44. T. Sekine, A. Perez-Potti, S. Nguyen, J.-B. Gorin, V. H. Wu, E. Gostick, S. Llewellyn-Lacey, Q. Hammer, S. Falck-Jones, S. Vangeti, M. Yu, A. Smed-Sörensen, A. Gaballa, M. Uhlir, J. K. Sandberg, C. Brander, P. Nowak, P. A. Goepfert, D. A. Price, M. R. Betts, M. Buggert, TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8⁺ T cells. *Sci. Immunol.* **5**, eaba7918 (2020).
45. O. Khan, J. R. Giles, S. McDonald, S. Manne, S. F. Ngjowi, K. P. Patel, M. T. Werner, A. C. Huang, K. A. Alexander, J. E. Wu, J. Attanasio, P. Yan, S. M. George, B. Bengsch, R. P. Staupe, G. Donahue, W. Xu, R. K. Amaravadi, X. Xu, G. C. Karakousis, T. C. Mitchell, L. M. Schuchter, J. Kaye, S. L. Berger, E. J. Wherry, TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
46. M. T. McClain, F. J. Constantine, R. Henao, Y. Liu, E. L. Salik, J. M. Steinbrink, E. Petzold, B. P. Nicholson, R. Rolfe, B. D. Kraft, M. S. Kelly, D. R. Saban, C. Yu, X. Shen, E. M. Ko, G. D. Sempowski, T. N. Denny, G. S. Ginsburg, C. W. Woods, Dysregulated transcriptional responses to SARS-CoV-2 in the periphery. *Nat. Commun.* **12**, 1079 (2021).
47. T. S. Rodrigues, K. S. Sa, A. Y. Ishimoto, A. Becerra, S. Oliveira, L. Almeida, A. V. Goncalves, D. B. Perucello, W. A. Andrade, R. Castro, F. P. Veras, J. E. Toller-Kawahisa, D. C. Nascimento, M. H. de Lima, C. M. Silva, D. B. Caetite, R. B. Martins, I. A. Castro, M. C. Pontelli, F. C. de Barros, N. B. do Amaral, M. C. Giannini, L. P. Bonjorno, M. I. F. Lopes, M. N. Benatti, R. C. Santana, F. C. Vilar, M. Auxiliadora-Martins, R. Luppino-Assad, S. C. de Almeida, F. R. de Oliveira, S. S. Batah, L. Siyuan, M. N. Benatti, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, L. D. Cunha, F. G. Frantz, T. Kohlsdorf, A. T. Fabro, E. Arruda, R. D. de Oliveira, P. Louzada-Junior, D. S. Zamboni, Inflammasome activation in COVID-19 patients. *medRxiv* 2020.08.05.20168872, (2020).
48. G. Cavalli, G. De Luca, C. Campochiaro, E. Della-Torre, M. Ripa, D. Canetti, C. Oltolini, B. Castiglioni, C. T. Din, N. Boffini, A. Tomelleri, N. Farina, A. Ruggeri, P. Rovere-Querini, G. Di Lucca, S. Martinenghi, R. Scotti, M. Tresoldi, F. Ciceri, G. Landoni, A. Zangrillo, P. Scarpellini, L. Dagna, Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: A retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2**, e325–e331 (2020).
49. T. Huet, H. Beaussier, O. Voisin, S. Jouveshomme, G. Dauriat, I. Lazareth, E. Sacco, J.-M. Naccache, Y. Bézine, S. Laplanche, A. Le Berre, J. Le Pavec, S. Salmeron, J. Emmerich, J.-J. Mourad, G. Chatellier, G. Hayem, Anakinra for severe forms of COVID-19: A cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2**, e393–e400 (2020).
50. CORIMUNO-19 Collaborative group, Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): A randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 295–304 (2021).
51. E. Y. Wang, T. Mao, J. Klein, Y. Dai, J. D. Huck, J. R. Jaycox, F. Liu, T. Zhou, B. Israelow, P. Wong, A. Coppi, C. Lucas, J. Silva, J. E. Oh, E. Song, E. S. Perotti, N. S. Zheng, S. Fischer, M. Campbell, J. B. Fournier, A. L. Wyllie, C. B. F. Vogels, I. M. Ott, C. C. Kalinich, M. E. Petrone, A. E. Watkins; Yale IMPACT Team, A. Obaid, A. J. Moore, A. Casanovas-Massana, A. Lu-Culligan, A. Nelson, A. Nunez, A. Martin, B. Geng, C. D. Odio, C. A. Harden, C. Todeasa, C. Jensen, D. Kim, D. McDonald, D. Shepard, E. Courchaine, E. B. White, E. Silva, E. Kudo, G. Deluili, H. Rahming, H.-J. Park, I. Matos, J. Nouns, J. Valdez, J. Lim, K.-A. Rose, K. Anastasio, K. Brower, L. Glick, L. Sharma, L. Sewanan, L. Knaggs, M. Minasyan, M. Batsu, M. Kuang, M. Nakahata, M. Linehan, M. H. Askenase, M. Simonov, M. Smolgovsky, N. Sonnert, N. Naushad, P. Vijayakumar, R. Martinello, R. Datta, R. Handoko, S. Bermejo, S. Prophet, S. Bickerton, S. Velazquez, T. Rice, W. Khoury-Hanold, X. Peng, Y. Yang, Y. Cao, Y. Strong, C. Dela Cruz, S. F. Farhadi, W. L. Schulz, S. Ma, N. D. Grubaugh, A. I. Ko, A. Iwasaki, A. M. Ring, Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature* **595**, 283–288 (2021).
52. R.-D. Jiang, M.-Q. Liu, Y. Chen, C. Shan, Y.-W. Zhou, X.-R. Shen, Q. Li, L. D. Zhang, Y. Zhu, H.-R. Si, Q. Wang, J. Min, X. Wang, W. Zhang, B. Li, H.-J. Zhang, R. S. Baric, P. Zhou,

Downloaded from https://www.science.org on November 30, 2023

- X.-L. Yang, Z.-L. Shi, Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell* **182**, 50–58.e8 (2020).
53. K. Chang, C. Svabek, C. Vazquez-Guillamet, B. Sato, D. Rasche, S. Wilson, P. Robbins, N. Ulbrandt, J. Suzich, J. Green, A. C. Patera, W. Blair, S. Krishnan, R. Hotchkiss, Targeting the programmed cell death 1: Programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care* **18**, R3 (2014).
54. Y. Nakamori, E. J. Park, M. Shimaoka, Immune deregulation in sepsis and septic shock: Reversing immune paralysis by targeting PD-1/PD-L1 pathway. *Front. Immunol.* **11**, 624279 (2021).
55. D. Guinault, M.-L. Nicolau-Travers, S. Silva, O. Cointault, B. Daniau, A. Del Bello, M. Peres, D. Rousset, J. Rieunier, L. Lavayssiere, M.-B. Nogier, E. Hourcastagnou, A. Mari, N. Kamar, F. Vergez, S. Faguer, Expression of exhaustion markers on CD8⁺ T-cell patterns predict outcome in septic patients admitted to the ICU*. *Crit. Care Med.* **49**, 1513–1523 (2021).
56. N. Yatim, J. Boussier, P. Tetu, N. Smith, T. Bruel, B. Charbit, L. Barnabei, A. Corneau, L. Da Meda, C. Allayous, B. Baroudjian, M. Jebali, F. Herms, L. Grzelak, I. Staropoli, V. Calmettes, F. Hadjadji, O. Peyrony, C. Cassius, J. LeGoff, N. Kramkimel, S. Aractingi, M. Fontes, C. Blanc, F. Rieux-Laucat, O. Schwartz, B. Terrier, D. Duffy, C. Lebbé, Immune checkpoint inhibitors increase T cell immunity during SARS-CoV-2 infection. *Sci. Adv.* **7**, eabg4081 (2021).
57. L. Albiges, S. Foulon, A. Bayle, B. Gachot, F. Pommeret, C. Willekens, A. Stoclin, M. Merad, F. Griscelli, L. Lacroix, F. Netzer, T. Hueso, C. Balleyguier, S. Ammari, E. Colomba, G. Baciarello, A. Perret, A. Hollebecque, J. Hadoux, J.-M. Michot, N. Chaput, V. Saada, M. Hauchecorne, J.-B. Micol, R. Sun, D. Valteau-Couanet, F. André, F. Scotte, B. Besse, J.-C. Soria, F. Barlesi, Determinants of the outcomes of patients with cancer infected with SARS-CoV-2: Results from the Gustave Roussy cohort. *Nat. Cancer* **1**, 965–975 (2020).
58. E. V. Robilotti, N. E. Babady, P. A. Mead, T. Rolling, R. Perez-Johnston, M. Bernardes, Y. Bogler, M. Caldararo, C. J. Figueroa, M. S. Glickman, A. Joanow, A. Kaltsas, Y. J. Lee, A. Lucca, A. Mariano, S. Morjaria, T. Nawar, G. A. Papanicolaou, J. Predmore, G. Redelman-Sidi, E. Schmidt, S. K. Seo, K. Sepkowitz, M. K. Shah, J. D. Wolchok, T. M. Hohl, Y. Taur, M. Kamboj, Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nat. Med.* **26**, 1218–1223 (2020).
59. R. S. Hotchkiss, E. Colston, S. Yende, E. D. Crouser, G. S. Martin, T. Albertson, R. R. Bartz, S. C. Brakenridge, M. J. Delano, P. K. Park, M. W. Donnino, M. Tidswell, F. B. Mayr, D. C. Angus, C. M. Coopersmith, L. L. Moldawer, I. M. Catlett, I. G. Girgis, J. Ye, D. M. Grasela, Immune checkpoint inhibition in sepsis: A phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med.* **45**, 1360–1371 (2019).
60. J. C. Marshall, S. Murthy, J. Diaz, N. K. Adhikari, D. C. Angus, Y. M. Arabi, K. Baillie, M. Bauer, S. Berry, B. Blackwood, M. Bonten, F. Bozza, F. Brunkhorst, A. Cheng, M. Clarke, V. Q. Dat,

M. de Jong, J. Denholm, L. Derde, J. Dunning, X. Feng, T. Fletcher, N. Foster, R. Fowler, N. Gobat, C. Gomersall, A. Gordon, T. Glueck, M. Harhay, C. Hodgson, P. Horby, Y. Kim, R. Kojan, B. Kumar, J. Laffey, D. Malvey, I. Martin-Loeches, C. McArthur, D. McAuley, S. McBride, S. McGuinness, L. Merson, S. Morpeth, D. Needham, M. Netea, M.-D. Oh, S. Phyu, S. Piva, R. Qiu, H. Salisu-Kabara, L. Shi, N. Shimizu, J. Sinclair, S. Tong, A. Turgeon, T. Uyeki, F. van de Veerdonk, S. Webb, P. Williamson, T. Wolf, J. Zhang, A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect. Dis.* **20**, e192–e197 (2020).

Acknowledgments: We thank F. Hoffmann-La Roche Ltd. Uruguay for the donation of atezolizumab. We are grateful to A. Buschiazzi (Institut Pasteur Montevideo) for critically reading the manuscript. The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur Montevideo for support and assistance in the present work. We thank G. Moratorio and P. Moreno (Institut Pasteur Montevideo and University of the Republic) for helpful insights and L. Retegui for providing MHV-A59. We also thank H. Daghero (Institut Pasteur Montevideo) for technical assistance. **Funding:** This work was supported by Centro Latinoamericano de Biotecnología (CABBIO) (grant 014-01 to M.H.); Programme ECOS Sud, Université Sorbonne, Paris Nord (grant U17501 to M.H. and I.A.); Fondo de Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM) (grant COF 03/11 to C.B.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2020/04579-7 to P.M.-V. and FAPESP 2020/04558-0 to J.L.P.-M.); Fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão (FAEPEX 226/20 to J.L.P.-M. and P.M.-V.); Agencia Nacional de Investigación e innovación (grants ANII EQL_2013_X_1_2 and ANII PEC_3_2019_1_158811 to M.B.-F.); and PEDECIBA Biología. **Author contributions:** Conceptualization: M.S. and M.H. Methodology: M.D.V., D.O., G.G.D., M.B., V.N., G.F.d.S., S.P.M., I.C., A.P.A., M.C., G.G., S.R., D.C., F.R., M.J., C.A., V.V., C.B., M.B.-F., P.O., O.P., J.L.P.-M., H.I.N., E.T., L.B., I.A., M.C.C., P.M.-V., M.S., and M.H. Investigation: M.D.V., D.O., G.G.D., I.C., A.P.A., M.C., G.G., S.R., D.C., F.R., M.J., C.A., V.V., and M.S. Funding acquisition: M.C.C., P.M.-V., J.L.P.-M., M.S., M.H., I.A., L.B., E.T., and M.B.-F. Supervision: M.C.C., P.M.-V., M.S., and M.H. Writing—original draft: M.S. and M.H. Writing—review and editing: M.D.V., D.O., G.G.D., M.C.C., and P.M.-V. **Competing interests:** M.H., M.S., S.R., M.J., and M.C.C. are inventors of patents describing compounds targeting TMEM176B in cancer immunotherapy. M.H. is founder and chief scientific officer of ARDAN Pharma. The authors declare no other competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Submitted 10 December 2021

Accepted 2 August 2022

Published 21 September 2022

10.1126/sciadv.abn6545

8.2 Publicación 6

Received: 3 April 2023 | Revised: 6 June 2023 | Accepted: 3 July 2023

DOI: 10.1002/pro.4721

METHODS AND APPLICATIONS



Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface

Federico Carrión¹ | Florencia Rammauro^{1,2} | Natalia Olivero-Deibe¹ | Martín Fló^{1,2} | María Magdalena Portela^{3,4} | Analía Lima³ | Rosario Durán³ | Otto Pritsch^{1,2} | Sergio Bianchi^{5,6}

¹Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

²Facultad de Medicina, Departamento de Inmunobiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo & Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

⁴Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁵Departamento de Fisiopatología, Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁶Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Federico Carrión, Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
Email: fcarrion@pasteur.edu.uy

Sergio Bianchi, Departamento de Fisiopatología, Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Email: sbianchi@pasteur.edu.uy

Funding information

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Grant/Award Number: FMV_3_2022_1_172395; Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM), Grant/Award Number: COF03/11

Review Editor: John Kuriyan

Abstract

The interaction between the receptor-binding domain (RBD) of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and the peptidase domain of the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) allows the first specific contact at the virus–cell interface making it the main target of neutralizing antibodies. Here, we show a unique and cost-effective protocol using *Drosophila* S2 cells to produce both RBD and soluble human ACE2 peptidase domain (shACE2) as thermostable proteins, purified via Strep-tag with yields >40 mg L⁻¹ in a laboratory scale. Furthermore, we demonstrate its binding with K_D values in the lower nanomolar range (independently of Strep-tag removal) and its capability to be blocked by serum antibodies in a competition ELISA with Strep-Tactin-HRP as a proof-of-concept. In addition, we assess the capacity of RBD to bind native dimeric ACE2 overexpressed in human cells and its antigen properties with specific serum antibodies. Finally, for completeness, we analyzed RBD microheterogeneity associated with glycosylation and negative charges, with negligible effect on binding either with antibodies or shACE2. Our system represents an accessible and reliable tool for designing *in-house* surrogate virus neutralization tests (sVNTs), enabling the rapid characterization of neutralizing humoral responses elicited against vaccines or infection, especially in the absence of facilities to conduct virus neutralization tests. Moreover, our biophysical and biochemical characterization of RBD and shACE2 produced in S2 cells lays the groundwork for adapting to different variants of concern (VOCs) to study humoral responses elicited against different VOCs and vaccine formulations.

KEYWORDS

ACE2, binding, *Drosophila*, microheterogeneity, neutralization, RBD, S2 cells, SARS-CoV-2, virus–cell interface

1 | INTRODUCTION

SARS-CoV-2, identified in Wuhan (China) at the end of 2019, infects humans and causes the coronavirus disease 2019 (COVID-19; Wu et al., 2020), which has led to an ongoing pandemic.

The SARS-CoV-2 virion displays on its surface a trimeric glycoprotein called spike, responsible for membrane fusion with the target cells after interacting through its receptor-binding domain (RBD) with the cellular receptor: the human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2; Watanabe et al., 2020; Zhao et al., 2020). The RBD is stabilized by four internal disulfides and contains a beta-stranded core that displays two N-glycosites and an extended loop spanning the receptor-binding motif (RBM; Lan et al., 2020). RBD interacts via the RBM with the peptidase domain of hACE2 (Lan et al., 2020) and is the main target of neutralizing antibodies (nAbs; Goldblatt et al., 2022).

The rapid spread of SARS-CoV-2 in 2020 was followed by the fast development of effective vaccines, which were globally distributed, showing inequalities in access (Mathieu et al., 2021), concomitant with the emergence of multiple variants of concern (VOCs) with increased virulence, transmission, and immune escape (Mistry et al., 2022). In addition, different vaccine platforms have been shown to trigger a robust humoral immune response that wanes after a few months, motivating several countries to implement vaccine booster immunization that improves the response (Pascuale et al., 2022; Rammauro et al., 2022).

Vaccines distributed worldwide are based on the ancestral Wuhan variant, which was superseded by several VOCs; to date, the Omicron subvariants capable of evading antibody neutralization (Hoffmann et al., 2022; Planas et al., 2022) dominates the scene, and new "variant-based mRNA booster doses" are being evaluated (Chalkias et al., 2022) while its benefits remain on discussion (Callaway, 2022). However, as individual countries move toward approving these booster doses, the risk of repeating the history of inequity in vaccine access becomes imminent. Therefore, affordable strategies are needed to assess the multiple local contexts to minimize these effects.

In the absence of well-defined correlates of protection, measuring nAbs is the best approach to determining the level of protection against SARS-CoV-2 (Goldblatt et al., 2022). The best option for determining nAbs are the *plaque reduction neutralization tests* (PRNTs) and *pseudo-typed virus neutralization tests* (PVNTs), which require high-cost infrastructure and are time-consuming, further increasing the gap in testing capacity, especially in low-income countries. Despite limitations, *surrogate*

virus neutralization tests (sVNTs) have emerged as affordable and fast alternatives for studying humoral neutralizing responses (Tan et al., 2020). By its simple design based on the blockade of RBD-ACE2 binding in multi-well plates, sVNTs can be produced *in-house* and achieved in standard laboratories, giving sovereignty in vaccine decision-making, notably when lacking PRNTs or PVNTs capabilities.

As spike and hACE2 are membrane glycoproteins, eukaryotic systems remain the most suitable for recombinant production, and mammal cell systems are the most frequently used. Insect cells appear as a good alternative, overcoming some issues associated with production times, costs, and yields, as well as scalability and risk of contamination (Tripathi & Shrivastava, 2019) with baculovirus-based systems being extensively used to produce soluble SARS-CoV-2 glycoproteins (Li et al., 2020; Maffei et al., 2021; Struble et al., 2022), virus-like particles (Sullivan et al., 2022) and protein subunits vaccines (Li et al., 2022) in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* cells. Baculovirus-free insect cell systems have been shown to overcome some issues in production yield in *T. ni* (Korn et al., 2020), while examples using *Drosophila melanogaster* cells are scarce (Bagdonaite et al., 2021; Creutzmacher et al., 2022).

Here, we describe a simple pipeline to produce both the RBD of SARS-CoV-2 and the soluble peptidase domain of human ACE2 (shACE2) in *Drosophila* S2 cells with minimal technical requirements and high production yields. We also characterize its behavior in solution and demonstrate its binding, revealing strengths and weaknesses of the system for studying nAB responses elicited against SARS-CoV-2.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

2.1 | RBD and shACE2 proteins are purified from S2 culture supernatant

The recombinant protein design and their processing products are summarized in Figure 1a and described in Section 4. RBD-ST and shACE2-ST were both obtained in the culture supernatant and further purified by affinity chromatography (AC) with average yields of 40 and 60 mg L⁻¹, respectively (Supporting Information Figure S1), outperforming yields obtained with similar constructions in insect cells (Korn et al., 2020; Li et al., 2020; Maffei et al., 2021). In addition, RBD-ST and shACE2-ST were purified by size exclusion chromatography (SEC) as monomeric proteins (Figure 1b,c), with exclusion volumes corresponding to 40.2 and 87.7 kDa, respectively (Supporting Information Figure S2A,B).

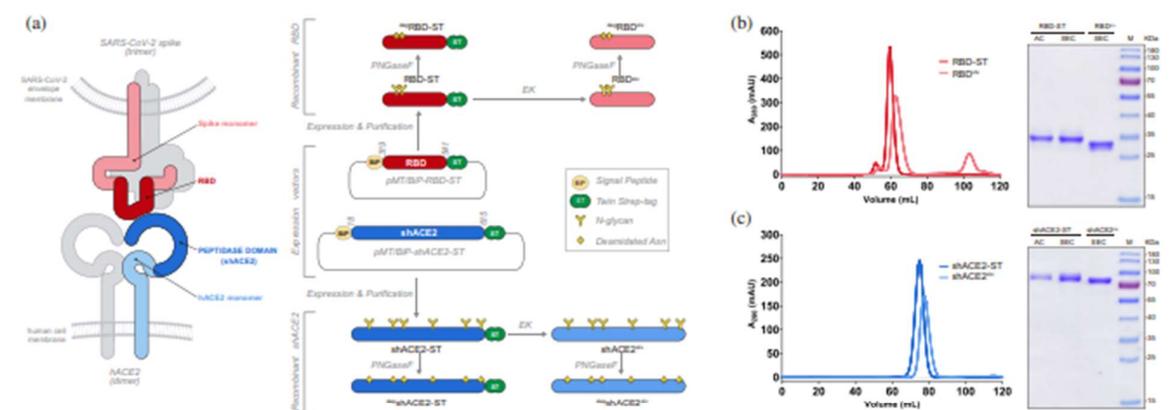


FIGURE 1 Expression and purification of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a) Scheme showing virus–cell interface with the spike and ACE2 monomers in red and blue tones, respectively (left) and plasmids constructions with its respective processed recombinant products using the same color code (right). The names identifying each protein appear alongside each processing product (in black text) and are the same used throughout this work. (b) Preparative SEC (left) and Coomassie-stained SDS-PAGE (right) of purified RBD-ST and RBD^{clv}. (c) Preparative SEC (left) and Coomassie-stained SDS-PAGE analysis (right) of purified shACE2-ST and shACE2^{clv}. SDS-PAGE lanes are identified as AC (fractions eluted from affinity chromatography), SEC (size exclusion chromatography), and M (molecular weight marker).

2.2 | Strep-tag can be removed without compromising protein stability

As our strategy involved using the Strep-tag for multiple purposes, not only as a purification tag but also to obtain immobilized or labeled counterparts in *in vitro* binding assays, it was imperative to accomplish its removal without compromising protein stability. Consequently, upon Strep-tag removal, both RBD^{clv} and shACE2^{clv} showed an expected average size reduction of ~3 kDa (Figure 1b,c; Supporting Information Figure S2C,D), while solubility was not affected as seen by dynamic light scattering (DLS) (Supporting Information Figure S3; Supporting Information Table S1).

Both RBD-ST and RBD^{clv} showed similar thermostability by nano-differential scanning fluorimetry (nanoDSF), with broad transitions and melting temperatures (T_m) of 50.7 and 51.5°C, respectively, above those reported with a similar construction using insect cells (Li et al., 2020) (Figure 2a). Both showed reversible thermal denaturation with refolding T_m values slightly below their unfolding counterparts (50.1 and 50.4°C, respectively). RBD unfolding transition in the presence of DTT was not detected, probably due to early denaturation upon disulfide reduction (Figure 2b), which is known to have a critical role on RBD secondary structure (Grishin et al., 2022), even affecting its binding with ACE2 (Shi et al., 2022).

On the other hand, shACE2-ST and shACE2^{clv} showed irreversible thermal unfolding with narrower transitions and slightly higher T_m values (54.6 and 54.5°C, respectively), agreeing with previous reports (Glasgow et al., 2020; Figure 2c). However, as opposed to

RBD, transitions in the presence of DTT are still detected with both, showing a shift in T_m values > 10°C (Figure 2d), suggesting a less preponderant role of disulfides in shACE2 stability as previously seen in human cells expression systems (Grishin et al., 2022).

2.3 | RBD and shACE2 binding functions resembles their natural counterparts

Protein binding was measured by isothermal titration calorimetry (ITC) using two independent experimental setups (Figure 3a). Both experiments were analyzed independently, confirming 1:1 binding stoichiometry and giving very similar thermodynamic parameters with a strong enthalpic contribution reminiscent of hydrophilic molecular contacts (Lan et al., 2020), further confirming that binding is not affected upon Strep-tag removal (Supporting Information Table S2). Measured K_D values range between 17.1 and 27.0 nM, in complete agreement with those obtained in similar conditions using proteins expressed in human cells (Prévost et al., 2021).

We also evaluated binding by surface performance resonance (SPR), injecting RBD^{clv} over captured shACE2-ST. Experimental datasets obtained with variable levels of immobilized shACE2-ST gave an average $K_D = 8.29 \pm 0.69$ nM (Figure 3b; Supporting Information Table S3), consistent with proteins expressed in human (Liu et al., 2021) and insect cells (Lan et al., 2020). Additionally, we demonstrated that RBD-ST binds full-length cell-associated hACE2 in a dose-

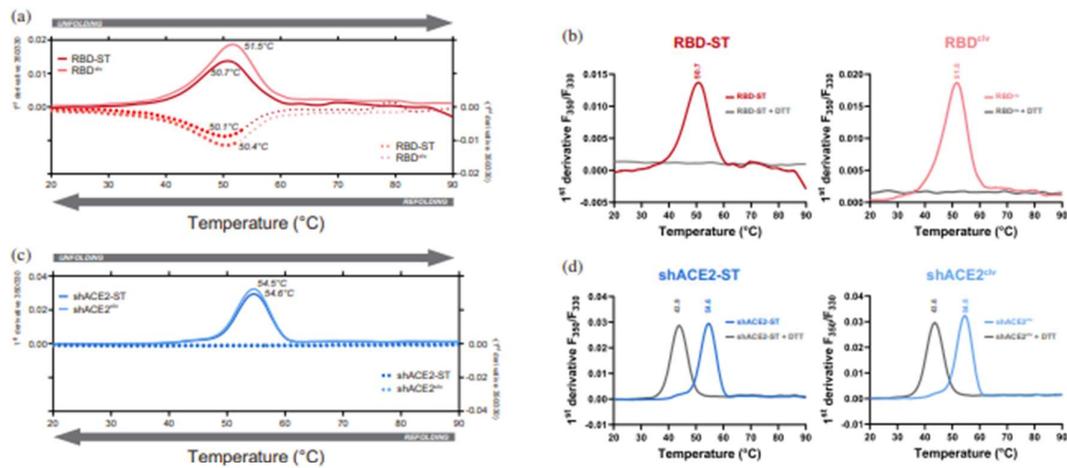


FIGURE 2 Thermostability of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a,c) Unfolding and refolding scans obtained by nanoDSF with both RBD-ST/RBD^{clv} and shACE2-ST/shACE2^{clv}, respectively. (b,d) Unfolding scans of reduced RBD-ST/RBD^{clv} and shACE2-ST/shACE2^{clv}. Unfolding is represented with continuous lines, while refolding is shown with dotted lines using the same color code. Gray-colored traces correspond to scans done in the presence of DTT. T_m values are shown next to each transition peak.

dependent way, as seen by flow cytometry (Figure 3c), and that RBD^{clv} is specifically recognized by human sera from naturally infected individuals (Figure 3d) as seen before (Amanat et al., 2020; Rammauro et al., 2022). Finally, we demonstrate with competition ELISA that reactive serum samples can block the interaction between immobilized RBD^{clv} and soluble shACE2-ST, providing proof-of-concept for its usage in sVNTs developed *in-house* (Figure 3e).

2.4 | RBD shows microheterogeneity related with glycans and negative-charges

MALDI-TOF/TOF analysis of RBD-ST allowed us to identify three out of four total disulfide bonds (Figure 4a). The ion corresponding to the intra-peptide bridge (C₄₈₀-C₄₈₈) was detected in MS-spectrum (m/z = x), while the inter-peptide crosslinked cysteines (C₃₇₉-C₄₃₂ and C₃₉₁-C₅₂₅) were further corroborated by MS/MS analysis (Supporting Information Figure S4). The C₅₃₈, which forms a disulfide with a spike's domain absent in our construction, was only detected as a reduced or cysteinylated residue (Supporting Information Figure S5). Peptides containing C₃₃₆ and C₃₆₁ (which form a disulfide on the viral spike protein) were only identified after reduction/alkylation, with the peptide 329-346 containing different combinations of paucimanosidic and high mannose glycans at N₃₃₁ and N₃₄₃ (Figure 4b; Supporting Information Figure S6).

We compared RBD^{clv} and its N-deglycosylated product (degRBD^{clv}) with two-dimensional electrophoresis

(2D-SDS-PAGE), showing several spots with a variable isoelectric point (pI) below its theoretical value (pI = 8.5) (Supporting Information Figure S7,A,B). Treatment with PNGaseF evidenced a size reduction, accompanied by a relative increase in the intensity of more acidic species (probably because of asparagine deamidation) but still showing microheterogeneity due to negative charges.

We confirmed this microheterogeneity using ionic exchange chromatography (IEX) and obtaining several fractions of RBD^{clv} (hereinafter identified from a to f), which eluted differentially in a salt concentration gradient (Figure 4c). In addition, we N-deglycosylated all RBD^{clv}-IEX fractions evidencing the same electrophoretic shift in SDS-PAGE, thus suggesting that N-glycan composition is homogeneously distributed along IEX fractions and not strictly associated with charges microheterogeneity (Supporting Information Figure S7,C,D).

RBD^{clv}-IEX fractions and their deglycosylated counterparts were sequentially reduced/alkylated and subjected to nano-HPLC MS/MS analysis. As seen with MALDI-TOF/TOF, the unmodified sequence of the peptide 329-346 was not identified in any case (Supporting Information Table S4), suggesting that it is heavily modified. In parallel, we identified this peptide in all degRBD^{clv}-IEX fractions containing deamidated asparagine residues (Supporting Information Table S5). Scans corresponding to doubly-deamidated peptide 329-346 represented 91%, while deamidation in a single asparagine corresponded to 0.2% and 8.8% for N₃₃₁ and N₃₄₃, respectively (Supporting Information Table S6). These results show that N-glycan occupancy in predicted sites is

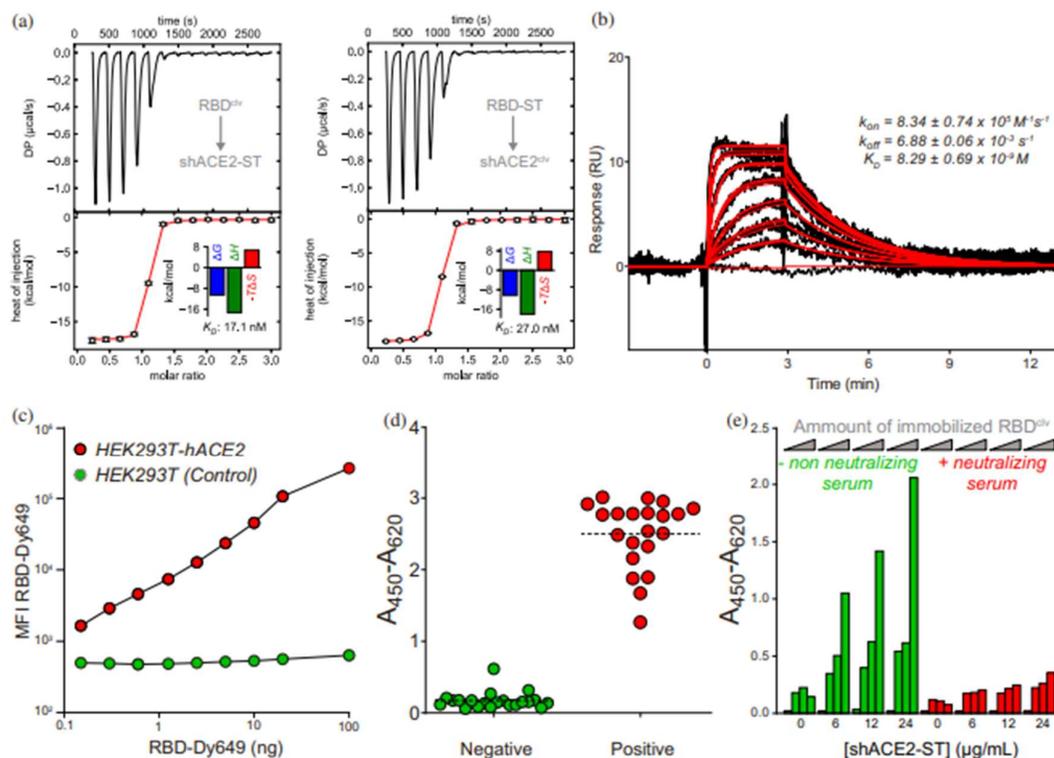


FIGURE 3 Functional analysis of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a) ITC analysis of shACE2-ST titrated with RBD^{clv} (left panel) and shACE2^{clv} titrated with RBD-ST (right panel). Each panel comprises the corrected thermogram upon baseline subtraction (up) and a schematic representation of the titration setup (inset). The integrated heat values fitting to a hetero-association model in red (bottom) are accompanied by the thermodynamic signature and K_D values (inset). (b) Representative SPR experiment with RBD^{clv} injected over captured shACE2-ST, with superimposed sensorgrams (black) and fitting to 1:1 Langmuir interaction model (red) and the average kinetic parameters obtained in three independent experiments (Supporting Information Table S3). (c) Mean fluorescence intensity (MFI) measured by flow cytometry in cells over-expressing hACE2 (red) and control cells (green), incubated with increasing amounts of fluorescent RBD (x-axis). (d) ELISA with a set of human sera identified as negative (pre-pandemic) and positive (confirmed by PCR and a commercial anti-SARS-CoV-2 ELISA) using RBD^{clv} as antigen. (e) Competition ELISA between different concentrations of shACE2-ST (x-axis) and two serum samples: a negative non-neutralizing serum (pre-pandemic, in green) and a positive neutralizing serum (confirmed with a commercial sVNT) to bind increasing amounts of immobilized RBD^{clv} (represented with gray triangles above each group).

high, with N₃₃₁ less occupied than N₃₄₃, as seen before with RBD expressed in human and insect cells (Bagdonaite et al., 2021; Sanda et al., 2021).

Regarding mono-glycosylated peptide 329–346, we identified paucimannosidic and high-mannose glycans only on N₃₄₃ (Supporting Information Table S7), probably because of the higher occupancy mentioned above. In contrast, double glycosylated peptides were not detected, probably due to their poorer ionization efficiency and high hydrophilicity, which impedes their binding to reversed-phase columns (Kozlik et al., 2017). Based on this, we propose that such mono-glycosylated peptides constitute an infrequent fraction of glycopeptides, but one that may help us elucidate which moieties are most

abundant in RBD expressed in S2 cells without ruling out the existence of motifs with higher content in mannose.

As for O-glycosylation, Tn and Core 1-type glycans were also identified in ^{deg}RBD^{clv} using nano-HPLC MS/MS. The most frequent O-glycosites were identified on threonine residues belonging to N-glycosylation sequons (T₃₃₃ and T₃₄₅), almost exclusively when the precedent N was not deamidated. This suggests that O-glycosylation only occurs at these positions in the absence of N-glycans, supporting the hypothesis that O-glycans could be masking unusually unoccupied N-glycosites on RBD expressed in S2 cells (Bagdonaite et al., 2021). In parallel, Core 1-type glycans were identified at T₃₂₃ and S₃₂₅ (with twice the frequency of Tn), as

2.

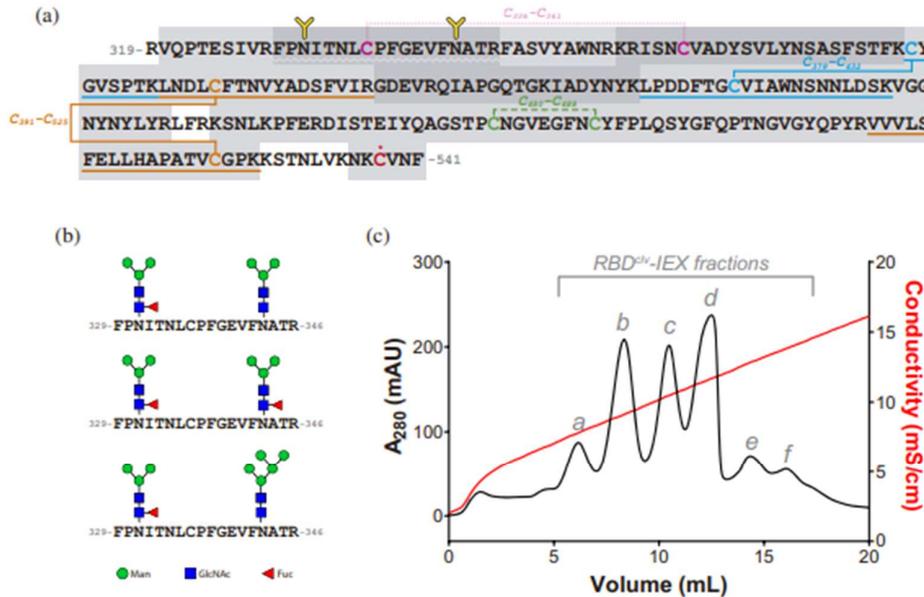


FIGURE 4 RBD micro-heterogeneity. (a) The RBD amino acidic sequence is shown with gray numbers indicating the spike position of N- and C-terminal residues (cleavage and Strep-tag sequences were omitted for clarity). Disulfide bonds are shown as Cysteines (c) linked by connectors identified with a unique color code for each pair and colored labels showing the Cysteine's positions. Peptides identified by MALDI-TOF/TOF in non-reducing conditions are identified in light gray, with the identified crosslinked peptides underlined using the same color code for each disulfide and paired cysteines. Sequences marked with dark gray boxes highlight those peptides exclusively identified in reduced/alkylated RBD-ST. The disulfide represented with a dashed green line was identified as an intra-peptide bond, those identified with continuous light blue and orange connectors were identified as crosslinked peptides (Supporting Information Figure S4), and the disulfide identified with dotted lines (pale magenta) could not be directly identified by MALDI-TOF/TOF analysis. The unpaired C₅₃₈ is shown in red with an asterisk. Predicted N-glycosylation sites are shown with a yellow Y above the asparagine residues (N₃₃₁ and N₃₄₃), and the corresponding glycopeptide (between 329 and 346) is underlined with a light-gray wavy line. (b) Glycopeptide 329–346 was identified by MALDI-TOF/TOF with N-glycan modifications at N₃₃₁ and N₃₄₃. (Supporting Information Figure S6). (c) Preparative ion exchange chromatography (IEX) of RBD^{div} showing differentially charged species named from a–f above each peak.

reported in human (Eldrid et al., 2021; Shajahan et al., 2020; Watanabe et al., 2020) and insect cells (Bagdonaite et al., 2021). Other O-glycosites were also identified with very low frequencies on RBD (Supporting Information Table S8). Our glycan characterization of RBD expressed in S2 insect cells is in full agreement with Bagdonaite et al. (2021), who used its proprietary system with different accessory sequences.

We looked for post-translational modifications (PTMs) that could explain negative charge micro-heterogeneity in RBD. Since sialylation (the most frequent source of negative charge micro-heterogeneity in glycoproteins) is rare in insect cells (Harrison & Jarvis, 2006), we excluded it from the analyses. In this regard, we found spontaneous deamidation of asparagine residues in all RBD^{div}-IEX fractions (Supporting Information Figure S8A), with peptide #10 (spanning about half of the RBM sequence) as the most frequently deamidated peptide (Supporting Information Figure S8B). However,

as deamidation frequency was not correlated with charges, we could not solely attribute micro-heterogeneity to its occurrence. In addition, Tris adducts on deamidated asparagine (and glutamine) residues (which could be further modifying deamidated asparagine residues [Kabadi et al., 2016] and affecting its detection) remained as a very marginal fraction (0.1%–1.3%) (Supporting Information Figure S8A; Supporting Information Table S9). Asparagine deamidation to aspartate (or iso-aspartate) entails changes in overall charge (and protein backbone) and has been associated with aging in *betacoronaviruses* spike protein, with RBM described as a deamidation hotspot (Lorenzo et al., 2021). Our results suggest that deamidation in the RBM of RBD expressed in S2 cells is responsible for the presence of negative charges; however, despite our efforts, we were unable to identify a set of modifications that exclusively explain micro-heterogeneity by negative charges in RBD, and additional studies are needed to fill this gap.

2.5 | Micro-heterogeneity does not affect RBD functionality

Spike glycosylation shields its surface, keeping it away from the immune system, and even promotes conformational movements that expose RBM to hACE2 (Casalino et al., 2020; Zhao et al., 2020). However, this effect is less noticeable when the RBD is expressed as a single domain (Gstöttner et al., 2021). We used SPR to compare specific recognition by a set of sera from vaccinated individuals with RBD-ST and ^{deg}RBD-ST, not evidencing significant differences in binding (Figure 5a; Supporting Information Figure S9).

We also evaluated by SPR the effect of glycosylation on RBD-shACE2 interaction, simultaneously injecting shACE2^{clv} (or ^{deg}shACE2^{clv}) over RBD-ST and ^{deg}RBD-ST, captured in two parallel surfaces. Throughout this work, we avoided shACE2^{clv} as an analyte in SPR experiments since affinity was underestimated, probably due to non-specific interactions with the sensorchip surface. However, in this case, it allowed us to detect differences in binding accurately (if any) using virtually the same analyte injection, thus avoiding protein quantification biases. Furthermore, despite showing differences with ITC and SPR (using RBD^{clv} as an analyte), binding affinities remained invariable despite deglycosylation of captured RBD-ST (Figure 5b,c; Supporting Information Table S10), thus showing that N-glycosylation does not affect its binding, as previously shown (Sun et al., 2020).

To complete our RBD characterization, we focused on the effect of negative charge micro-heterogeneity on its binding with shACE2 and specific serum antibodies.

First, we did SPR experiments injecting RBD^{clv}-IEX fractions over captured shACE2-ST, evidencing higher affinities with respect to control experiments using pre-IEX RBD^{clv} (mainly due to higher association rate constants, k_{on} ; Figure 6a-c; Supporting Information Table S11). Since dissociation rate constant (k_{off}) fitting is independent of the analyte concentration and considering that IEX implies an extra purification step (Figure 6d), we suggest slight differences in affinities are related to protein purification/quantification. Overall, our results demonstrate that micro-heterogeneity of RBD due to negative charges has no detrimental effect on its binding with shACE2.

Finally, we immobilized RBD^{clv}-IEX fractions in multi-well ELISA plates and analyzed their antigenicity with a variable set of SARS-CoV-2 positive sera. Despite not ruling out differences in response due to protein stability upon immobilization, our results demonstrate that all RBD^{clv}-IEX fractions show antigenicity with comparable results (Figure 6e).

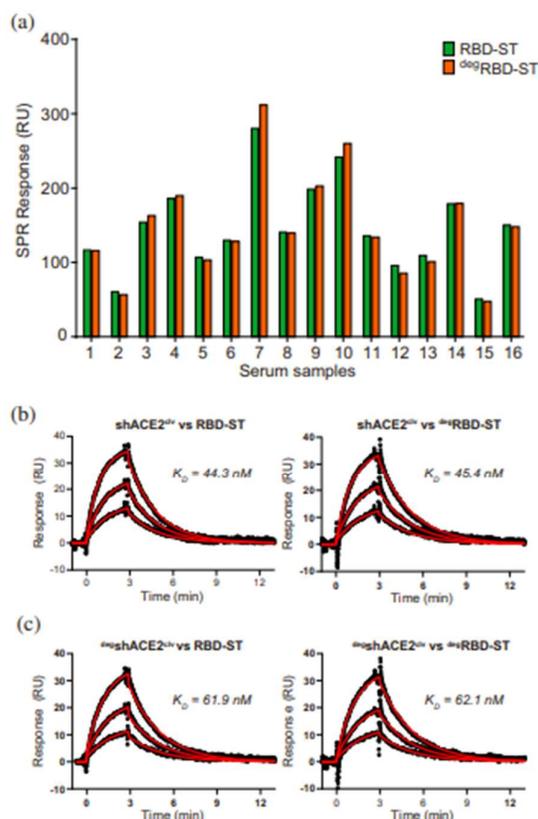


FIGURE 5 Effect of RBD N-glycosylation on binding with serum antibodies and shACE2. (a) SPR binding analysis of serum antibodies from 16 vaccinated individuals (identified with numbers 1–16) with captured RBD-ST (green bars) and ^{deg}RBD-ST (orange bars). SPR response was calculated as the average SPR signal between 1 and 1.5 min of dissociation. (b) SPR binding analysis between shACE2^{clv} injected on captured RBD-ST (left) and ^{deg}RBD-ST (right). (c) SPR binding analysis between ^{deg}shACE2^{clv} injected on captured RBD-ST (left) and ^{deg}RBD-ST (right). All SPR experiments were conducted in parallel using the same analyte injection. K_D values shown in each panel were obtained after fitting to a Langmuir 1:1 model (red traces).

3 | CONCLUSIONS

Our work is among the first to describe a cost-effective single pipeline to produce soluble versions of the SARS-CoV-2 RBD and the peptidase domain of human ACE2 using *Drosophila* S2 cells. We show they are produced with high yields, as stable and functional proteins containing or not Strep-tag. Furthermore, we found that RBD shows micro-heterogeneity due to glycosylation and variable negative charges. However, its effect on binding with ACE2 and specific antibodies is negligible,

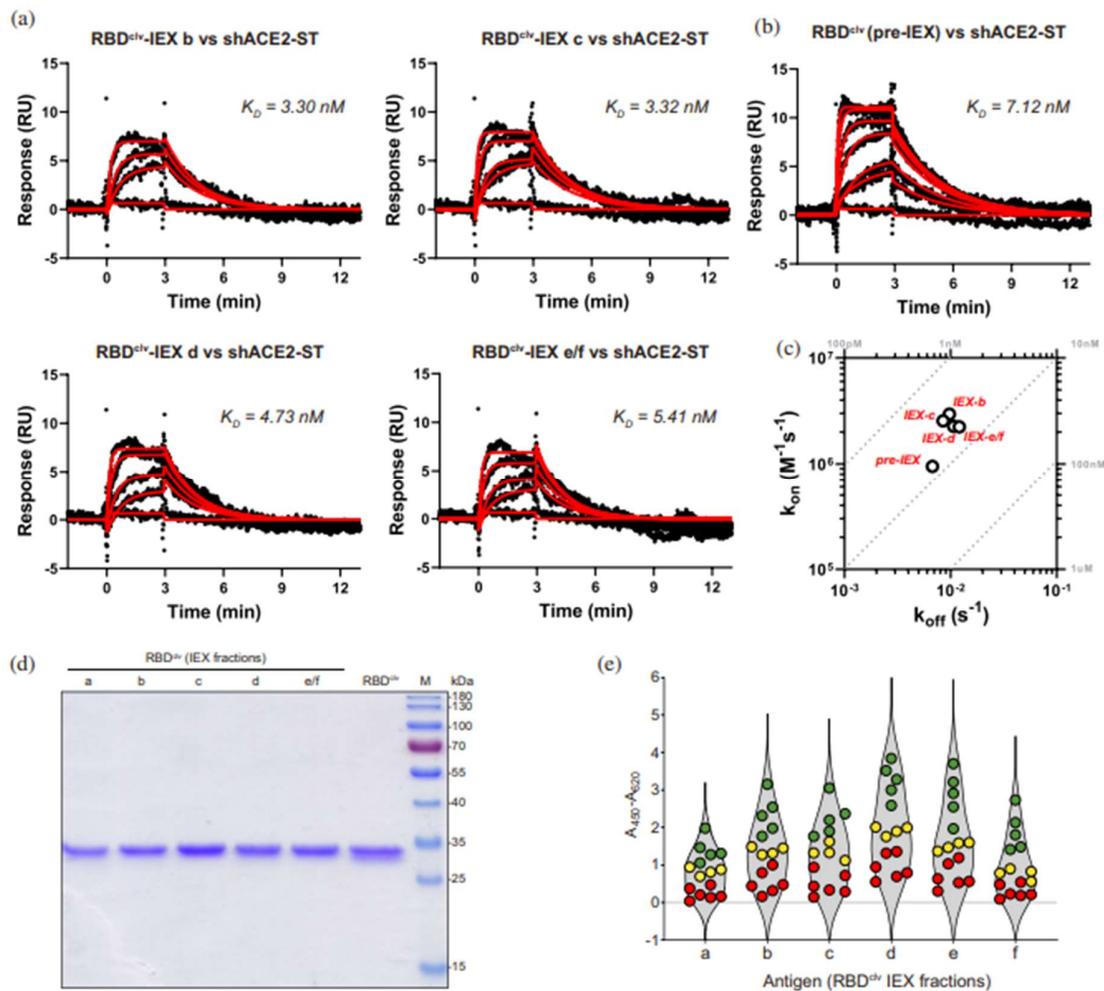


FIGURE 6 Effect of negative charges micro-heterogeneity of RBD on binding with shACE2 and serum antibodies. (a) SPR binding analysis of captured shACE2-ST with RBD^{ctv}-IEX fractions and (b) control RBD^{ctv} (pre-IEX). Poorly resolved e and f fractions were pooled and named e/f. All sensorgrams were fitted to a 1:1 Langmuir model (red traces) with the respective K_D values in each panel. (c) Comparison between kinetic parameters obtained by SPR in A and B, with dotted gray lines delimitating iso-affinity zones. (d) Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of RBD^{ctv}-IEX fractions after buffer exchange, protein concentration, and quantification. (e) Violin-plot of an ELISA achieved with a set of SARS-CoV-2 positive sera from infected individuals, using different RBD^{ctv}-IEX fractions as antigens. For clarity, individual serum samples were arbitrarily stratified and classified with a three-color code, according to absorbance results obtained with RBD^{ctv}-IEX d fraction (<1.5 are shown in red, between 1.5 and 2.5 are shown in yellow, and >2.5 are shown in green).

positioning our system as a reliable alternative to approach the virus-cell interface in vitro.

Since our work is restricted to RBD from the ancestral Wuhan variant, additional studies should be done with other VOCs in the future. Moreover, shACE2 PTMs associated with S2 cells should also be studied to characterize our system fully. Finally, as we cannot thoroughly explain the origin of charges micro-heterogeneity in RBD, we encourage researchers to assess other expression

systems and native viral proteins or immunogen formulations, looking for charges micro-heterogeneity and its effect on RBD function.

Given the results obtained in this paper, we propose RBD/shACE2 expressed in S2 cells to be used in sVNT, which can be applied in the context of limited access to BSL3, granting sovereignty in decisions making on the administration of new SARS-CoV-2 booster doses, facing each country's particular situation. Additionally, our

biophysical and biochemical characterization of proteins expressed in S2 cells strongly supports their suitability for the aforementioned applications.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | DNA constructs

DNA sequences coding for amino acids 319–541 of SARS-CoV-2 (Wuhan) spike glycoprotein (GenBank: MN908947.3) and 18–615 of hACE2 (GenBank: BAB40370.1), both fused to a C-terminal enterokinase cleavage site followed by a Twin-Strep-tag[®] (IBA) and a STOP codon, were optimized for *Drosophila* codon usage and synthesized by Genscript. Synthetic genes were cloned into a pMT/V5-His expression vector (Invitrogen) immediately after the BiP sequence as previously described (Krey et al., 2010; Figure 1a).

4.2 | Protein production

S2 stable cell lines expressing RBD-ST and shACE2-ST were obtained as described before (Rammauro et al., 2022) by co-transfection with the respective expression vector and pCoPuro selection plasmid using Effectene reagent (QIAGEN). Transfected cells were selected at 28°C in Insect Xpress medium (LONZA) added with 6 µg/mL puromycin. Stable S2 cell lines were grown in glass flasks at 28°C with 110 rpm agitation in standard orbital shaker and induced at 5×10^6 cells/mL with 5 µM CdCl₂. After 4 days of induction, cells were harvested by centrifugation at 150g for 5 min, and both proteins were purified from the culture supernatant by AC. For this, the supernatant was centrifuged at 6,000g, filtered through 0.22 µm and loaded in a 5 mL Strep-Tactin[®]XT 4Flow[®] columns (IBA), following the manufacturer's recommendations.

Strep-tag was removed by incubating overnight with Enterokinase-His (Genscript) (20 U mg⁻¹), followed by overnight dialysis in 0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.15 M NaCl, incubation with Ni-Sepharose[®] (Cytiva) for 2 h and finally subjected to a second AC step in 0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA (storage buffer).

Finally, recombinant proteins were subjected to SEC in storage buffer, using Superdex 75 and 200 columns (Cytiva) for RBD-ST/RBD^{clv} and shACE2-ST/shACE2^{clv}, respectively.

4.3 | Protein analysis in solution

Purified proteins were submitted to 12% SDS-PAGE (with 0.1 M DTT when required) and further analyzed by

standard Coomassie staining or western blot using Strep-Tactin-HRP (IBA) according to the manufacturer's recommendations. In addition, two-dimensional electrophoresis was carried out as before (Lima et al., 2011) using 100 µg of RBD^{clv} and degRBD^{clv}.

The hydrodynamic radius (R_{H1}) was analyzed by DLS in a Zetasizer Nano S (Malvern). Measurements were done in quintuplicate using quartz cuvettes at 25°C.

The thermostability of recombinant proteins was assessed by nanoDSF in a Prometheus NT.48 (Nanotemper). Unfolding and refolding T_m values were obtained upon sequential heating and cooling at 1°C/min between 20 and 90°C. When required, samples were incubated in 8000-fold excess of DTT (21–68 mM) for 1 h at 25°C.

4.4 | N-deglycosylation

N-deglycosylation was achieved under native conditions by incubating 200 µg of recombinant protein with 1000 U of PNGaseF (NEB) at 25°C overnight or under denaturant conditions at 37°C for 1 h following the recommendations of the manufacturer.

4.5 | Ion exchange chromatography

Purified proteins were buffer exchanged to 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl using PD-10 desalting columns (Cytiva), loaded onto a Mono Q[™] 5/50 column (Cytiva) equilibrated in the same buffer for ion exchange chromatography (IEX). Then, they eluted with 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl in a 40 CVs gradient.

4.6 | Mass spectrometry analyses

4.6.1 | Sample preparation

Sample preparation for MS was achieved with soluble proteins or bands from Coomassie-stained SDS-PAGE. When required, an initial reduction/alkylation step was conducted, as previously reported (Rivera et al., 2020). Sample preparation from SDS-PAGE bands for MALDI-TOF/TOF was done as before (Rossello et al., 2017), while for proteins in solution, tryptic peptides were obtained and desalted using C18 OMIX tips (Agilent). For MALDI-TOF/TOF, elution was performed on a plate, and for LC-MS/MS, eluates were vacuum-dried and resuspended in 0.1% formic acid as previously described (Olivero-Deibe et al., 2021).

4.6.2 | MALDI-TOF/TOF

Tryptic peptides were analyzed using a 4800 MALDI-TOF/TOF (Abi Sciex). Spectra were acquired in reflector mode, and MS/MS analysis was performed for selected ions. Proteins were identified by database searching NCBI (20160821) using MASCOT search engine (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>) and the following parameters: monoisotopic mass tolerance, 0.03 Da; fragment mass tolerance, 0.5 Da; methionine oxidation as variable modifications, and cysteine carbamidomethylation as fixed modification (when corresponds). In addition, unassigned intense signals were fragmented for manual interpretation of N-glycosylation.

4.6.3 | LC-MS/MS analysis

Tryptic peptides were subjected to LC-MS/MS as before (Olivero-Deibe et al., 2021) using a gradient from 0% to 35% of mobile phase B over 90 min, and mass analysis was performed in a data-dependent mode using a top 12 method (Rivera et al., 2020). Database searches were performed using a *D. melanogaster* target-decoy database containing RBD sequence from Uniprot (June 2020) using PatternLab V (Santos et al., 2022). Searching parameters are listed in Supporting Information tables, and peptide spectrum matches were filtered to reach FDR $\leq 1\%$ at the protein level.

4.6.4 | Isothermal titration calorimetry

ITC was done on a VP-ITC (Malvern Panalytical) by titrating 10 μM shACE2-ST or shACE2^{clv} with 150 μM RBD^{clv} or RBD-ST, respectively, in storage buffer at 25°C. Data analysis and fitting to a hetero-association model were done as before (Medeiros et al., 2020).

4.6.5 | Surface plasmon resonance

SPR experiments were done at 25°C and flowrate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a Biacore 3000, with 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) P20 as running buffer, and CM5 sensorchips (Cytiva) previously coated with Twin-Strep-tag[®] Capture Kit (IBA), according to recommendations of the manufacturer. All sensorgrams were double-referenced and analyzed with BIAevaluation software v4.1.

Binding analyses were done by capturing shACE2-ST (at densities between 44 and 88 RUs) and injecting RBD^{clv} in triplicates at 2-fold increasing concentrations from 3 to 192 nM. In addition, the glycosylation effect on

binding was assayed by capturing RBD-ST (or ^{deg}RBD-ST) at densities of 35 and 25 RUs, respectively, and injecting shACE2^{clv} (or ^{deg}shACE2^{clv}) at 2-fold increasing concentrations from 12.5 to 50 nM.

The effect of RBD deglycosylation on binding with serum antibodies was assessed by SPR analysis as before (Rammauro et al., 2022), capturing RBD-ST and ^{deg}RBD-ST at final densities of 46 and 52 RUs in two parallel surfaces and injecting 1:50 dilutions of sera from individuals who received a three doses heterologous vaccination scheme (two doses of CoronaVac + booster with BNT162b).

The effect of RBD negative charges micro-heterogeneity on binding with shACE2-ST was evaluated by capturing ligand densities of 50 RUs and injecting RBD^{clv}-IEX fractions (b, c, d, and e/f) at concentrations of 5, 10, 25, and 50 nM. Control experiments with pre-IEX RBD^{clv} were done identically with additional 100 and 200 nM injections.

4.6.6 | Cell-surface binding assay

Assays were done as previously described (Pallesen et al., 2017) with adaptations. Briefly, 1×10^5 HEK293T and HEK293T-hACE2 (NR-52511, BEI Resources, NIAID, NIH) cells were incubated on ice for 1 h with different amounts of RBD-ST (0.15–100 ng) and subsequently stained with 1:400 Strep-Tactin-Dye 649 (IBA). Cells were immediately acquired using an Accuri C6 (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc.). Unstained cells were used as a control of the fluorescence background.

4.6.7 | ELISA

ELISA was done as previously described (Rammauro et al., 2022) using plates coated with 200 ng of RBD^{clv} or RBD^{clv}-IEX fractions and incubated with 1:100 dilutions of negative (pre-pandemic), positive (SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR), or vaccinated (two doses of CoronaVac + booster with BNT162b) human sera. Competition ELISA was done with plates coated with variable amounts of RBD^{clv} (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 micrograms per well) and incubated for 1 h at RT with a pre-mix of variable concentrations of shACE2-ST (0, 6, 12, and 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and human sera diluted 1:20 in PBS. After washing with PBS + 0.2% Tween 20, plates were incubated with Strep-Tactin-HRP (IBA) diluted 1:1.000 and developed with TMB liquid substrate (Sigma).

This study was approved by the ethical institutional review board (MSP_956220-CEI_001-2021). Informed consent was obtained from all participants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work. The following reagents were obtained through BEI Resources, NIAID, and NIH: Human Embryonic Kidney Cells (HEK-293T) Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2, HEK-293 T-hACE2 Cell Line, NR-52511.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM, grant number COF03/11) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, grant number FMV_3_2022_1_172395).

ORCID

Federico Carrión  <https://orcid.org/0000-0003-4092-2168>

REFERENCES

- Amanat F, Stadlbauer D, Strohmaier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*. 2020;26:1033–6.
- Bagdonaite I, Thompson AJ, Wang X, Søgaard M, Fougereux C, Frank M, et al. Site-specific O-glycosylation analysis of SARS-CoV-2 spike protein produced in insect and human cells. *Viruses*. 2021;13:551.
- Callaway E. New omicron-specific vaccines offer similar protection to existing boosters. *Nature*. 2022;609:232–3.
- Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, Hjorth CK, Dommer AC, Harbison AM, et al. Beyond shielding: the roles of Glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Cent Sci*. 2020;6:1722–34.
- Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, Walsh SR, Essink B, Brosz A, et al. A bivalent omicron-containing booster vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2022;387:1279–91. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2208343>
- Creutzmacher R, Maass T, Veselkova B, Ssebyatika G, Krey T, Empting M, et al. NMR experiments provide insights into ligand-binding to the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain. *J Am Chem Soc*. 2022;144:13060–5. Available from: <http://n2t.net/addgene:154754>
- Eldrid CFS, Allen JD, Newby ML, Crispin M. Suppression of O-linked glycosylation of the SARS-CoV-2 spike by quaternary structural restraints. *Anal Chem*. 2021;93:14392–400.
- Glasgow A, Glasgow J, Limonta D, Solomon P, Lui I, Zhang Y, et al. Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:28046–55.
- Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev*. 2022;310:6–26.
- Grishin AM, Dolgova NV, Landreth S, Fiset O, Pickering II, George GN, et al. Disulfide bonds play a critical role in the structure and function of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike antigen. *J Mol Biol*. 2022;434:167357.
- Gstöttner C, Zhang T, Resemann A, Ruben S, Pengel S, Suckau D, et al. Structural and functional characterization of SARS-CoV-2 RBD domains produced in mammalian cells. *Anal Chem*. 2021;93:6839–47.
- Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "Mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*. 2006;68:159–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706680056>
- Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell*. 2022;185:447–456.e11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421014951>
- Kabadi PG, Sankaran K, Palanivelu DV, Adhikary L, Khedkar A, Chatterjee a mass spectrometry based mechanistic insights into formation of Tris conjugates: implications on protein biopharmaceutics. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016;27:1677–85.
- Korn J, Schäckermann D, Kirmann T, Bertoglio F, Steinke S, Heisig J, et al. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep*. 2020;10:21393.
- Kozlik P, Goldman R, Sanda M. Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis*. 2017;38:2193–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elps.201600547>
- Krey T, D'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000762 Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000762>
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581:215–20.
- Li L, Honda-Okubo Y, Baldwin J, Bowen R, Bielefeldt-Ohmann H, Petrovsky N. Covax-19/Spikogen[®] vaccine based on recombinant spike protein extracellular domain with Advax-CpG55.2 adjuvant provides single dose protection against SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Vaccine*. 2022;40:3182–92.
- Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9:2076–90.
- Lima A, Durán R, Schujman GE, Marchissio MJ, Portela MM, Obal G, et al. Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J Proteomics*. 2011;74:1720–34.
- Liu H, Zhang Q, Wei P, Chen Z, Aviszus K, Yang J, et al. The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Res*. 2021;31:720–2.
- Lorenzo R, Defelipe LA, Aliperti L, Niebling S, Custódio TP, Löw C, et al. Deamidation drives molecular aging of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding motif. *J Biol Chem*. 2021;279:101175 Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925821009777/fulltext>
- Maffei M, Montemiglio LC, Vitagliano G, Fedele L, Sellathurai S, Bucci F, et al. The nuts and bolts of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain heterologous expression. *Biomolecules*. 2021;11:1812.
- Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M, Hasell J, Appel C, et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat Hum*

- Behav. 2021;5:947–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41562-021-01122-8>
- Medeiros A, Benítez D, Korn RS, Ferreira VC, Barrera E, Carrión F, et al. Mechanistic and biological characterisation of novel N 5-substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in *Leishmania*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35:1345–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ienz20>
- Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. *Front Immunol*. 2022;12:1–21. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.809244/full>
- Olivero-Deibe N, Tomé-Poderti L, Carrión F, Bianchi S, Fló M, Prieto D, et al. Expression, purification, and characterization of bovine leukemia virus-like particles produced in *Drosophila* S2 cells. *Frontiers in Virology*. 2021;1:756559.
- Pallesen J, Wang N, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfer RN, Turner HL, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E7348–57. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1707304114>
- Pascuale CA, Varese A, Ojeda DS, Pasinovich ME, Lopez L, Rossi AH, et al. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous immunization against SARS CoV-2 using sputnik V, ChAdOx1-S, BBIBP-CorV, Ad5-nCoV, and mRNA-1273. *Cell Rep Med*. 2022;3:100706 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666379122002488>
- Planas D, Saunders N, Maes P, Guivel-Benhassine F, Planchais C, Buchrieser J, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 omicron to antibody neutralization. *Nature*. 2022;602:671–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04389-z>
- Prévost J, Richard J, Gasser R, Ding S, Fage C, Anand SP, et al. Impact of temperature on the affinity of SARS-CoV-2 spike glycoprotein for host ACE2. *J Biol Chem*. 2021;297:101151 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925821009522>
- Rammauro F, Carrión F, Olivero-Deibe N, Fló M, Ferreira A, Pritsch O, et al. Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2. *Vaccine*. 2022;40:5189–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X22009112>
- Rivera B, Leyva A, Portela MM, Moratorio G, Moreno P, Durán R, et al. Quantitative proteomic dataset from oro- and nasopharyngeal swabs used for COVID-19 diagnosis: detection of viral proteins and host's biological processes altered by the infection. *Data Brief*. 2020;32:106121.
- Rossello J, Lima A, Gil M, Duarte JR, Correa A, Carvalho PC, et al. The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Sci Rep*. 2017;7:1–4.
- Sanda M, Morrison L, Goldman R. N- and O-glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein. *Anal Chem*. 2021;93:2003–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c03173>
- Santos MDM, Lima DB, Fischer JSG, Clasen MA, Kurt LU, Camillo-Andrade AC, et al. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nature Protocols*. 2022;17:1553–78. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-022-00690-x>
- Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020;30:981–8.
- Shi Y, Zeida A, Edwards CE, Mallory ML, Sastre S, Machado MR, et al. Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein. *Proc Natl AcadSci U S A*. 2022;119:e2120419119 Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2120419119>
- Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci*. 2022;31:e4300.
- Sullivan E, Sung PY, Wu W, Berry N, Kempster S, Ferguson D, et al. SARS-CoV-2 virus-like particles produced by a single recombinant Baculovirus generate anti-S antibody and protect against variant challenge. *Viruses*. 2022;14:914.
- Sun Z, Ren K, Zhang X, Chen J, Jiang Z, Jiang J, et al. Mass spectrometry analysis of newly emerging coronavirus HCoV-19 spike protein and human ACE2 reveals camouflaging Glycans and unique post-translational modifications. *Engineering*. 2020;7:1441–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32904601/>
- Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI-C, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol*. 2020;38:1073–8.
- Tripathi NK, Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:420.
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369:330–3.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265–9.
- Zhao P, Praissman JL, Grant OC, Cai Y, Xiao T, Rosenbalm KE, et al. Virus-receptor interactions of glycosylated SARS-CoV-2 spike and human ACE2 receptor. *Cell Host Microbe*. 2020;28:586–601.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312820304571>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Carrión F, Rammauro F, Olivero-Deibe N, Fló M, Portela MM, Lima A, et al. Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface. *Protein Science*. 2023;32(8):e4721. <https://doi.org/10.1002/pro.4721>

8.3 Publicación 7



OPEN ACCESS

EDITED BY
Masoud Sadeghi,
Islamic Azad University, Iran

REVIEWED BY
Miha Arnot,
University Medical Center Ljubljana,
Slovenia
Daniele Focosi,
Pisana University Hospital, Italy

*CORRESPONDENCE
Gonzalo Moratorio
✉ moratorio@pasteur.edu.uy
Pilar Moreno
✉ pmoreno@fcien.edu.uy

[†]These authors have contributed equally to this work

RECEIVED 27 December 2022
ACCEPTED 05 June 2023
PUBLISHED 23 June 2023

CITATION
Aldunate F, Fajardo A, Ibañez N, Rammauro F, Daghero H, Arce R, Ferla D, Pereira-Gomez M, Salazar C, Iraola G, Pritsch O, Hurtado J, Tenzi J, Bollati-Fogolin M, Bianchi S, Nin N, Moratorio G and Moreno P (2023) What have we learned from a case of convalescent plasma treatment in a two-time kidney transplant recipient COVID-19 patient? A case report from the perspective of viral load evolution and immune response. *Front. Nephrol.* 3:1132763. doi: 10.3389/fneph.2023.1132763

COPYRIGHT
© 2023 Aldunate, Fajardo, Ibañez, Rammauro, Daghero, Arce, Ferla, Pereira-Gomez, Salazar, Iraola, Pritsch, Hurtado, Tenzi, Bollati-Fogolin, Bianchi, Nin, Moratorio and Moreno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

What have we learned from a case of convalescent plasma treatment in a two-time kidney transplant recipient COVID-19 patient? A case report from the perspective of viral load evolution and immune response

Fabian Aldunate^{1,2†}, Alvaro Fajardo^{1,2†}, Natalia Ibañez³, Florencia Rammauro^{3,4}, Hellen Daghero⁵, Rodrigo Arce^{1,2}, Diego Ferla^{1,2}, Marianoel Pereira-Gomez^{1,2}, Cecilia Salazar⁶, Gregorio Iraola^{6,7}, Otto Pritsch^{3,4}, Javier Hurtado⁸, Jordan Tenzi⁸, Mariela Bollati-Fogolin⁵, Sergio Bianchi^{9,10}, Nicolas Nin⁸, Gonzalo Moratorio^{1,2*} and Pilar Moreno^{1,2*}

¹Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay, ³Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁵Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁶Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁷Host-Microbiota Interactions Laboratory, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, United Kingdom, ⁸Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Español “Juan José Crotoggini”, Administración de Servicios de Salud del Estado, Montevideo, Uruguay, ⁹Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ¹⁰Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus, can have a wide range of clinical manifestations, ranging from asymptomatic disease to potentially life-threatening complications. Convalescent plasma therapy has been proposed as an effective alternative for the treatment of severe cases. The aim of this study was to follow a two-time renal transplant patient with severe COVID-19 treated with convalescent plasma over time from an immunologic and virologic perspective. A 42-year-old female patient, who was a two-time kidney transplant recipient, was hospitalized with COVID-19. Due to worsening respiratory symptoms, she was admitted to the intensive care unit, where she received two doses of convalescent plasma. We analyzed the dynamics of viral load in nasopharyngeal swab, saliva, and tracheal aspirate samples, before and after convalescent plasma transfusion. The levels of pro-inflammatory cytokines and antibody titers were also measured in serum samples. A significant decrease in viral load was observed after treatment in

the saliva and nasopharyngeal swab samples, and a slight decrease was observed in tracheal aspirate samples. In addition, we found evidence of an increase in antibody titers after transfusion, accompanied by a decrease in the levels of several cytokines responsible for cytokine storm.

KEYWORDS

COVID-19, kidney transplant, convalescent plasma therapy, SARS-CoV-2, molecular diagnosis

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), has become a major global health concern. To date, this virus has infected more than 500 million people worldwide, resulting in more than 6.3 million reported deaths (1).

Clinical manifestations of COVID-19 vary widely among patients, ranging from mild disease to severe respiratory failure that can lead to death. COVID-19 induces an exaggerated and misdirected activation of the immune system leading to inflammation characterized mainly by high levels of pro-inflammatory cytokines, known as a cytokine storm (CS) (2). Convalescent plasma (CP) is a passive immunization strategy used in the treatment of various infectious diseases. CP transfusion provides neutralizing antibodies and other immune components with the goal of reducing the risk of disease and attenuating severe inflammatory responses. It has been reported that early administration of high-titer CP against SARS-CoV-2 to mildly ill infected older adults reduces the progression of COVID-19 (3). However, little is known about the clinical course and molecular response in immunosuppressed patients, such as solid organ transplant (SOT) recipients, infected with SARS-CoV-2, or about the optimal management of such patients.

In this article, we report a complete case of COVID-19 infection in a two-time kidney transplant recipient (KTR) treated with CP, with complete information on the clinical course, viral load dynamics, and immune response evolution. The aim of this report is to better characterize, from a virological and immunological perspective, the response of a two-time kidney transplant patient treated with CP.

Case description

A 42-year-old woman with end-stage kidney disease due to reflux nephropathy received her second deceased-donor kidney transplant in 2018. At that time, the patient exhibited a negative complement-dependent cytotoxicity crossmatch reaction, but human leukocyte antigen (HLA) antibody testing revealed the presence of donor-specific antibodies of HLA classes I and II. Therefore, she underwent desensitization procedures, including plasmapheresis, post-transplant rituximab and immunoglobulin, and anti-thymocyte globulin induction. Her post-transplant

course was uncomplicated, without kidney allograft rejection or infectious disease, and she had a baseline serum creatinine level of 0.9 mg/dL. She continued with maintenance immunosuppression therapy with tacrolimus (2.5 mg/12 h), mycophenolate sodium (360 mg/12 h), and oral corticosteroids (prednisone 5 mg/day).

On 15 October 2020 (day 1 since onset of symptoms), the patient presented with cough, expectoration, dysgeusia, and anosmia. Oxygen saturation and chest radiography were performed, prior to prescribing azithromycin, with normal results. Azithromycin treatment was started empirically (500 mg/day), and the patient was sent home with isolation instructions. The patient was not vaccinated against SARS-CoV-2 because the vaccines were not available at that time.

On 23 October, the patient tested positive for SARS-CoV-2 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of a nasopharyngeal swab (NS) sample collected on 21 October. On that day, the patient was admitted to the hospital for close monitoring and further testing given the appearance of dyspnea on minimal exertion, fever, and her previous medical history. Physical examination on the day of admission revealed a body temperature of 39.0°C, blood pressure of 140/80 mmHg, heart rate of 90 bpm, blood oxygen saturation of 98% on room air without immunosuppression stigmas, and breath sounds on chest auscultation. High-resolution chest computed tomography and chest radiography were performed. The results of these tests showed multiple patchy ground-glass opacities in bilateral subpleural areas. Bibasilar atelectasis was also observed. At that time, C-reactive protein (CRP) (2.7 mg/dL) and D-dimer (0.43 ng/mL) levels were within normal limits. Blood counts were also normal: white blood cell count was 4,500/mm³, hemoglobin level was 13.1 g/dL, and platelet count was 176,000/mm³. The function of the allograft was also stable, with a creatinine level of 0.9 mg/dL. Oral administration of tacrolimus and mycophenolate mofetil was discontinued, and oral corticosteroids were replaced with 8 mg/day of dexamethasone. Empirical antibiotics were started with piperacillin/tazobactam.

On 28 October, 13 days after the onset of symptoms, the patient presented with worsening respiratory symptoms and was admitted to the intensive care unit (ICU). She was found to be severely hypoxic, with a respiratory rate of 25 breaths per minute and a pulse oximeter reading of 90% on room air. She was treated with a high-flow nasal cannula without improvement in gas exchange. Arterial blood gas confirmed acute hypoxic respiratory failure and she was orotracheally intubated with ventilatory support. At this critical point, the patient received two doses of CP 24 h apart (30 and 31 October), as shown in

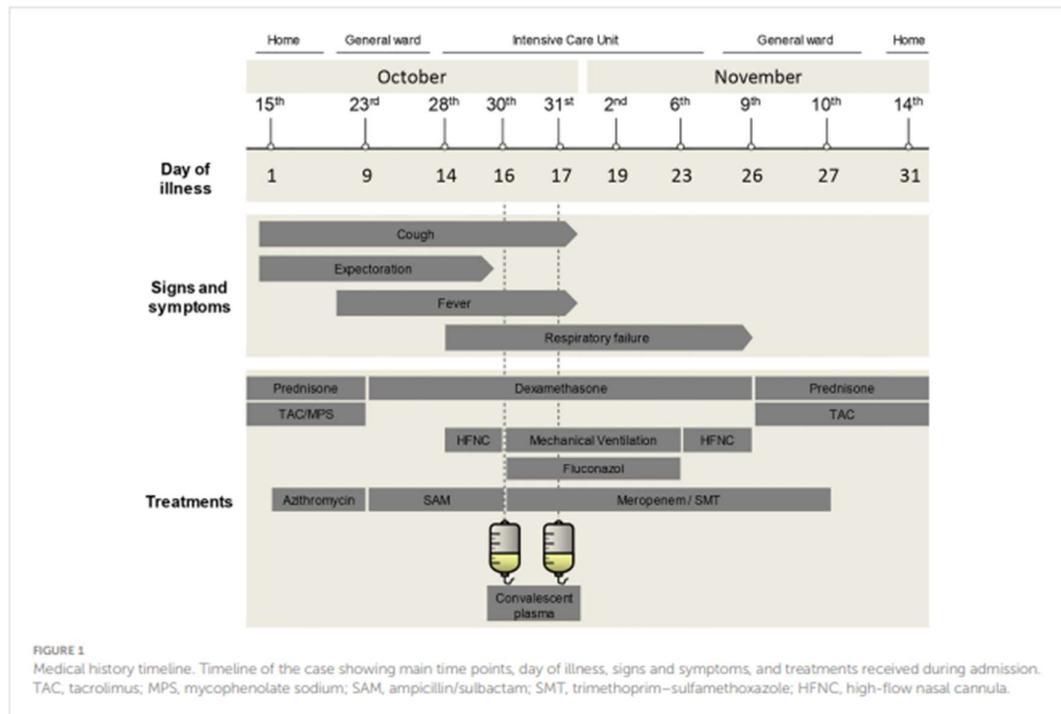


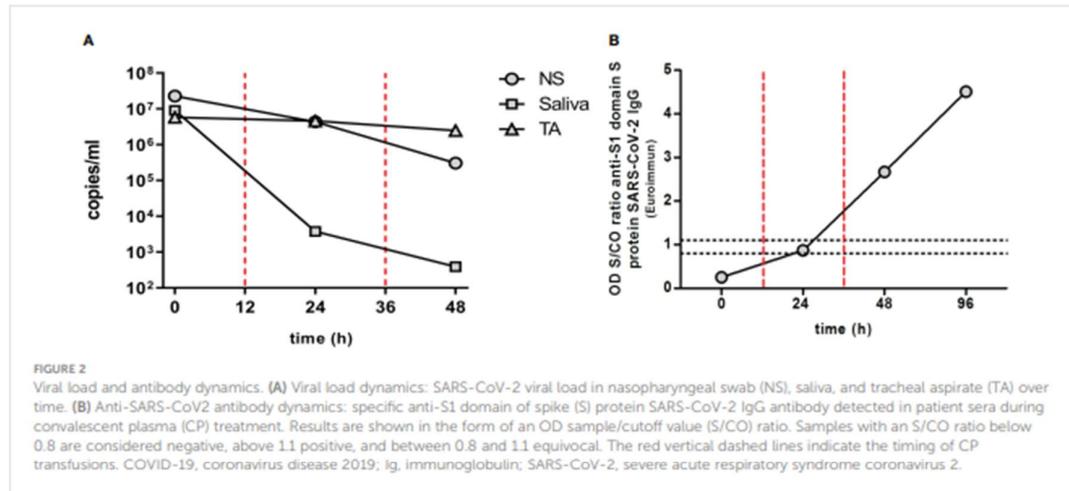
Figure 1. The infused CP had a median titer of 1:3,200 of total SARS-CoV-2 antibodies (interquartile range 1:800 to 1:3,200). In addition, antibiotic treatment was empirically changed to meropenem (1 g/8 h), trimethoprim-sulfamethoxazole (1 amp/12 h), and fluconazole (200 mg/12 h), but all cultures were negative. Blood, urine, and tracheal aspirate cultures yielded no microbial growth. In addition, a serum galactomannan antigen test was negative; cytomegalovirus viral load was found to be undetectable; immunofluorescence testing for *Pneumocystis jirovecii* was negative; and a GeneXpert® Bacilo Koch test was negative, as well as tests for influenza and atypical viruses. The patient also underwent bronchoalveolar lavage, which was negative for bacterial cultures, and tested positive for *Candida albicans*.

After CP transfusion, the clinical evolution of the patient's condition was favorable. On 6 November (day 23 since the onset of symptoms) the patient's clinical respiratory status and oxygen saturation improved. She was extubated without any complications and treatment with fluconazole was suspended. Three days later, her general clinical condition improved and tacrolimus was restarted (1 mg/12 h). The patient was able to breathe unassisted with oxygen saturation above 97%. She was discharged on 14 November (31 days after the onset of symptoms). Currently, the patient is asymptomatic with no sequelae of long COVID and has completed the vaccination schedule, which for this type of immunocompromised patient is five doses of the mRNA vaccine. Supplementary Table 1 shows paraclinical values before, during, and after the CP transfusion.

SARS-CoV-2 viral load, specific antibody levels, and cytokine dynamics after convalescent plasma treatment

Nasopharyngeal swab (NS), saliva, and tracheal aspirate (TA) samples were collected from the patient before, during, and after treatment with CP. Serum samples were also collected at the same time points. Viral RNA was extracted using a QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol. Detection of SARS-CoV-2 was performed with the national “COVID-19 RT-PCR Real TM Fast-HEX/Cy5 Kit” in accordance with the manufacturer's protocol (ATGen, Institut Pasteur de Montevideo, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay).

A decrease in viral load was observed in the NS, saliva, and TA samples after CP transfusion (Figure 2A). This decrease was most pronounced in the case of the saliva samples, followed by NS samples. TA samples also showed a decrease in viral load after treatment, but to a lesser extent. The complete SARS-CoV-2 sequence was obtained from all samples collected (NS, saliva, and TA) using the MinION™ platform (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). It was assigned to the B.1.1.33 SARS-CoV-2 lineage (see Supplementary Figure 1).



Saliva and NS samples were negative at 72 h; TA sampling was not performed at this time point due to the clinical improvements in the patient's condition.

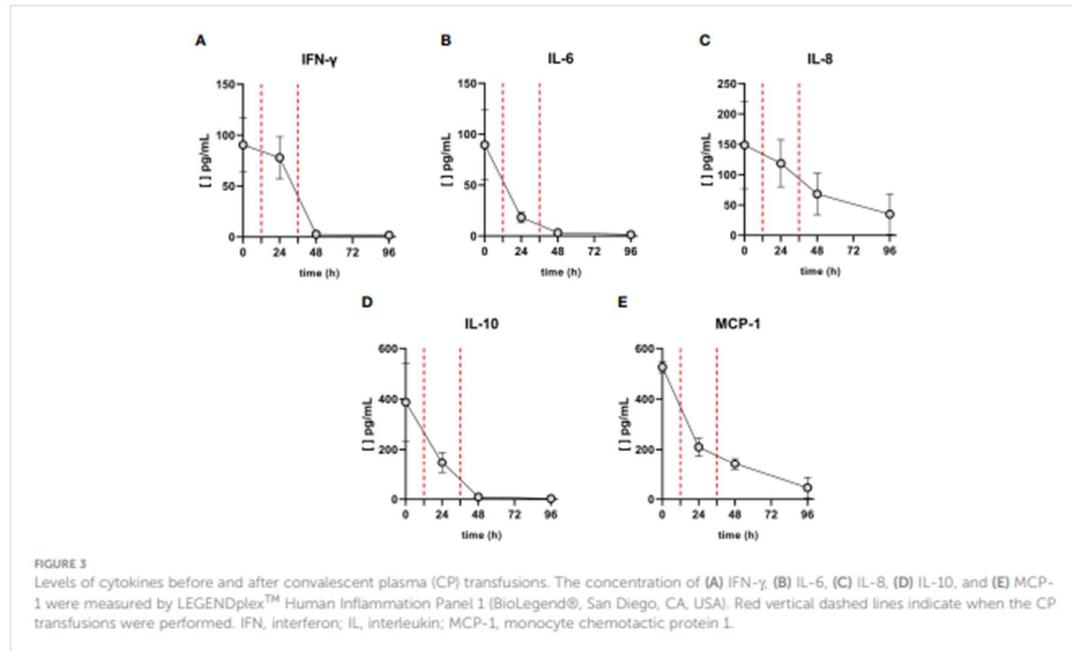
Anti-RBD (Wuhan variant) IgG serum levels were quantified using the COVID-19 IgG ELISA kit (developed by the Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo, and ATGen SRL) in accordance with the manufacturer's instructions. An increase in specific antibodies was observed after CP treatment, which correlated with the decrease in viral load (Figure 2B). Prior to treatment, no anti-SARS-CoV-2 antibodies were detected in the patient's serum (measurements below the detection limit). However, 12 h after the second CP administration, specific antibodies were detected, with up to a threefold change in the sample/cutoff (S/CO) ratio being measured. This increase in circulating anti-SARS-CoV-2 antibodies was further demonstrated at 84 h after the first dose (60 h after the second CP administration), reaching a 4.5-fold change in ratio. In addition, a decrease in informative pro-inflammatory cytokines involved in the CS was measured in the patient after CP treatment (Figure 3). Decreases in the levels of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 8 (IL-8), interleukin 10 (IL-10), and chemoattractant protein-1 (MCP-1) were observed 12 h after the first CP transfusion (30 October), with a sharp decrease in interleukin 6 (IL-6). At 12 h after the second CP transfusion, IFN- γ , IL-6, and IL-10 became undetectable.

Discussion and conclusions

An exaggerated immune response is a main cause of severe COVID-19 cases. CS is characterized by the overproduction of a number of pro-inflammatory cytokines and is strongly associated with poor prognosis (4). During the current COVID-19 pandemic, before vaccines and antiviral drugs were available, CP was widely used at various stages of the disease. The evidence for the use of CP in patients with severe COVID-19 infection is inconclusive, and some reports have questioned its efficacy due to the small sample sizes and

lack of control groups in some studies (5, 6). A randomized trial showed no significant differences in clinical status or overall mortality between patients treated with CP and those who received placebo (7). However, it is important to highlight that these reports do not focus on immunocompromised patients, such as solid organ transplant recipients. On the other hand, there is increasing evidence that CP administration is safe and may lead to more favorable clinical outcomes and reduced mortality when used as early as possible in the early stages of the disease. However, large high-quality studies are needed to establish robust evidence for CP therapy (3, 8–11). It is also important to mention that CP treatment may cause potential adverse events in some patients, such as worsening hypoxemia and respiratory failure; transfusion-related complications have also been reported (12).

Solid organ transplant recipients and patients with underlying kidney disease represent a vulnerable population at high risk for adverse outcomes from COVID-19. These populations may have deficiencies in clearing the SARS-CoV-2 virus and develop more aggressive disease, yet they have been excluded or underrepresented in many clinical trials. There are randomized clinical trials suggesting that the administration of CP may be useful in patients with some types of immunodeficiency (13). This could be explained by the fact that immunocompromised patients may not have developed endogenous antibody responses. There is also evidence that kidney transplant recipients exhibit a poor serologic response to mRNA vaccination, especially those on triple immunosuppression (14). There are several reported cases of transplant recipients with COVID-19 who received CP transfusions and subsequently made a good recovery without adverse reactions (15). The goal of these therapies is to reduce the exaggerated inflammatory response observed in this type of patient. Most of these transplanted patients have had successful outcomes without disease progression (16–19). A cohort study showed no difference in the outcomes of kidney transplant recipients with mild and severe COVID-19 treated with CP compared with a control group. However, the study used a small sample size and a low proportion of high-titer CP, and included a very small proportion of patients who had received two kidney transplants (20).



The efficacy of CP therapy in the treatment of COVID-19 depends on several factors, including the level of neutralizing antibodies in the donor plasma (which can vary between individuals and with the timing of plasma collection), the timing of treatment, and the severity of the disease. The emergence of SARS-CoV-2 genomic variants may also affect the efficacy of CP treatment. Although it is not yet clear how effective CP therapy will be against newer variants, some studies suggest that CP therapy with plasma from individuals who have recovered from the original strain may be less effective against some of the new variants, such as the beta and gamma variants (21).

Several therapeutics for COVID-19 have been developed since the onset of the pandemic in early 2020. The development of monoclonal antibodies as a treatment and prophylaxis strategy for COVID-19 has provided an alternative to CP therapy, as these antibodies are effective against a range of SARS-CoV-2 variants. However, some, but not all, of the antibodies in clinical use may lose efficacy to some omicron sublineages (22).

Other drugs, including direct antivirals, immunomodulatory and anti-inflammatory agents, anticoagulants, and antiplatelet agents, are being evaluated. However, although some of these have been shown to be effective in treating COVID-19 and reducing mortality, the possibility cannot be excluded at this time that SARS-CoV-2 variants may evade some of these currently effective pharmacological therapies. Their high cost and uneven distribution around the world also make them an unattainable therapeutic option in most low-income countries (23–25).

Here, we have described an exceptional case in which a two-time renal transplant patient with a severe form of COVID-19 was treated with CP. This patient had no additional risk factors beyond her immunocompromised state. First, we monitored the viral load in

different biological samples during the CP treatment. In addition, we sequenced the complete genome of the virus, which was assigned to the B.1.1.33 SARS-CoV-2 lineage (Supplementary Figure 1). This variant has a higher prevalence in South America, especially Brazil, Argentina, and Uruguay, but is scattered throughout the world (26, 27). The ability to sequence the viral genome in an immunosuppressed patient allows for active monitoring for possible reinfections. It is worth noting that the rate of recurrence of infection in these patients might be higher than in non-immunocompromised patients (28). After CP treatment, we observed a rapid decrease in salivary SARS-CoV-2 viral load, suggesting that the treatment has an effect on viral transmissibility. A decrease was observed in the NS sample, with a smaller downward trend. Both samples were negative at 72 h. On the other hand, the viral load in the TA remained stable. This observation is consistent with previous reports showing greater persistence of the SARS-CoV-2 viral load in lower respiratory tract samples than in upper respiratory tract samples (29, 30). It is important to note that some immunocompromised patients may test negative for SARS-CoV-2 in NS samples, even though a latent viral source may persist for long periods of time. In fact, general persistence of SARS-CoV-2 has been reported in immunocompromised patients (16). The decrease in viral load in this case was consistent with the increase in antibody levels after administration of the CP transfusion doses (Figure 2A). The absence of antibodies before CP administration supports the idea that the rapid recovery of the patient was due to the treatment received (Figure 2B). We also observed a rapid decrease in some of the pro-inflammatory cytokines involved in the cytokine storm after CP transfusion, namely, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, and MCP-1 (Figure 3).

In summary, the patient's prognosis improved significantly after CP treatment, based on her clinical condition, oxygen

saturation, SARS-CoV-2 viral load, cytokine profile, and plasma anti-viral antibody levels (Supplementary Material).

The use of CP may be associated with viral clearance, particularly in patients who have not initiated an endogenous immune response (i.e., serum antibody negative) and have a high viral load at baseline. In this case, the plasma infusion may have triggered the increase in neutralizing antibodies, but may also be responsible for the significant decrease in the levels of several cytokines that control and reduce CS. These findings are of particular importance for developing countries where access to antiviral drugs, monoclonal antibody therapy, or other treatment options is limited, even more so in the context of a pandemic. These therapies represent a simple and affordable option for COVID-19 and other future emerging infectious viral diseases.

Data availability statement

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. All genomes obtained in this study were uploaded to the EpiCoV database in the GISAID initiative under the accession numbers: EPI_ISL_7,457,652, EPI_ISL_7,457,653, and EPI_ISL_7,457,651.

Ethics statement

Written informed consent was obtained from the individual for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

GM and PM conceived the study and designed the analysis. NI, NN, JT, JH, and DF contributed to patient data collection. AF, CS, GI, and MP-G analyzed next-generation sequencing (NGS) data. NN and JT conceived the medical treatment. FA, AF, RA, and DF carried out the processing of samples. FR, HD, OP, MB, and SB contributed to the immune response analysis. FA, AF, NI, RA, NI, DF, GM, and PM contributed to the discussion of all results obtained in this work. FA, AF, NI, GM, and PM wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was supported by FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11; Fondo de Solidaridad para Proyectos Innovadores, Sociedad Civil, Francofonía y Desarrollo

Humano (FSPI), Ambassade de France; Fondo Clemente Estable (156157, 155930), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII); Centro Latinoamericano de Biotecnología (CABBIO); and the G4 program at the Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

Acknowledgments

We would like to thank MDs Mariana Seija and Sebastian Marton for their help in collecting clinical data and Sebastian Marton additionally for helpful discussion of the clinical case. We also thank Alicia Costabile, PhD, for assistance with bioinformatics.

Conflict of interest

The author GM declared that he was an editorial board member of Frontiers at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneph.2023.1132763/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Phylogenetic tree showing reference strains of different Nextstrain clades, automatically obtained using Nextclade v.1.6.0. The sequences obtained in this study, corresponding to B.1.1.33 lineage, are depicted by a lilac star clustered within the 20B clade.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Laboratory parameters. Clinical indexes and laboratory results before and after convalescent plasma transfusion. MCV, mean corpuscular volume of red blood cells; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red blood cell distribution width. The underlined date indicates when the convalescent plasma was transfused.

References

1. WHO. *Coronavirus (COVID-19) dashboard | WHO coronavirus (COVID-19) dashboard with vaccination data* (2022). Available at: <https://covid19.who.int/>.
2. Alcock J, Masters A. Cytokine storms, evolution and COVID-19. *Evol Med Public Health* (2021) 9(1):83–92. doi: 10.1093/emph/eaab005
3. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, Coviello S, Bianchi A, Braem V, et al. Early high-titer plasma therapy to prevent severe covid-19 in older adults. *N Engl J Med* (2021) 384(7):610–8. doi: 10.1056/NEJMoa2033700
4. Clerici M, Velu V, Rowland-Jones S, Ji J, Tang Y, Liu J, et al. Article 1708 (2020) cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol* (2019) 11:1708. doi: 10.3389/fimmu.2020.01708
5. AlQahtani M, Abdulrahman A, Almadani A, Alali SY, Al Zamrooni AM, Hejab AH, et al. Randomized controlled trial of convalescent plasma therapy against standard therapy in patients with severe COVID-19 disease. *Sci Rep* (2021) 11(1):9927. doi: 10.1038/s41598-021-89444-5
6. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J, et al. Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and life-threatening COVID-19. *JAMA* (2020) 324(5):460. doi: 10.1001/jama.2020.10044
7. Simonovich VA, Burgos Pratz LD, Scibona P, Beruto MV, Vallone MG, Vázquez C, et al. A randomized trial of convalescent plasma in covid-19 severe pneumonia. *N Engl J Med* (2021) 384(7):619–29. doi: 10.1056/NEJMoa2031304
8. Bakhtawar N, Usman M, Khan MMU. Convalescent plasma therapy and its effects on COVID-19 patient outcomes: a systematic review of current literature. *Cureus* (2020) 12(8):e9535. doi: 10.7759/cureus.9535
9. Cheng Y, Wong R, Soo YOY, Wong WS, Lee CK, Ng MHL, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24:44–6. doi: 10.1007/s10096-004-1271-9
10. Fodor E, Müller V, Iványi Z, Berki T, Kuten Pella O, Hornyák I, et al. Early transfusion of convalescent plasma improves the clinical outcome in severe SARS-CoV2 infection. *Infect Dis Ther* (2022) 11(1):293–304. doi: 10.1007/s40121-021-00514-7
11. Klassen SA, Senefeld JW, Senese KA, Johnson PW, Wiggins CC, Baker SE, et al. Convalescent plasma therapy for COVID-19: a graphical mosaic of the worldwide evidence. *Front Med* (2021) 8:684151. doi: 10.3389/fmed.2021.684151
12. Bégin P, Callum J, Jamula E, Cook R, Heddle NM, Tinnmouth A, et al. Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: an open-label, randomized controlled trial. *Nat Med* (2021) 27(11):2012–24. doi: 10.1038/s41591-021-01488-2
13. Writing Committee for the REMAP-CAP Investigators, Abdelhady H, Abdelrazik M, Abdi Z, Abdo D, Abdulle A, et al. Effect of convalescent plasma on organ support-free days in critically ill patients with COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* (2021) 326(17):1690. doi: 10.1001/jama.2021.18178
14. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olagne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA* (2021) 326(11):1063. doi: 10.1001/jama.2021.12339
15. Focosi D, Franchini M. Potential use of convalescent plasma for SARS-CoV-2 prophylaxis and treatment in immunocompromised and vulnerable populations. *Expert Rev Vaccines* (2021), 21(7):877–884. doi: 10.1080/14760584.2021.1932475
16. Li J, Zhang L, Liu B, Song D. Case report: viral shedding for 60 days in a woman with COVID-19. *Am J Trop Med Hyg* (2020) 102(6):1210–3. doi: 10.4269/ajtmh.20-0275
17. Gandolfini I, Delsante M, Fiaccadori E, Zaza G, Manenti L, Degli Antoni A, et al. COVID-19 in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* (2020) 20(7):1941–3. doi: 10.1111/ajt.15891
18. Guillen E, Pineiro GJ, Revuelta I, Rodriguez D, Bodro M, Moreno A, et al. Case report of COVID-19 in a kidney transplant recipient: does immunosuppression alter the clinical presentation? *Am J Transplant* (2020) 20(7):1875–8. doi: 10.1111/ajt.15874
19. Arpali E, Akyollu B, Yelken B, Tekin S, Turkmen A, Kocak B. Case report: a kidney transplant patient with mild COVID-19. *Transpl Infect Dis* (2020) 22(4):e13296. doi: 10.1111/tid.13296
20. Cristelli MP, Langhi Junior DM, Viana LA, De Andrade LGM, Martins SBS, Dreige YC, et al. Efficacy of convalescent plasma to treat mild to moderate COVID-19 in kidney transplant patients: a propensity score matching analysis. *Transplantation* (2022) 106(1):E92–4. doi: 10.1097/TP.0000000000003962
21. Dhawan M, Priyanka, Parmar M, Angural S, Choudhary OP. Convalescent plasma therapy against the emerging SARS-CoV-2 variants: delineation of the potentialities and risks. *Int J Surg* (2022) 97:106204. doi: 10.1016/j.ijsu.2021.106204
22. VanBlargan LA, Errico JM, Halfmann PJ, Zost SJ, Crowe JE, Purcell LA, et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat Med* (2022) 28(3):490–5. doi: 10.1038/s41591-021-01678-y
23. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for oral treatment of covid-19 in nonhospitalized patients. *N Engl J Med* (2022) 386(6):509–20. doi: 10.1056/NEJMoa2116044
24. Murakami N, Hayden R, Hills T, Al-Sankari H, Casey J, Del Sorbo L, et al. Therapeutic advances in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* (2023) 19(1):38–52. doi: 10.1038/s41581-022-00642-4
25. Scavone C, Mascolo A, Rafaniello C, Sportiello L, Trama U, Zoccoli A, et al. Therapeutic strategies to fight COVID-19: which is the status artis? *Br J Pharmacol* (2022) 179(10):2128–48. doi: 10.1111/bph.15452
26. Gangavarapu K, Latif AA, Mullen JL, Alkuzweny M, Hufbauer E, Tsung G, et al. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Nature Methods*. (2023). doi: 10.1038/s41592-023-01769-3
27. Rego N, Costabile A, Paz M, Salazar C, Perbolianachis P, Spangenberg L, et al. Real-time genomic surveillance for SARS-CoV-2 variants of concern, Uruguay. *Emerg Infect Dis J* (2021) 27(11):2957–2960. doi: 10.3201/eid2711.211198
28. Slezak J, Bruxvoort K, Fischer H, Broder B, Ackerson B, Tartof S. Rate and severity of suspected SARS-Cov-2 reinfection in a cohort of PCR-positive COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect* (2021), 27(12):1860.e7–1860.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2021.07.030
29. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbes New Infect* (2020) 36:100713. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100713
30. Winichakoon P, Chaiwarith R, Liwsrisakun C, Salee P, Goonn A, Limsukon A, et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swabs do not rule out COVID-19. *J Clin Microbiol* (2020) 58(5):e00297–20. doi: 10.1128/JCM.00297-20

8.4 Publicación 8

 **frontiers** | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 24 October 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.1202630



OPEN ACCESS

EDITED BY
Xue-Zhong Yu,
Medical College of Wisconsin,
United States

REVIEWED BY
Javier Carbone,
Gregorio Marañón Hospital, Spain
Elisenda Alari-Pahissa,
Pompeu Fabra University, Spain
Marta Crespo,
IMIM Hospital del Mar, Spain, in
collaboration with reviewer EAP

*CORRESPONDENCE
Daniela Lens
✉ daniela.lens@gmail.com
Marcelo Nin
✉ mninvaez@gmail.com
Sergio Bianchi
✉ sbianchi@fmed.edu.uy

[†]These authors have contributed equally to
this work

RECEIVED 09 April 2023
ACCEPTED 09 October 2023
PUBLISHED 24 October 2023

CITATION
Seija M, García-Luna J, Rammauro F,
Brugnini A, Trías N, Astesiano R, Santiago J,
Orihuela N, Zulberti C, Machado D,
Recalde C, Yandián F, Guerisoli A, Noboa J,
Orihuela S, Curi L, Bugstaller E, Noboa O,
Nin M, Bianchi S, Tiscornia A and Lens D
(2023) Low switched memory B cells are
associated with no humoral response after
SARS-CoV-2 vaccine boosters in kidney
transplant recipients.
Front. Immunol. 14:1202630.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1202630

COPYRIGHT
© 2023 Seija, García-Luna, Rammauro,
Brugnini, Trías, Astesiano, Santiago,
Orihuela, Zulberti, Machado, Recalde, Yandián,
Guerisoli, Noboa, Orihuela, Curi, Bugstaller,
Noboa, Nin, Bianchi, Tiscornia and Lens. This
is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Low switched memory B cells are associated with no humoral response after SARS-CoV-2 vaccine boosters in kidney transplant recipients

Mariana Seija^{1,2†}, Joaquín García-Luna^{3†},
Florencia Rammauro^{4,5†}, Andreína Brugnini³, Natalia Trías³,
Rossana Astesiano¹, José Santiago¹, Natalia Orihuela⁶,
Catherine Zulberti⁶, Danilo Machado⁷, Cecilia Recalde⁷,
Federico Yandián¹, Ana Guerisoli¹, Javier Noboa^{1,4},
Sergio Orihuela⁶, Lilian Curi⁶, Emma Bugstaller⁷, Oscar Noboa¹,
Marcelo Nin^{1,6*}, Sergio Bianchi^{2,5*}, Adriana Tiscornia⁸
and Daniela Lens^{3*}

¹Centro de Nefrología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Laboratorio de Citometría de Flujo, Departamento Básico de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁵Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁶Centro de Trasplante INU, Hospital Italiano, Montevideo, Uruguay, ⁷Centro de Trasplante, Hospital Evangélico, Montevideo, Uruguay, ⁸Instituto Nacional de Donación y Trasplante, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República y Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay

Introduction: The humoral response after SARS-CoV-2 vaccination and boosters in kidney transplant recipients (KTRs) is heterogeneous and depends on immunosuppression status. There is no validated immune measurement associated with serological response in clinical practice. Multicolor flow cytometric immunophenotyping could be useful for measuring immune response. This study aimed to study B- and T-cell compartments through Standardized EuroFlow PID Orientation after SARS-CoV-2 vaccination and their association with IgG SARS-CoV-2 seropositivity status after two doses or boosters.

Methods: We conducted a multicenter prospective study to evaluate humoral response after SARS-CoV-2 vaccination in KTRs. *Heterologous regimen:* two doses of inactivated SARS-CoV-2 and two boosters of BNT162b2 mRNA (n=75). *Homologous vaccination:* two doses of BNT162b2 mRNA and one BNT162b2 mRNA booster (n=13). Booster doses were administered to KTRs without taking into account their IgG SARS-CoV-2 seropositivity status. Peripheral blood samples were collected 30 days after the second dose and after the last heterologous or homologous booster. A standardized EuroFlow PID Orientation Tube (PIDOT) and a supervised automated analysis were used for immune monitoring cellular subsets after boosters.

Results: A total of 88 KTRs were included and divided into three groups according to the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity: non-responders (NRs, n=23), booster responders (BRs, n=41), and two-dose responders (2DRs, n=24). The NR group was more frequent on mycophenolate than the responder groups (NRs, 96%; BRs, 80%; 2DRs, 42%; $p=0.000$). Switched memory B cells in the 2DR group were higher than those in the BR and NR groups (medians of 30, 17, and 10 cells/ul, respectively; $p=0.017$). Additionally, the absolute count of central memory/terminal memory CD8 T cells was higher in the 2DR group than in the BR and NR groups. (166, 98, and 93 cells/ul, respectively; $p=0.041$). The rest of the T-cell populations studied did not show a statistical difference.

Conclusion: switched memory B cells and memory CD8 T-cell populations in peripheral blood were associated with the magnitude of the humoral response after SARS-CoV-2 vaccination. Boosters increased IgG anti-SARS-CoV-2 levels, CM/TM CD8 T cells, and switched MBCs in patients with seropositivity after two doses. Interestingly, no seropositivity after boosters was associated with the use of mycophenolate and a lower number of switched MBCs and CM/TM CD8 T cells in peripheral blood.

KEYWORDS

SARS-CoV-2, vaccine, boosters, kidney transplant, memory B cell

Introduction

Several studies have reported that kidney transplant recipients (KTRs) show a decreased antigen-specific humoral immune response after two doses of SARS-CoV-2 vaccines compared with the healthy population (1–12). Therefore, extra boosters were recommended to achieve seroconversion and produce high titers of the IgG anti-receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 in KTRs (13–21).

We have previously demonstrated that a two-dose-two-booster-heterologous vaccination scheme combining inactivated virus vaccine (Sinovac®) and BNT162b2 mRNA (Pfizer/BioNTech) improved humoral response in KTRs. Additionally, we have demonstrated that the seroconversion achieved with this scheme was approximately 70%, similar to the response obtained with 2 doses-1-booster-homologous BNT162b2 mRNA vaccination (20, 21).

Several reports have shown that seroconversion depends on the immunosuppression treatment. KTRs who received mycophenolate were less likely to seroconvert, whereas KTRs on mTOR inhibitors such as everolimus had higher SARS-CoV-2 IgG levels (1–10, 20, 22). B cell-depleting therapy with rituximab (RTX) also reduced the humoral response (22–24). Other clinical features associated with diminished humoral response to vaccination were a recent kidney transplant, advanced age, and impaired kidney function (20–24).

Immunological response after SARS-CoV-2 vaccination is heterogeneous and there is no clinical tool to anticipate it in clinical practice. There is no specific post-transplant measure of immunosuppression burden. Clinicians rely on drug levels, viral

screening, and patients' features to predict the risk of rejection versus overimmunosuppression (25–27).

Multicolor flow cytometric (FC) immunophenotyping has become a key tool in the evaluation of immunological disorders and could be useful for measuring immune response in KTRs (28–30). We hypothesized that lymphocyte immune profiling could be associated with the humoral response after boosters.

B cell composition is altered after kidney transplantation and has been correlated with the SARS-CoV-2 vaccination response (26). Impaired B- and T-cell function in KTRs has been described with triple immunosuppression based on an antimetabolite (mycophenolate), a calcineurin inhibitor (cyclosporine or tacrolimus), and prednisone, and it is associated with the degree of immunosuppression (27).

Immunological memory in the humoral system is provided by memory B cells and bone marrow-resident long-lived plasma cells (PCs). Memory B cells (MBCs) play a critical role in antibody production. These cells are produced during the immune response by a germinal center (GC)-dependent or a GC-independent pathway. In the GC-independent pathway, naïve B cells become activated after encountering their antigen (e.g., vaccine) and undergo clonal expansion and affinity maturation to unswitched memory B cells and short-lived plasma cells (31, 32). Unswitched MBCs carry IgM and IgD isotypes on the surface. They migrate to GCs to undergo a class switch recombination to become switched MBCs or PCs (33). However, a small number of switched memory B cells can also be produced outside of germinal centers, in a GC-independent pathway (32, 33).

Vaccination also has the capacity to shape the memory CD8 T-cell pool (34). Memory CD8 T cells increase after vaccination and boosters and persist long-term (35). Memory T-cell repertoire can recirculate in tissues and potentially be more responsive after re-encountering the antigen (34). CD8+ T cells can continue to be protective when antibody titers decline (34). This study aimed to study B and T-cell compartments after SARS-CoV-2 vaccination and their association with the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity after two doses or boosters.

Materials and methods

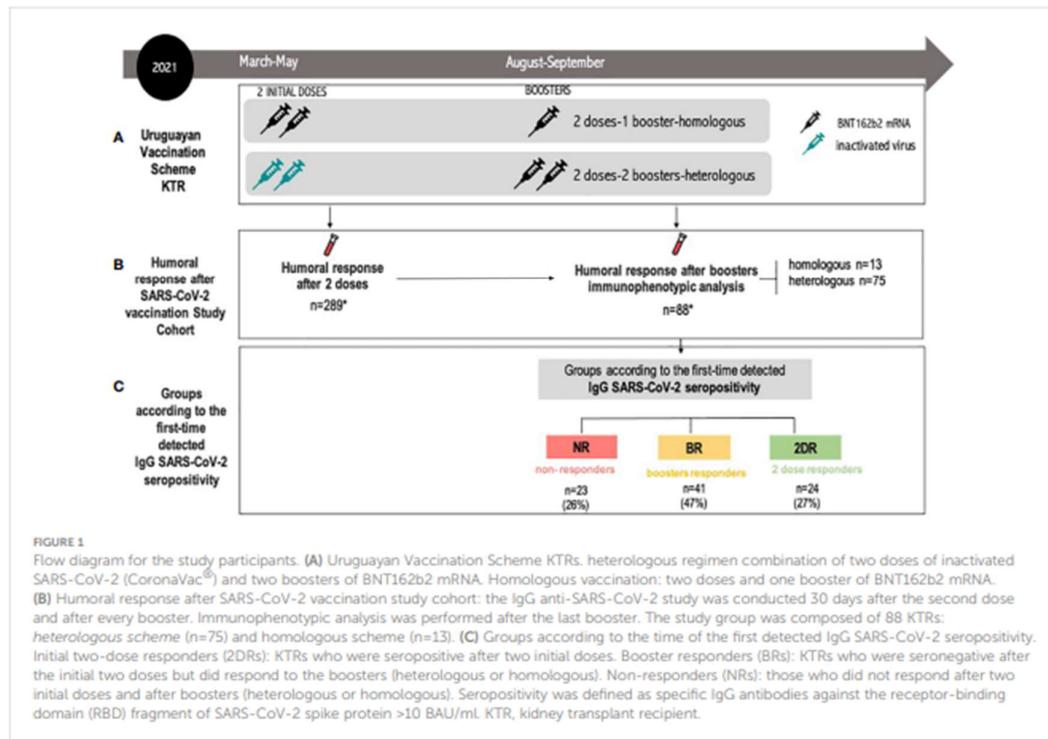
We conducted a multicenter prospective study to evaluate humoral immune response after SARS-CoV-2 vaccination in KTRs after homologous and heterologous vaccination. Details of the Uruguay Vaccination Campaign are in the **Supplementary Material** (Figure 1A; Supplementary Figure S1).

The study group was composed of KTRs from all kidney transplant centers in Uruguay (INU-Hospital Italiano, Hospital Evangélico, and Hospital de Clínicas). The inclusion criteria were age >18 years old, kidney or kidney-pancreas transplant, informed consent, no prior PCR-confirmed COVID-19 during the vaccination and study period, and received two prior doses of CoronaVac® or two doses of BNT162b2 as an initial vaccination and a subsequent homologous or heterologous booster according to

the recommendations of the Uruguayan National Health Authority (Figure 1A).

The Uruguayan National Health Authority recommended vaccination for KTR patients with two initial doses of CoronaVac® or two doses of BNT162b2 mRNA between March and June 2021. Later, in August 2021, booster doses with BNT162b2 mRNA were recommended for all solid organ transplant recipients without taking into account seroconversion status. As shown in Figure 1A, patients with two initial doses of BNT162b2 mRNA received one booster with the same vaccine (homologous vaccination) while patients receiving two doses of inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac®) received two boosters of BNT162b2 mRNA (heterologous vaccination). Therefore, all KTRs received either a homologous or heterologous scheme depending on the types of initial doses received (Figure 1A).

The humoral response was studied after the two initial doses and after every booster, as previously reported (20, 21) (Figure 1B). For the purpose of this study, we only included patients with available blood samples after two initial doses and after boosters with immunophenotypic analysis. Hence, the study group was composed of 88 KTRs who received either a heterologous scheme (n=75) or a homologous scheme (n=13). KTRs were divided into three groups according to the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity: non-responders (NR), booster responders (BR), and initial two-dose responders (2DR). Non-responders (NR) are those who did not respond after two initial doses and



after boosters (heterologous or homologous). Booster responders (BR) are those who did not respond to the initial two doses but did respond to the boosters (heterologous or homologous). Finally, the initial two-dose responders (2DR) are KTRs who were seropositive after two initial doses (Figure 1C). A detailed flow chart of the study population is featured in Figure 1.

Data collection and samples

Clinical data were recorded. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was estimated using the CKD-EPI formula.

Peripheral blood (PB) samples were collected 30–40 days after the last heterologous or homologous booster (Supplementary Figure S1). Freshly collected blood was centrifuged in the clot activator and gel tube (2,500 rpm, 15 min). Sera were separated and stored at -20°C until analysis. For immunophenotypic analysis, PB samples were collected in BD Vacutainer tubes containing K2EDTA (Becton/Dickinson, San Jose, CA) after the last heterologous or homologous booster. For each sample, a white blood cell (WBC) count was determined using a hematology analyzer (Unicel DxH 800 Beckman Coulter).

IgG antibodies against the Receptor-Binding Domain

The level of serum-specific IgG antibodies against the Receptor-Binding Domain (RBD) fragment of SARS-CoV-2 Spike protein was determined using a COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (developed by Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo, and ATGen) according to the manufacturer's instructions. The assay has a sensitivity of 97.7% and a specificity of 96.2%. Quantitative test results were expressed in binding antibody units (BAU)/ml referred to by the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code: 20/136) used for assay calibration (20, 21, 36). Seropositivity was defined as specific IgG antibodies against the RBD fragment of SARS-CoV-2 Spike protein >10 BAU/ml. The value of 10 BAU/ml was defined as the assay cutoff, according to the manufacturer's instructions. Samples above this value are considered positive (36).

The standardized Euroflow PID orientation tube and supervised automated analysis

For flow cytometric analysis of major circulating leukocytes, we used the 8-color/12-marker standardized EuroFlow primary immunodeficiencies (PID) Orientation Tube (PIDOT) and a supervised automated analysis (Infinicyt, Cytognos, SL) (28–30). Briefly, non-nucleated red cells were lysed prior to staining, following the EuroFlow bulk lyse SOP (available at euroflow.org/protocols). Then, surface staining was performed with a reconstituted PIDOT lyophilized antibody cocktail (Cytognos) plus CD27 and CD45RA added as drop-in antibodies. Details about the specific antibody clones

and fluorochrome-conjugated reagents used are provided in Supplementary Table 1. Staining and data acquisition of all samples were performed within 24 h after blood collection.

Data were acquired on a BD FACSCanto IITM flow cytometer (BD Biosciences), and instrument settings and data acquisition were performed according to the EuroFlow guidelines available at euroflow.org/protocols. Standard instrument settings were monitored by BD Cytometer Setup and Tracking (CS&T) beads (BD) and eight-peak Rainbow bead calibration particles (Spherotech, Lake Forest, IL). Data were exported as an FC standard file for further analysis.

Data Analysis: All FC standard data files were analyzed automatically using the Infinicyt module and the EuroFlow PIDOT database, with a special focus on the lymphoid populations. All major blood lymphocyte populations, including naïve B cells and post-GCs, memory B cells (MBCs), and plasma cells (PCs), as well as CD4 and CD8 maturation subsets, double negative (DN) gamma/delta T cells, and NK cells, were analyzed. Additionally, neutrophils, eosinophils, monocytes, CD16+ monocytes, and plasmacytoid dendritic cells were included.

The T-cell subsets were automatically analyzed and classified as naïve (CD27+CD45RA+), central memory/transitional memory (CM/TM; CD27+CD45RA-), effector memory (EM; CD27-CD45RA-) and terminally differentiated (TD; CD27-CD45RA+) CD4+ T cells; and naïve (CD27+CD45RA+), CM/TM (CD27+CD45RA-), EM (CD27-CD45-), and TD (CD27-CD45RA+) CD8+ T cells. Additionally, CD4/CD8 double negative and CD4/CD8 double-positive T cells were studied (35, 36). B-cell subsets were subdivided into naïve B cells (IgM+IgD+CD27-), unswitched memory B cells/plasma cells (unswitched MBC/PC; IgM+IgD+/-CD27+), and switched memory MBCs/PCs (IgM-IgD-CD27+) (28–30).

The absolute counts per microliter of the lymphocyte subsets identified by flow cytometry were calculated using a double platform approach with the absolute leukocyte counts determined before sample processing with a hematology analyzer population (Unicel DxH 800 Beckman Coulter) and the Infinicyt Statistics Configure tool.

All blood lymphocyte (sub)populations were compared with established Euroflow age-matched reference values. We classified all subpopulations below and above percentile 5 of the age-matched reference value because immunosuppression treatment decreases lymphocyte counts.

Reference populations were obtained from the Euroflow PIDOT database from multicentric healthy adult volunteers with no sign or suspicion of immunological or hematological diseases, including an abnormal infection rate or a known history of allergies (29, 30).

Statistical analysis

Continuous variables were tested for normal distribution (Kolmogorov–Smirnov). Normally distributed variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD), non-normally distributed as median and interquartile range. Qualitative variables were expressed as numbers and percentages. The chi-square test was used to compare categorical variables. Continuous variables were compared using a t-test (normally distributed) or

Kruskal–Wallis/Mann–Whitney test (non-normally distributed) with Bonferroni correction. As a normal distribution could not be demonstrated for any of the continuous variables, they were represented as median and interquartile range. Correlations of baseline levels of B cells, T cells, and anti-RBD IgG were calculated using Spearman’s rank correlation. $P < 0.05$ was considered statistically significant. IBM® SPSS® version 22 (Chicago, IL) statistical software was used for statistical analyses. Graph Pad 8 was used to construct charts.

Results

Baseline patient characteristics according to the first time of detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity are detailed in Table 1. Only 27% of KTR patients achieved seropositivity after the initial two doses of vaccination (2DR), whereas in most KTRs, seroconversion was observed after boosters (BR, 47%). Meanwhile, 26% of KTR patients remained seronegative (NR group).

The relative frequency of different maintenance immunosuppression regimens was different among the responder groups in our study. The proportion of patients on everolimus was higher in seroconversion groups than in non-responder patients (2DR, 33%; BR, 22%; and NR, 4%; $p = 0.046$). However, patients with mycophenolate were the most frequent in the NR group (NR, 96%; BR, 80%; 2DR, 42%; $p = 0.000$; Table 1). Age, diabetes, lymphocyte count, and glomerular filtration rate were similar in the three groups. The time from transplantation was lower in NR than in the BR and 2DR group, although this difference was not statistically significant (median 42, 67, and 70 months; $p = 0.485$).

IgG RBD SARS-CoV-2 (BAU/mL) levels (shown in Table 1) were measured after 1 month of heterologous/homologous boosters. As expected, KTR patients in the 2DR group were the ones who had the highest levels of IgG anti-SARS-CoV-2 after the boosters (2DR 4,229 [2,773–12,555] vs. BR 291 (78–1,047) vs. NR 2.5 [1–5] BAU/ml) (Table 1). There were no differences in the IF analysis and in IgG anti-RBD titers between the homologous and heterologous KTRs (data not shown).

The composition and function of immune cell populations are age-dependent. Therefore, the analysis of the PIDOT tube includes age-specific reference ranges for the PIDOT database. In this study, we also analyzed the frequency of patients with values below the 5th percentile of the age-reference range for each subpopulation studied for the different response groups studied: NR, BR, and 2DR (29, 30). We divided lymphocyte subpopulations below and above the 5th percentile of the age-matched reference value because immunosuppression treatment decreases lymphocyte counts.

B-cell populations according to the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity

We analyzed all main circulating lymphocytes using the standardized PIDOT orientation tube and a supervised automated analysis that includes a database with age-matched reference values for each population studied (a representative clustering is shown in

Figure 2). For B-cells, we analyzed three subsets: naïve B cells ($IgM^+IgD^+CD27^-$), unswitched memory B cells or unswitched plasma cells (UnswMBCs/PCs; $IgM^+IgD^{+/-}CD27^+$), and switched memory B cells or switched PCs (swMBCs/PCs; $IgM^-IgD^-CD27^+$) (Figure 3 and Table 2). Then, we analyzed the proportion of KTR patients falling below the 5th percentile of the age-matched reference value for each population studied.

We found that the only subset associated with seropositivity was swMBCs/PCs. Naïve B cell and unswMBC/PC absolute counts were similar among vaccination response groups. The proportion of KTR patients with unswMBC/plasma cells below the 5th percentile was comparable in the three groups (naïve B cells, NR 48%, BR 27%, and 2DR 41%, $p = 0.201$; unswMBC/PC, NR 52%, BR 44%, and 2DR 37%, $p = 0.597$; Figures 3B, C, Table 2).

swMBC/PC counts in the NR group were lower than those in BR and 2DR (10 cells/ul (6–13), 17 cells/ul (10–25), and 30 cells/ul (10–55), respectively; $p = 0.017$; Table 2). The proportion of patients with swMBC/PC cells below the 5th percentile of the age reference was higher in the NR group than in the BR and 2DR groups (52%, 27%, and 21%, respectively; $p = 0.045$; Figure 3E). Additionally, the ratio of swMBCs-PCs/unsw MBCs/PCs was lower in the NR group than in the responder groups (NR, 1.1; BR, 1.86; 2DR, 2.73; $p = 0.024$; Figure 3F).

T-cell compartment according to the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity

For T cells, we analyzed CD4 and CD8 maturation subsets naïve, central memory/transitional memory, effector memory, and terminally differentiated and DN gamma/delta T cells. T-cell values below the 5th percentile of the age reference were more frequent in the NR and BR groups than in the 2DR group, although this difference was not statistically significant (NR, 26% and BR, 22% vs. 2DR, 8%; $p = 0.257$).

CD8 T-cells, naïve CD8 T-cells, effector memory, and terminally differentiated CD8 T-cell counts were similar among groups. However, the central memory/transitional memory (CM/TM) CD8 T-cell absolute count was significantly higher in the 2DR group than in the NR and BR groups ($p = 0.041$; Figure 4, Table 2). CD4 T-cell and their subsets, double negative T-cell, and NK cell counts were similar among groups (Table 2 and Supplementary Figures 2B–E).

Myeloid cell compartment according to the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity groups

The percentage of monocytes below the 5th percentile of age reference was higher in the 2DR group than in the BR and NR groups (2DR, 21%; NR, 2%; BR, 2%; $p = 0.023$). However, the absolute number of total monocytes and $CD16^+$ monocytes was similar among groups (2DR, 539; no SC, 609; and BR, 605 cells/ul; $p = 0.277$; Figure 5).

TABLE 1 Clinical characteristics of patients according to the time of the first detected IgG anti-RBD SARS-CoV-2 seropositivity.

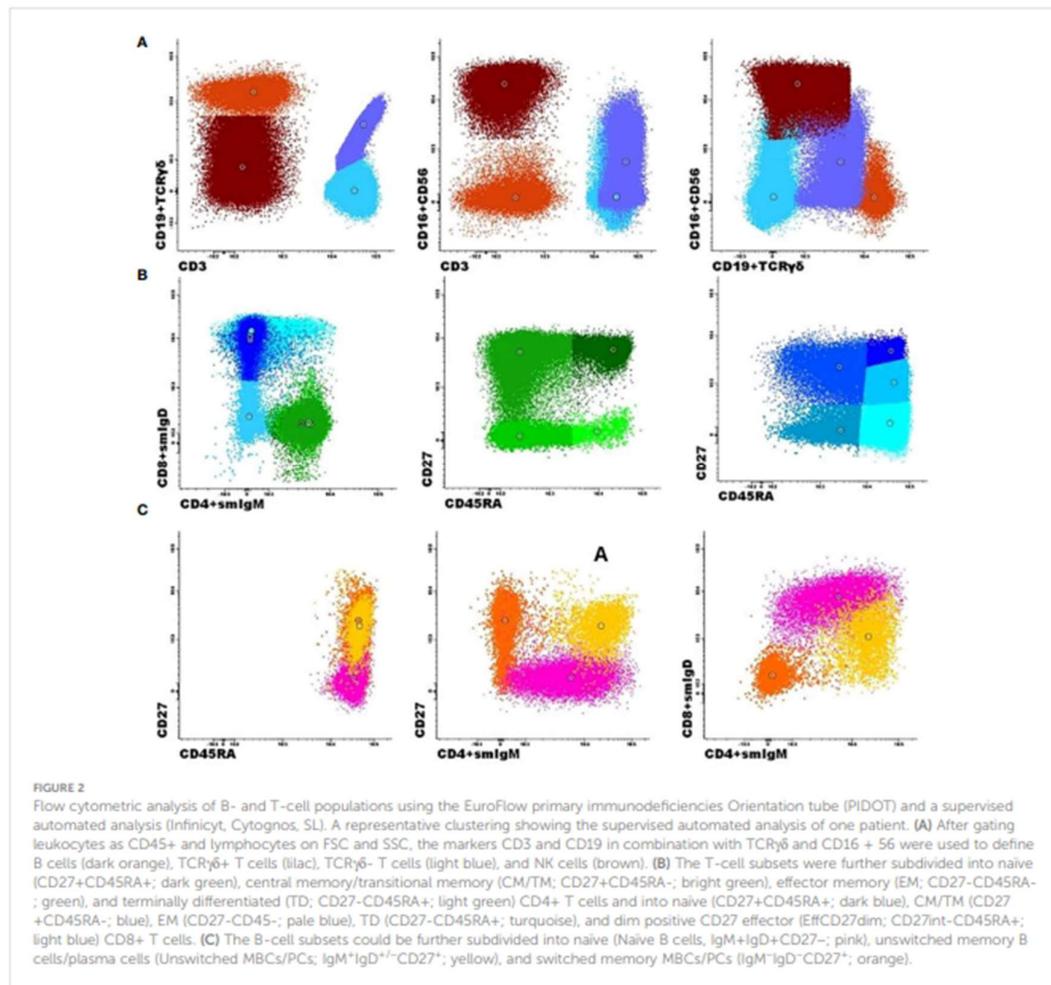
Variable	Time of the first detected IgG SARS-CoV-2 Seropositivity			p-value
	NRs Non-responders	BRs Booster responders	2DRs Two-dose responders	
N, (%)	23(26%)	41(47%)	24 (27%)	
Vaccine scheme				0.615
Heterologous, n (%)	20 (87%)	36 (87.8%)	19 (79.2%)	
Homologous, n (%)	3 (13%)	5 (12.2%)	5 (20.8%)	
Age years, median (IQR)	55(47-55)	61 (43-54)	54 (39-53)	0.705
Sex, men n (%)	9 (39%)	13 (32%)	10 (41%)	0.687
Comorbidities, n (%)				0.604
Stroke	1 (4%)	1 (2%)	0	0.169
Ischemic heart disease	0	3 (7%)	0	0.560
Peripheral arteriopathy	0	1 (2%)	0	
Diabetes mellitus, n (%)	5 (22%)	12 (29%)	3 (13%)	0.295
Time since transplantation: months, median (IQR)	42 (31-110)	67 (31-158)	70 (27-42)	0.485
Triple immunosuppression, n (%)	20 (87%)	27 (66%)	13 (54%)	0.049
Antimetabolite, n (%)				0.000
None	1 (4%)	6 (15%)	9 (37%)	
Mycophenolate	22 (96%)	33 (80%)	10 (42%)	
Azathioprine	0 (0%)	2 (5%)	5 (21%)	
Calcineurin inhibitors, n (%)				0.306
None	1 (4%)	4 (10%)	3 (12%)	
Tacrolimus	19 (83%)	28 (68%)	20 (83%)	
Cyclosporine	3 (13%)	9 (22%)	1 (4%)	
Prednisone, n (%)	22 (96%)	97 (90%)	23 (96%)	0.593
Everolimus, n (%)	1(4%)	9 (22%)	8 (33%)	0.046
Rituximab, n (%)	0	2 (5%)	0	0.309
Thymoglobulin, n (%)	7 (30%)	5 (12%)	5 (21%)	0.203
Rejection in the last 3 months, n (%)	0	1 (2%)	0	0.561
Lymphocyte count, cells/ul, median (IQR)	1658 (951-2289)	1613 (1153-2243)	1618 (1474-2217)	0.416
IgG RBD SARS-CoV-2 (BAU/mL) after 1 month homologous or heterologous boosters, median (IQR)	2.5 (1-5)	291 (78-1047)	4229 (2773-12555)	0.000
GFR ml/min/1.73m ² , median (IQR)	64 (55-47)	61(43-64)	62 (47-63)	0.637

Uruguayan Vaccination Scheme: heterologous regimen combination of two doses of inactivated SARS-CoV-2 (CoronaVac[®]) and two boosters of BNT162b2 mRNA. Homologous vaccination: two doses and one booster of BNT162b2 mRNA. The IgG anti-SARS-CoV-2 study was conducted 30 days after the second dose and after every booster. Immunophenotypic analysis was performed after the last booster. Groups according to the time of first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity: initial two-dose responders (2DR), KTRs with IgG anti-SARS-CoV-2 seropositivity after two initial doses; booster responders (BR), KTRs who were seronegative after the initial two doses but did respond to the boosters (heterologous or homologous); and non-responders (NR), those who did not respond after two initial doses and after boosters (heterologous or homologous). Seropositivity was defined as specific IgG antibodies against the receptor-binding domain (RBD) fragment of the SARS-CoV-2 spike protein >10 BAU/ml. KTR, kidney transplant recipient; eGFR, estimated glomerular filtration rate using the CKD EPI Formula; RBD, receptor-binding domain; SD, standard deviation; CNI, calcineurin inhibitors; IQR, interquartile range; triple immunosuppression, antimetabolite+calcineurin inhibitor+prednisone. Non-normally distributed as median and interquartile range (IQR).

Correlation between IgG SARS-CoV-2 levels, lymphocyte populations, and clinical parameters

The Spearman correlation matrix was used to analyze the correlation between IgG anti-RBD SARS-CoV-2, lymphocyte absolute counts, and continuous clinical parameters. We

summarized the representative correlations in Figure 6. There was a moderate correlation between IgG anti-RBD SARS-CoV-2 and switched memory B cells (Rho=0.3, p=0.005) and the ratio of switched/unswitched (Rho=0.27, p=0.011). Additionally, there was a weak correlation between the time of post-kidney transplantation and IgG anti-RBD SARS-CoV-2 (Rho=0.24, p=0.032). There was no association of IgG anti-RBD SARS-CoV-



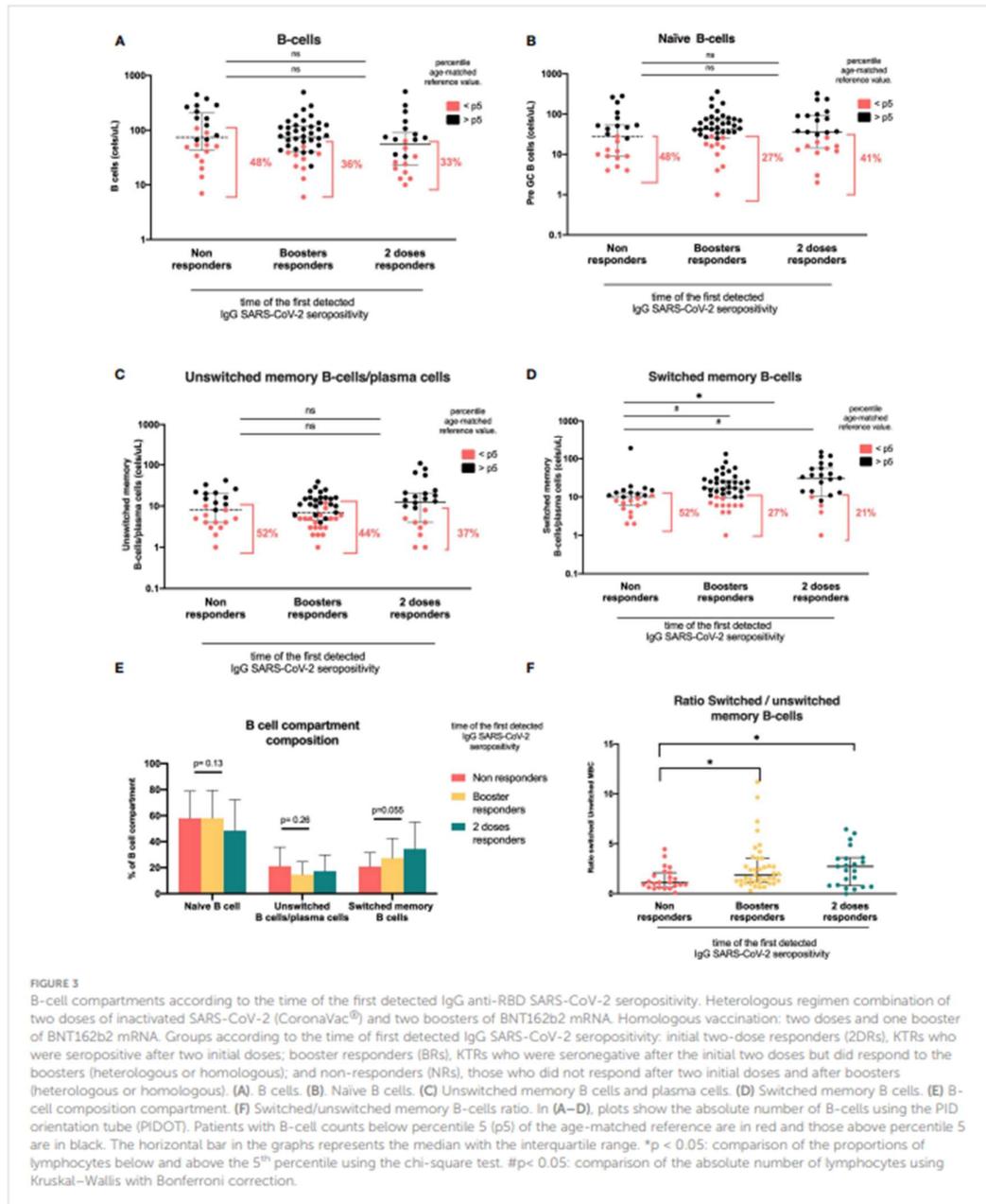
2 with age, glomerular filtration rate, or other T- and B-cell subpopulations.

Discussion

An essential feature of vaccine evaluation and improvement is understanding the underlying immune mechanisms. There are several studies describing antibody responses to SARS-COV-2 vaccination and some of them also describe cellular responses (1–22, 37–57). However, there is little evidence concerning the response of T- and B-cell subpopulations in vaccinated KTRs. This study describes cellular immune responses following SARS-COV-2 vaccination and evaluates which features of this response correlate with the time of the first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity.

Immune profiles were studied after two doses-one booster-homologous and two doses-two boosters-heterologous SARS-CoV-2 vaccination. All patients received boosters independently of seropositivity status. Taking into account that the normal range of circulating lymphocyte subsets varies with age (28–30), we used the Euroflow PIDOT flow cytometry approach that includes a database with age-matched reference values. This approach enables us to compare lymphocyte subpopulation counts in KTR patients with the normal age-reference range. We calculated the frequency of patients with values below the 5th percentile of the age-reference range for each subpopulation studied.

Here, we found that KTRs who respond to vaccines or boosters had a more prominent expansion of switched memory B cells after SARS-CoV-2 boosters. Non-responder KTRs had significantly lower switched MBC/PC cell counts than patients who



responded. Additionally, the percentage of patients with swMBCs/PCs below the 5th percentile of the normal range was 50% in the non-responder group compared with 20% in both seropositivity groups. This is in line with previous reports in which a reduced

number of switched MBCs was associated with a low humoral response in KTRs and in autoimmune disease (22, 23, 26).

The presence of switched MBCs/PCs in the blood is an indicator of a functional germinal center reaction (35). In the germinal center,

TABLE 2 Lymphocyte subpopulations according to the time of the first detected IgG anti-RBD SARS-CoV-2 seropositivity.

Variable	Time of the first detected IgG SARS-CoV-2 Seropositivity			p- value
	NRs Non-responders	BRs Booster responders	2DRs Two-dose responders	
B cells, cell/ul, median (IQR)	63 (24-84)	77 (40-116)	74 (45-193)	0.214
Naïve B cells, cell/ul, median (IQR)	28 (9-53)	42 (26-74)	36 (15-90)	0.484
Unswitched MBCs, cell/ul, median (IQR)	8 (4-20)	7 (5-15)	12 (4-20)	0.590
Switched MBCs, cell/ul, median (IQR)	10 (6-13)	17 (10-25)	30 (10-55)	0.005
T cells, cell/ul, median (IQR)	1527 (687-1847)	1331 (863-1749)	1374 (1189-1934)	0.444
CD4 T cells, cell/ul, median (IQR)	631 (272-945)	539 (342-922)	714 (421-846)	0.568
Naïve CD4 T cells, cell/ul, median (IQR)	98 (38-255)	103 (39-190)	129 (58-242)	0.889
CM/TM CD4 T cells, cell/ul, median (IQR)	284 (143-395)	258 (163-418)	297 (208-442)	0.738
Effector memory CD4 T cells, cell/ul, median (IQR)	67(35-157)	82 (45-136)	88 (65-203)	0.356
TD CD4 T cells, cell/ul, median (IQR)	20 (6-60)	26 (7-77)	22 (5-42)	0.738
CD8 T cells, cell/ul, median (IQR)	605 (288-916)	546 (271-861)	568 (409-959)	0.471
Naïve CD8 T cells, cell/ul, median (IQR)	34(24-127)	37(22-97)	69(28-154)	0.505
CM/TM CD8 T cells, cell/ul, median (IQR)	98 (49-128)	93 (60-158)	166 (101-239)	0.041
Effector memory CD8 T cells, cell/ul, median (IQR)	35(13-80)	48(23-113)	56(21-117)	0.558
TD CD8 T cells, cell/ul, median (IQR)	41(17-75)	49 (19-108)	45(24-109)	0.843
Double-negative T cells, cell/ul, median (IQR)	6(3-11)	11(5-28)	10(3-29)	0.268
NK cells, cell/ul, median (IQR)	25 (12-51)	26(11-83)	38(21-69)	0.736
Monocytes, cell/ul, median (IQR)	609 (409-888)	605 (485-713)	539 (254-974)	0.667
Plasmacytoid DC, cell/ul, median (IQR)	7(5-10)	7(6-13)	8(4-17)	0.491

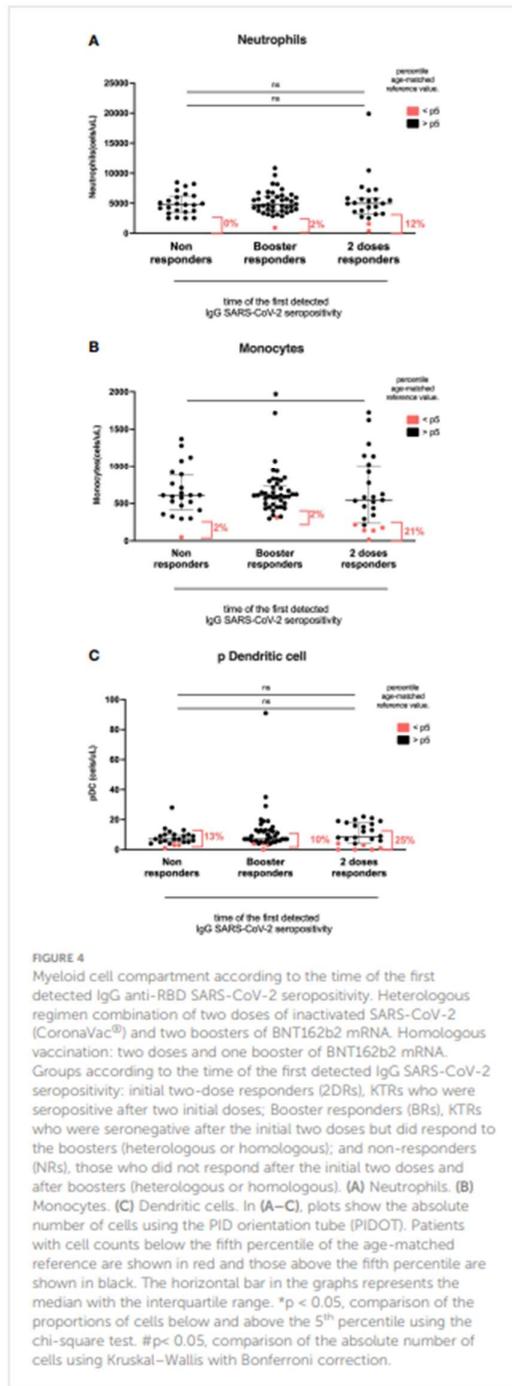
Non-normally distributed as median and interquartile range. GC, germinal center; MBCs, memory B cells; CM, central memory; TC, transitional memory; TD, terminally differentiated; DC, dendritic cell; NRs, non-responders; BRs, booster responders; 2DRs, two-dose responders.

antigen-specific B cells undergo somatic hypermutation and affinity-based selection (58). SARS-CoV-2 mRNA-based vaccines induce a robust germinal center response in mice and humans (47, 58, 59). On the other hand, kidney transplant immunosuppression blunts T-B cooperation and decreases the humoral response (60–64).

KTRs in the 2DR group had higher switched MBC counts and IgG anti-SARS-CoV-2 levels after boosters. This may reflect a lower immunosuppression burden. We found that KTRs in this group were more frequently on mTOR inhibitors (everolimus) and less frequently on mycophenolate. This is in line with previous studies that have shown that humoral immune responses were better preserved with everolimus than with mycophenolate (58, 65, 66). Memory B cells seem better correlated with serological responses

with mRNA vaccines and protein-based vaccines (67). The increase of antibodies after boosters is due to a significant expansion of memory B cells in the healthy population (58). Here, we showed that IgG anti-SARS-CoV-2 levels were associated with switched MBC counts, and higher levels were observed in the 2DR group than in the booster responders.

KTRs in the two-dose responder group also had more circulating CD8 CM/TM T cells than booster responders and non-responders. The central memory (CM) or effector memory (EM) differentiation states of CD4⁺ and CD8⁺ T cells have implications for durability and the responses upon antigen re-exposure. In immunocompetent individuals, low IgG levels after SARS-CoV-2 vaccination were associated with a low frequency



of specific CD8+ T-cell memory and failed to control the delta and omicron variants of COVID-19 (34). This is in line with recent studies that showed IFN γ -producing CD8-T cells correlate with IgG titer and neutralization (68). In this study, anti-SARS-CoV-2 IgG levels were not correlated with CD8 CM/TM T cells.

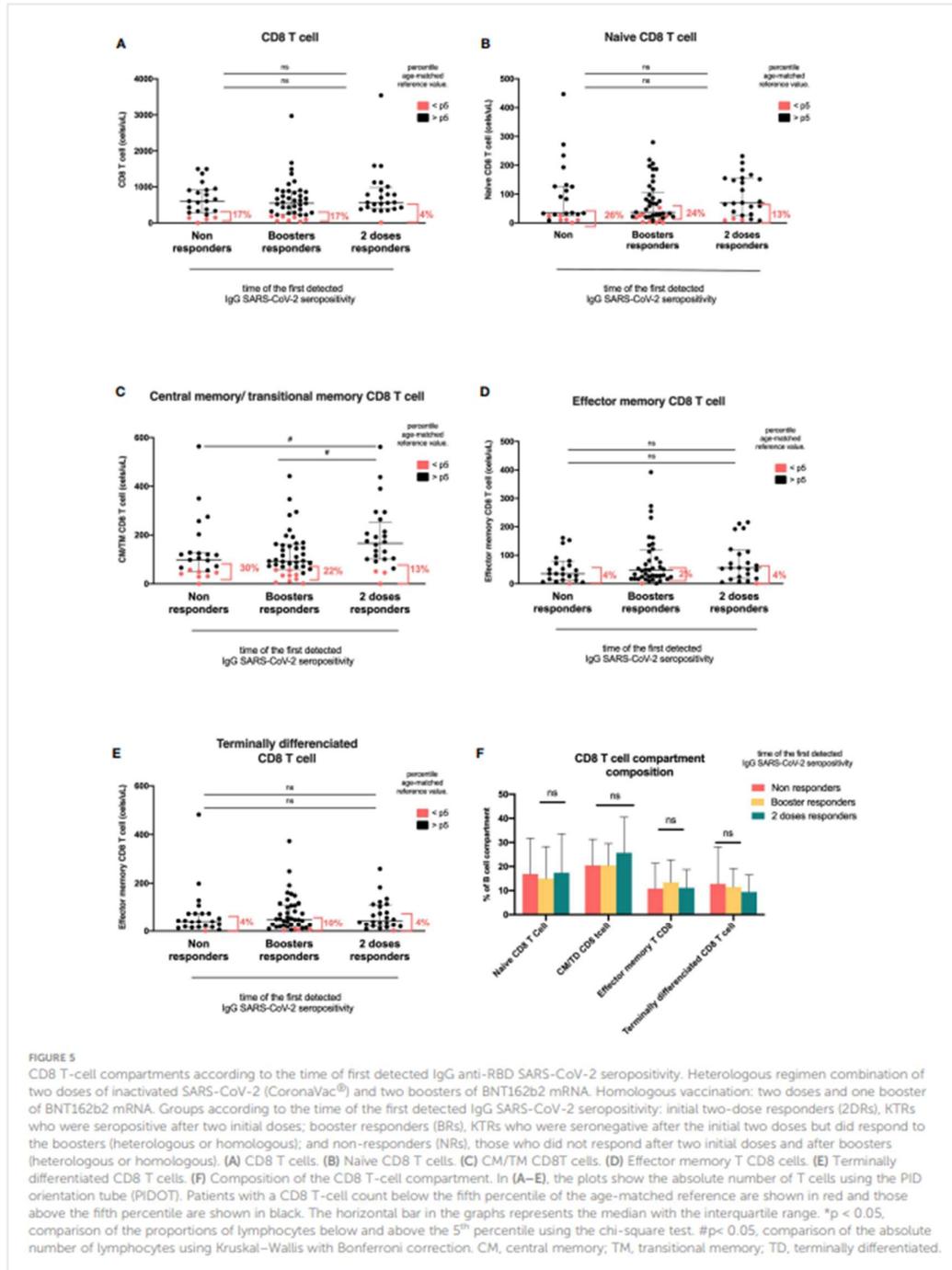
In this study, we showed that boosters increase CM/TM CD8 T cells and switched MBCs in patients with a first detected IgG SARS-CoV-2 seropositivity after two doses. This could be explained by an increase in SARS-CoV-2 specific SARS-CoV-2 MBCs or CM/TM CD8 T cells; unfortunately, we did not measure these SARS-CoV-2 specific subpopulations.

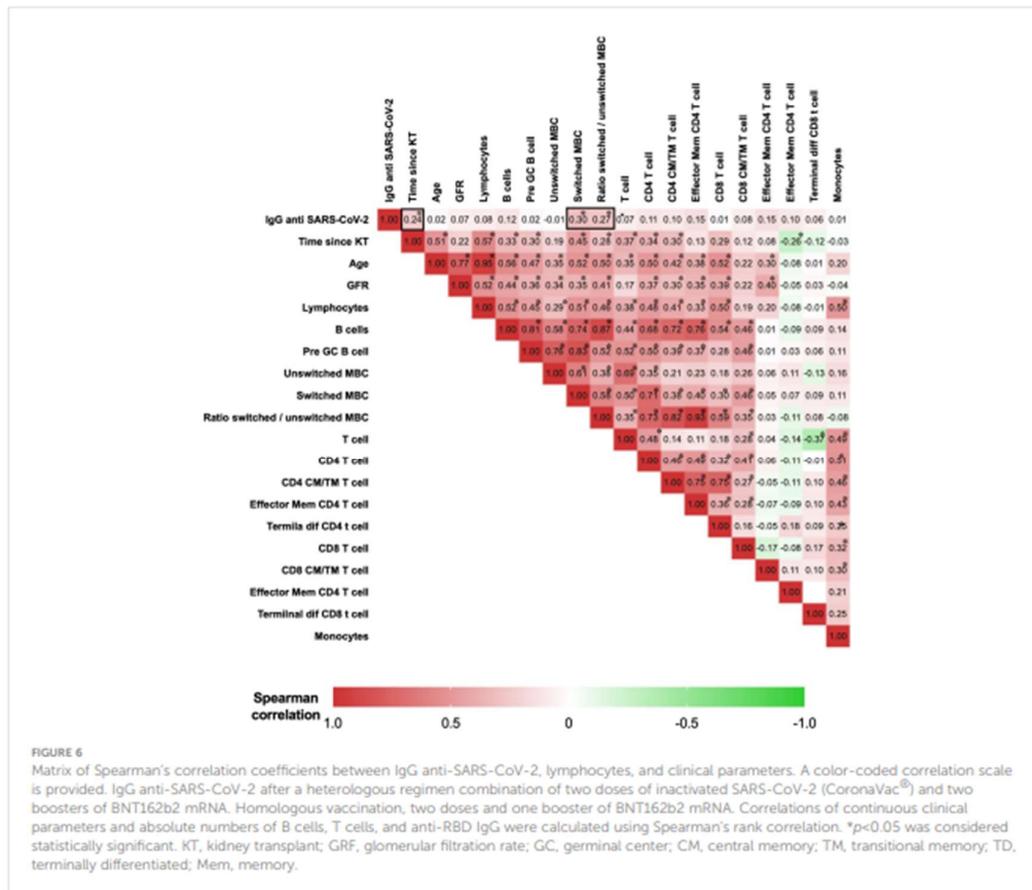
In this study, seropositivity and IgG levels were not associated with different subpopulations of CD4 T cells. This was also observed in patients with other types of immunosuppression, such as hematological malignancies and solid organ transplants (69). By contrast, other researchers showed that low CD4 T-cell counts were associated with a diminished humoral response in patients with immunosuppression (19, 58, 70).

We also showed that two-dose responder KTRs had a higher percentage of monocytes below the 5th percentile. Monocytes displayed a negative correlation with antibody titers in hemodialysis patients (71). In addition, some studies have demonstrated that inflammatory monocytes (CD14⁺, CD16⁺, and HLA-DR⁺) suppress vaccine responses (71–73). However, we did not find differences among groups in terms of CD16⁺ monocyte counts.

As we indicated previously, the present study did not assess SARS-CoV-2-specific B and T subsets. Nevertheless, the use of a single screening flow cytometry tube for immunodeficiency can enable a fast, standardized, and validated analysis of the immunophenotypic profile, making it a convenient method for studying the immune response in all clinical flow cytometry laboratories. The major advantage is that data can be fully exchanged between different clinical laboratories in any country. This information may be important to facilitate the development of a more effective vaccination scheme for patients on immunosuppression treatment. It should be noted that we used the PIDOT European database as a reference population, which may have differences with the Uruguayan population in lymphocyte counts due to environmental factors. However, it is worth noting that these discrepancies are expected to be minimal, given that Uruguayan individuals possess over 70% European genetic ancestry and have a similar diet and infection pattern to Europe (74).

In conclusion, switched memory B-cell counts in peripheral blood were associated with the humoral response after SARS-CoV-2 vaccination and boosters. Boosters increase IgG anti-SARS-CoV-2 levels, CM/TM CD8 T cells, and switched MBCs in patients with seropositivity after two doses. CD8+ T cells can continue to be protective when antibody titers decrease. Meanwhile, no seroconversion after boosters was associated





with the use of mycophenolate and a lower number of switched MBCs and CM/TM CD8 T cells in peripheral blood. This information regarding B- and T-cell compartments could help the planning of a more effective vaccination scheme in KTRs based on the immune system response.

Data availability statement

The datasets presented in this article are not readily available because it is sensitive data and not publicly available due to restrictions for containing information that could compromise the privacy of research participants. The data that support the findings of this study are available upon reasonable request keeping confidentiality. Requests to access the datasets should be directed to mariana.seija@gmail.com.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Comitè de Ètica del Hospital de Clínicas (MSP 3535533). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

MS and JN: acquisition, analysis, and interpretation of data, drafting the manuscript, and approval of the manuscript. JG, FR, AB, NT, and BS: acquisition and analysis of data. BS, JS, NO, CZ, DM, CR, RA, FY, AG, MN, SO, LC, EB, and ON: design of the study, enrolling patients, and reviewing the manuscript. AT and DL: interpretation of data, reviewing the manuscript, and approval of

the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

and Aldana Marrero for their participation in the writing of informed consent.

Funding

This study was supported by the Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM, COF 03/11); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay; and Fondo de Investigación en Nefrología (FOINE), Hospital de Clínicas, Uruguay.

Acknowledgments

We would like to especially thank Dr. Otto Pristch, who passed away during the writing of this manuscript, for being an important teacher, counselor, and figure in this study and the linkage of Academia and the National Health System in the fight against the COVID-19 pandemic in Uruguay. We thank Daniella Cassinelli, Cecilia Coelho, Belén de Aramburu, Paulina González, Romina Moreno, Aldana Pippolo, Gabriela López, Mónica Lemos, Lorena Somariva, Eliana López, and Soledad Fumero for their assistance with patients. We would also like to show our gratitude to Victoria Frantchez for comments that greatly improved the manuscript and Cecilia Canessa for providing access to the laboratory. Finally, we would like to thank Asociación de Trasplantados del Uruguay (ATUR) for its commitment to the role of science in improving the quality of life of KTRs, especially Carlos Perez, Oscar Silveira,

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1202630/full#supplementary-material>

References

1. Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D, Schwartz IF, Ben-Yehoyada M, Shashar M, et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus: Not alarming, but should be taken gravely. *Am J Transplant* (2021) 21(8):2719–26. doi: 10.1111/ajt.16615
2. Yi SG, Knight RJ, Grawiss EA, Nguyen DT, Ghobrial RM, Gaber AO, et al. Kidney transplant recipients rarely show an early antibody response following the first COVID-19 vaccine administration. *Transplantation* (2021). doi: 10.1097/TP.0000000000003764
3. Rincon-Arevalo H, Choi M, Stefanski AL, Halleck F, Weber U, Szelinski F, et al. Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Sci Immunol* (2021) 6(60):1–15. doi: 10.1126/sciimmunol.1201031
4. Danthu C, Hantz S, Dahlem A, Duval M, Ba B, Guibbert M, et al. Humoral Response after SARS-CoV-2 mRNA Vaccine in a Cohort of Hemodialysis Patients and Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* (2021) 32(9). doi: 10.1681/ASN.2021040490
5. Benotmane I, Gautier -Vargas G, Cognard N, Olgne J, Heibel F, Braun-Parvez L, et al. Weak anti-SARS-CoV-2 antibody response after the first injection of an mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int* (2021) 119:1246–58. doi: 10.1016/j.kint.2021.03.014
6. Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA, Potekhin A, Bachmann F, Straub-Hohenbleicher H, et al. Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV2 BNT162b2 (Tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J Clin Invest* (2021) 131(14). doi: 10.1172/jci150175
7. Kolb T, Fischer S, Müller L, Lübke N, Hillebrandt J, André M, et al. Impaired immune response to SARS-CoV-2 vaccination in dialysis patients and in kidney transplant recipients. *Kidney360* (2021). doi: 10.34067/KID.0003512021
8. Eren Sadioglu R, Demir E, Evren E, Aktar M, Şafak S, Artan AS, et al. Antibody response to two doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in kidney transplant recipients. *Transp Infect Dis* (2021) 23(6). doi: 10.1111/tid.13740
9. Bertrand D, Hanoy M, Edet S, Lemée V, Hamzaoui M, Laurent C, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and in-centre and satellite centre haemodialysis patients. *Clin Kidney J* (2021) 14(9):2127–8. doi: 10.1093/ckj/sfab100
10. Georgery H, Devresse A, Saad Albichr I, Lucas S, Yombi J-C, Belkhir L, et al. Delayed humoral response after 2 doses of the BNT162b2 vaccine in a belgian kidney transplant cohort. *Transplantation* (2021). doi: 10.1097/TP.0000000000003952
11. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N, Olgne J, Heibel F, Braun-Parvez L, et al. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int* (2021) 99(6):1498–500. doi: 10.1016/j.kint.2021.04.005
12. Rozen-Zvi B, Yahav D, Agur T, Zingerman B, Ben-Zvi H, Atamna A, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine among kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* (2021) 27(8):1173.e1–e4. doi: 10.1016/j.cmi.2021.04.028
13. Masset C, Kerleau C, Garandeau C, Ville S, Cantarovich D, Hourmant M, et al. A third injection of BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine in kidney transplant recipients improves the humoral immune response. *Kidney Int* (2021). doi: 10.1016/j.kint.2021.08.017
14. Caillard S, Thauant O, Benotmane I, Masset C, Blancho G. Antibody response to a fourth messenger RNA COVID-19 vaccine dose in kidney transplant recipients: A case series. *Ann Intern Med* (2022). doi: 10.7326/L21-0598
15. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olgne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA* (2021) 326(11):1063. doi: 10.1001/jama.2021.12339
16. Schrezenmeier E, Rincon-Arevalo H, Stefanski A-L, Potekhin A, Staub-Hohenbleicher H, Choi M, et al. B and T cell responses after a third dose of SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol [Internet]* (2021) 32(12):3027–33. doi: 10.1681/ASN.2021070966
17. Villanego F, Cazorla JM, Vigar LA, Garcia T, Trujillo T, Montiel N, et al. Protecting kidney transplant recipients against SARS-CoV-2 infection: A third dose of vaccine is necessary now. *Am J Transplant* (2021) 21(11):1682–9. doi: 10.1111/ajt.16829
18. Kho MML, Messchendorp AL, Frölke SC, Imhof C, Koomen VJ, Malaha SRK, et al. Alternative strategies to increase the immunogenicity of COVID-19 vaccines in kidney transplant recipients not responding to two or three doses of an mRNA vaccine

(RECOVAC): a randomised clinical trial. *Lancet Infect Dis* (2023) 23(3):307–19. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00650-8

19. Oyaert M, De Scheerder M-A, Van Herreweghe S, Laureys G, Van Assche S, Cambroun M, et al. Evaluation of humoral and cellular responses in SARS-CoV-2 mRNA vaccinated immunocompromised patients. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.858399

20. Seija M, Rammauro F, Noboa J, Santiago J, Orihuela N, Zurberti C, et al. Humoral response to heterologous SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant patients is heterogeneous and dose dependent. *Kidney Int Rep* (2022). doi: 10.1016/j.kir.2022.05.005

21. Seija M, Rammauro F, Santiago J, Orihuela N, Zurberti C, MaChado D, et al. Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant. *Clin Kidney J [Internet]* (2022) 15 (3):527–33. doi: 10.1093/cjks/fab291/6484820

22. Jena A, Mishra S, Deepak P, Kumar M P, Sharma A, Patel YI, et al. Response to SARS-CoV-2 vaccination in immune mediated inflammatory diseases: Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* (2022) 21(1):102927. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102927

23. Mrak D, Tobudic S, Kobaljške M, Graninger M, Radner H, Sieghart D, et al. SARS-CoV-2 vaccination in rituximab-treated patients: B cells promote humoral immune responses in the presence of T-cell-mediated immunity. *Ann Rheum Dis* (2021) 80(10):1345–50. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-220781

24. Hou Y-C, Lu K-C, Kuo K-L. The efficacy of COVID-19 vaccines in chronic kidney disease and kidney transplantation patients: A narrative review. *Vaccines* (2021) 9(8):885. doi: 10.3390/vaccines9080885

25. Bloom RD, Augustine JJ. Beyond the biopsy: Monitoring immune status in kidney recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* (2021) 16(9):1413–22. doi: 10.2215/CJN.14840920

26. Schuller M, Pfeifer V, Kirsch AH, Klötzer KA, Mooslechner AA, Rosenkranz AR, et al. B cell composition is altered after kidney transplantation and transitional B cells correlate with SARS-CoV-2 vaccination response. *Front Med* (2022) 9(February):1–14. doi: 10.3389/fmed.2022.818882

27. Wojciechowski D, Wiseman A. Long-term immunosuppression management. *Clin J Am Soc Nephrol* (2021) 16(8):1264–71. doi: 10.2215/CJN.15040920

28. Linskens E, Diks AM, Neirincx J, Perez-Andres M, De Maertelaere E, Berkowska MA, et al. Improved standardization of flow cytometry diagnostic screening of primary immunodeficiency by software-based automated gating. *Front Immunol* (2020) 11 (November). doi: 10.3389/fimmu.2020.584646

29. Van Dongen JJM, van der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Mejstříková E, Vlkova M, et al. EuroFlow-based flow cytometric diagnostic screening and classification of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol* (2019) 10 (JUN):1–21. doi: 10.3389/fimmu.2019.01271

30. van der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Vlkova M, Lopez-Granados E, Blanco E, et al. The euroFlow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol* (2019) 10:246/full. doi: 10.3389/fimmu.2019.00246/full

31. Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, Shimoda M, Rajewsky K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol* (2014) 44(5):1258–64. doi: 10.1002/eji.201343716

32. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunity Rev* (2012) 24(1):52–63. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01124.x

33. Mesin L, Ersching J, Victoria GD. Germinal center B cell dynamics. *Immunity* (2016) 45(3):471–82. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001

34. Brasu N, Elia I, Russo V, Montacchiesi G, Stabile SA, De Intinis C, et al. Memory CD8+ T cell diversity and B cell responses correlate with protection against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination. *Nat Immunol* (2022) 23(10):1445–56. doi: 10.1038/s41590-022-01313-z

35. Andreano E, Paciello I, Pierleoni G, Piccini G, Abbiento V, Antonelli G, et al. B cell analyses after SARS-CoV-2 mRNA third vaccination reveals a hybrid immunity like antibody response. *Nat Commun* (2023) 14(1):53. doi: 10.1038/s41467-022-35781-6

36. Rammauro F, Carrion F, Olivero-Deibe N, Fló M, Ferreira A, Pritsch O, et al. Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2. *Vaccine* (2022) 40(35):5189–96. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.07.023

37. Westhoff TH, Seibert FS, Anft M, Blazquez-Navarro A, Skrzypczyk S, Zgoura P, et al. A third vaccine dose substantially improves humoral and cellular SARS-CoV-2 immunity in renal transplant recipients with primary humoral nonresponse. *Kidney Int* (2021) 100(5):1135–6. doi: 10.1016/j.kint.2021.09.001

38. Lederer K, Bettini E, Parvathaneni K, Painter MM, Agarwal D, Lundgreen KA, et al. Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals. *Cell* (2022) 185(6):1008–24.e15. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.027

39. Jeyanthan M, Atkhami S, Small F, Miller MS, Lichty BD, Xing Z. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(10):615–32. doi: 10.1038/s41577-020-00434-6

40. Duni A, Markopoulos GS, Malliouras I, Pappas H, Pappas E, Koutlas V, et al. The humoral immune response to BNT162b2 vaccine is associated with circulating CD19+

B lymphocytes and the naïve CD45RA to memory CD45RO CD4+ T helper cells ratio in hemodialysis patients and kidney transplant recipients. *Front Immunol* (2021) 12 (December):1–11. doi: 10.3389/fimmu.2021.760249

41. Herrera S, Colmenero J, Pascal M, Escobedo M, Castel MA, Sole-González E, et al. Cellular and humoral immune response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in liver and heart transplant recipients. *Am J Transplant* (2021) 16768. doi: 10.1111/ajt.16768

42. Ruggeri EM, Nelli F, Giannarelli D, Fabbri A, Giron Berrios JR, Virtuoso A, et al. Dynamic changes in peripheral lymphocytes and antibody response following a third dose of SARS-CoV-2 mRNA-BNT162b2 vaccine in cancer patients. *Sci Rep* (2022) 12 (1):1–11. doi: 10.1038/s41598-022-25558-8

43. Heldman MR, Limaye AP. SARS-CoV-2 vaccines in kidney transplant recipients: will they be safe and effective and how will we know? *J Am Soc Nephrol* (2021). doi: 10.1681/ASN.2021010023

44. Miele M, Busà R, Russell G, Sorrentino MC, Di Bella M, Timoneri F, et al. Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients. *Am J Transplant* (2021) 21(8):2919–21. doi: 10.1111/ajt.16702

45. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* (2021). doi: 10.1056/NEJMc2108861

46. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* (2020) 383 (27):2603–15. doi: 10.1056/NEJMoa2034577

47. Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, Kim W, Schmitz AJ, Zhou JQ, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* (2021) 596(7870):109–13. doi: 10.1038/s41586-021-03738-2

48. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Mayrhofer M, Jabbour R, Hofbauer TM, Merrelaar A, et al. Comparison of SARS-CoV-2 antibody response 4 weeks after homologous vs heterologous third vaccine dose in kidney transplant recipients. *JAMA Intern Med* (2021). doi: 10.1001/jamainternmed.2021.7372

49. Mossad SB. SARS-CoV-2 vaccine effectiveness trumps immunogenicity in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* (2021). doi: 10.1111/ajt.16744

50. Tejaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol* (2021) 21(April):195–7. doi: 10.1038/s41577-021-00526-x

51. Schmidt T, Klemis V, Schub D, Schneiter S, Reichert MC, Wilkens H, et al. Cellular immunity predominates over humoral immunity after homologous and heterologous mRNA and vector-based COVID-19 vaccine regimens in solid organ transplant recipients. *Am J Transpl* (2021). doi: 10.1111/ajt.16818

52. Blasi F, Fragnola A, Sotgiu G, Saderi L, Voza A, Aliberti S, et al. SARS-CoV-2 vaccines: A critical perspective through efficacy data and barriers to herd immunity. *Respir Med* (2021) 180(January):106355. doi: 10.1016/j.rmed.2021.106355

53. Marinaki S, Adamopoulos S, Degiannis D, Roussos S, Pavlopoulos ID, Hatzakis A, et al. Immunogenicity of SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* (2021) 21(8):2913–5. doi: 10.1111/ajt.16607

54. Hall VG, Ferreira VH, Ierullo M, Ku T, Marinelli T, Majchrzak-Kita B, et al. Humoral and cellular immune response and safety of two-dose SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* (2021). doi: 10.1111/ajt.16766

55. Creech CB, Walker SC, Samuels RJ. SARS-CoV-2 vaccines. *JAMA* (2021) 325 (13):1318. doi: 10.1001/jama.2021.3199

56. Wilder-Smith A, Mulholland K. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* (2021) 385(10):946–8. doi: 10.1056/NEJMe2111165

57. Lederer K, Castañó D, Gómez Atria D, Oguin TH, Wang S, Manzoni TB, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines foster potent antigen-specific germinal center responses associated with neutralizing antibody generation. *Immun [Internet]* (2020) 53(6):1281–95.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.009

58. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol* (2022) 23(7):1008–20. doi: 10.1038/s41590-022-01248-5

59. Stark K, Günther M, Schönfeld C, Tullius SG, Bienzle U. Immunisations in solid-organ transplant recipients. *Lancet* (2002) 359(9310):957–65. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08028-5

60. Li YM, Li Y, Shi YY, Yan L, Wu XJ, Tang JT, et al. Impact of immunosuppressive drugs on circulating Th cells in kidney transplant recipients: A pilot study. *Transpl Immunol* (2018) 46:1–7. doi: 10.1016/j.trim.2017.09.005

61. Wallin EF. T follicular regulatory cells and antibody responses in transplantation. *Transplantation* (2018) 102(10):1614–23. doi: 10.1097/TP.0000000000002224

62. Steines L, Poth H, Schuster A, Amann K, Banas B, Bergler T. Disruption of th:B cell interactions prevents antibody-mediated rejection in a kidney transplant model in rats: impact of calcineurin inhibitor dose. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.657894

63. Wallin EF, Hill DL, Linterman MA, Wood KJ. The calcineurin inhibitor tacrolimus specifically suppresses human T follicular helper cells. *Front Immunol* (2018) 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.011184

64. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner K-M. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* (2016) 270(1):8–19. doi: 10.1111/imr.12396
65. de Boer SE, Berger SP, van Leer-Buter CC, Kroesen BJ, van Baarle D, Sanders JF, et al. Enhanced humoral immune response after COVID-19 vaccination in elderly kidney transplant recipients on everolimus versus mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimens: erratum. *Transplantation* (2022) 106(8):e391. doi: 10.1097/TP.0000000000004232
66. Struijk GH, Minnee RC, Koch SD, Zwinderman AH, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, et al. Maintenance immunosuppressive therapy with everolimus preserves humoral immune responses. *Kidney Int* (2010) 78(9):934–40. doi: 10.1038/ki.2010.269
67. Diks AM, Khatri I, Oosten LEM, de Mooij B, Groenland RJ, Teodosio C, et al. Highly sensitive flow cytometry allows monitoring of changes in circulating immune cells in blood after tdap booster vaccination. *Front Immunol* (2021) 12(June):1–15. doi: 10.3389/fimmu.2021.666953
68. Perez II, Juárez I, Meneses A, Lopez-Gomez A, Romero N, Rodríguez-Cubillo B, et al. Role of mTOR inhibitor in the cellular and humoral immune response to a booster dose of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in kidney transplant recipients. *Front Immunol* (2023) 14:1111569. doi: 10.3389/fimmu.2023.1111569
69. Mohanraj D, Baldwin S, Singh S, Gordon A, Whitelegg A. Cellular and humoral responses to SARS-CoV-2 vaccination in immunosuppressed patients. *Cell Immunol* (2022) 373:104501. doi: 10.1016/j.cellimm.2022.104501
70. Marion O, Del Bello A, Abravanel F, Faguer S, Esposito L, Laure Hebral A, et al. Predictive factors for humoral response after 2-dose SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant patients. *Transplant Direct* (2021) 8(1):e1248. doi: 10.1097/TXD.0000000000001248
71. Valentini N, Marchitto L, Raymond M, Goyette G, Kaufmann DE, Finzi A, et al. Innate immunity and SARS-CoV-2 vaccine response in hemodialysis patients. *Kidney360* (2022) 3(10):1763–8. doi: 10.34067/KID.0002542022
72. Mitchell LA, Henderson AJ, Dow SW. Suppression of vaccine immunity by inflammatory monocytes. *J Immunol* (2012) 189(12):5612–21. doi: 10.4049/jimmunol.1202151
73. Ai J, Guo J, Zhang H, Zhang Y, Yang H, Lin K, et al. Cellular basis of enhanced humoral immunity to SARS-CoV-2 upon homologous or heterologous booster vaccination analyzed by single-cell immune profiling. *Cell Discov* (2022) 8(1). doi: 10.1038/s41421-022-00480-5
74. Sans M, Figueiro G, Bonilla C, Bertoni B, Cappetta M, Artagaveytia N, et al. Ancestry genética y estratificación social en Montevideo, Uruguay. *Rev Argent Antropol Biológica* (2020) 23(1):029.

9. ANEXO II- OTROS DOCUMENTOS

1- Informe DLSP COVID-19 IgG ELISA UY



Ministerio
de Salud Pública

DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD
DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE LABORATORIO

Montevideo, 20 de julio de 2020

Ha sido evaluado el reactivo “COVID-19 IgG ELISA” para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra el virus SARS-COV-2 en suero o plasma humano, elaborado y representado por ATGen S.R.L.(Uruguay)

Características del Reactivo

Lote estudiado: 512028

Fecha de vencimiento: 07/2021

El reactivo fue sometido a control mediante el empleo de paneles de sueros (sueros de casos confirmados y de donantes sanos obtenidos en período pre-COVID 19).

RESULTADOS:

Los resultados se analizaron según intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la obtención de la muestra de sangre.

IgG	%SENSIBILIDAD (IC95%)	
0-7 días	< 80 %	NO CUMPLE
8-14 días	78.26 % IC95% :58.10%-90.34%	NO CUMPLE
>14 días	97,56% IC95% :87.40%-99.57%	CUMPLE

ESPECIFICIDAD: 90.91% (IC95%:72.18%-97.47%)

El reactivo CUMPLE con los requisitos de especificidad y, en cuanto a sensibilidad únicamente, con muestras de sueros obtenidas en el intervalo de tiempo mayor a los **14 días** de inicio de los síntomas

Q.F. Ma Teresa Pérez Amaral
Encargada Unidad Control de Calidad

Dra Ma Cristina Mogdasy
Directora Departamento de Laboratorios

Av. Alfredo Navarro 3051 Instituto de Higiene acceso norte. CP 11600 Telf. 1934 6240

email:consultasdlsp@msp.gub.uy

2- Informe DLSP COVID-19 IgG ELISA UY 2.0



Ministerio
de Salud Pública

DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD
DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

Montevideo, 05 de enero de 2021

Ha sido evaluado el reactivo “COVID-19 IgG ELISA UY 2.0” para la detección cualitativa de anticuerpos IgG, dirigidos contra el virus SARS-COV-2 en muestras clínicas de suero o plasma humano, elaborado y representado por **ATGen S.R.L.**(Uruguay)

Características del Reactivo

Lote estudiado: 922049 (Ref:9544)

Fecha de vencimiento: 01/12/2021

El reactivo fue sometido a control mediante el empleo de paneles de sueros (sueros de casos confirmados y de donantes sanos obtenidos en período pre-COVID 19).

RESULTADOS:

Los resultados se analizaron según intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la obtención de la muestra de sangre.

IgG	SENSIBILIDAD (IC95%)	
0-7 días	< 80 %	NO CUMPLE
8-14 días	94.12 % IC95% : 73.02%-98.95%	CUMPLE
>14 días	97,67% IC95% : 87.94%-99.59%	CUMPLE

ESPECIFICIDAD: 96.15% (87.02%-98.94%)

El reactivo **CUMPLE** con los requisitos de especificidad y, en cuanto a la sensibilidad únicamente con muestras de sueros obtenidas con posterioridad a los 8 días de inicio de los síntomas.


Q.F. Ma Teresa Pérez Amaral
Encargada Unidad Control de Calidad


Dra Ma Cristina Mógdasy
Directora Departamento de Laboratorios

Av. Alfredo Navarro 3051 Instituto de Higiene acceso norte. CP 11600 Telf.
1934 6240 email:consultasdlsp@msp.gub.uy



Ministerio
de Salud Pública

DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD
DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

NOTA: En el inserto que acompaña el kit, en el apartado “**X) ESQUEMA DEL ENSAYO**” en la columna “**Volumen**”, dónde dice 100ul diluyente + 10 ul muestra/**control**, debe decir : 100ul diluyente + 10 ul muestra, ya que los controles vienen prontos para usar, no deben diluirse. Se sugiere a su vez para evitar errores de interpretación del texto, afinar la redacción del punto “**4.**” del apartado “**IX) PROCEDIMIENTO**”.

Av. Alfredo Navarro 3051 Instituto de Higiene acceso norte. CP 11600 Telf.
1934 6240 email:consultasdlsp@msp.gub.uy

3- Informe DLSP COVID-19 IG QUANT ELISA



Dirección General de la Salud
Área de Vigilancia en Salud de la Población
División Epidemiología
Departamento de Laboratorios de Salud Pública

INFORME

Montevideo, junio 2021

Informe de la evaluación realizada al kit reactivo COVID-19 IgG QUANT ELISA (Instituto Pasteur de Montevideo, ATGen, Universidad de la República Uruguay)

Ha sido evaluado el reactivo COVID-19 IgG QUANT ELISA para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG, dirigidos contra el virus SARS-COV-2 en muestras clínicas de suero o plasma humano, elaborado y representado por ATGen S.R.L. (Uruguay)

Características del Reactivo

Lote estudiado: 292122

Fecha de vencimiento: 04/2022

El reactivo fue sometido a control mediante el empleo de paneles de sueros de títulos bajos medios y altos de convalecientes de infección por SARS CoV 2.

Se evaluó la precisión analítica intradía e interdía con material de control positivo (5 replicados).

Las muestras se procesaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los resultados se analizaron según intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la obtención de la muestra de sangre.

Sensibilidad:

8-14 días	96,97 % IC95% : 84,68%-99,46%
>14 días	100% IC95% :87,13%-100%

Av. Alfredo Navarro 3051 Instituto de Higiene (entrada Norte) - CP 11600
Tels. 1934* 6240 mail: consultasdlsp@misp.gub.uy
Montevideo-URUGUAY



Dirección General de la Salud
Área de Vigilancia en Salud de la Población
División Epidemiología
Departamento de Laboratorios de Salud Pública

Evaluación de la precisión analítica:

- Coeficiente de Variación intradía : 5,41%
- Coeficiente de variación interdía: 18 %.

Observaciones

En relación al inserto que acompaña al kit :

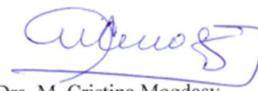
En el punto X : Interpretación de resultados, cuantitativo, no es clara la redacción del procedimiento a seguir cuando los valores obtenidos son inferiores al del calibrador con menor título.

En el punto XII: no se incluye las características del funcionamiento (cuantitativo)

Debido a que existen diferentes reactivos y plataformas para la cuantificación de anticuerpos anti SARS-CoV -2 se debería incorporar el aviso de que los valores de resultados obtenidos con distintos métodos pueden ser no comparables.



Dra. Rosario San Martín
Directora Adjunta



Dra. M. Cristina Mogdasy
Directora

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

El desarrollo de los ensayos serológicos COVID-19 IgG ELISA UY, COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 y COVID-19 IgG QUANT ELISA fue llevado adelante por el Grupo de Trabajo Interinstitucional integrado por 46 investigadores de la UdelaR y el IP Montevideo, en coordinación con la compañía ATGen. En el contexto de este trabajo participé en el diseño y conceptualización de experimentos, la ejecución de estos y el análisis de datos que llevó al desarrollo y validación de los ensayos COVID-19 IgG ELISA UY y COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, en conjunto con otros investigadores. A posteriori me encargué de la caracterización en profundidad del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0, su comparación con otros métodos serológicos comerciales y su adaptación para dar lugar a la versión cuantitativa del ensayo COVID-19 IgG ELISA UY 2.0. Este trabajo fue financiado por Focem (Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur) y la ANII.

En los trabajos: “Estudio de seroprevalencia contra el SARS-CoV-2 en personal de salud de Rivera” en su etapa de febrero 2021 y noviembre 2021 y “Estudio de seroprevalencia poblacional sobre COVID-19 y evaluación del impacto socio sanitario de las medidas de emergencia sanitaria”, preparé y codifiqué las muestras recibidas, realicé los ensayos de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y la cuantificación de los mismos en las muestras positivas cuando correspondía, elaboré tablas y gráficas de los resultados obtenidos asociadas a estos parámetros. El diseño del estudio, la logística de obtención y envío de muestras, y la asociación del resultado de presencia/ausencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 a características sociodemográficas fue realizado por otros integrantes del equipo. Estos trabajos fueron llevados adelante por investigadores de la UdelaR, el IP Montevideo, la UTEC de Rivera y el INE, en coordinación con el MSP.

Para la conformación de un banco de plasma convaleciente COVID-19 realicé los experimentos que llevaron a la adopción de un punto de corte que permitiera categorizar los plasmas en función del título de anticuerpos específicos. Me encargué del análisis de anticuerpos IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 de las muestras de suero de candidatos y donantes efectivos de plasma y del reporte de los resultados a los centros de donación de sangre. Las muestras fueron remitidas por parte del SNS y el Hemocentro

Maldonado, y participaron del grupo de trabajo integrantes de la UdelaR, el IP Montevideo, ASSE y el MSP.

El ensayo de activación de células NK dependiente de anticuerpos fue puesto a punto en colaboración con la Dra. Ana María Ferreira. En la Publicación 7 (Aldunate et al. 2023) determiné los niveles de anticuerpos específicos y la capacidad neutralizantes de los mismos a partir de las muestras de suero, y colaboré con la elaboración y revisión del manuscrito.

En el estudio “Análisis evolutivo de la seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el personal del Institut Pasteur de Montevideo”, participé de la logística de obtención de muestras, realicé la determinación de los niveles de anticuerpos anti-RBD en suero, y colaboré en el análisis y difusión de los datos obtenidos. Los responsables del proyecto se encargaron del manejo de los datos personales y la devolución individual del resultado a cada participante.

En la publicación 1 (Rammauro F, Carrión F et al. 2022) participé en el diseño experimental y colaboré con el procesamiento de las muestras de sangre de los participantes. Realicé los ensayos de ELISA y sVNT de todas las muestras, y puse a punto y realicé los ensayos con las líneas celulares reporteras de ADCP y ADCC. También participé en el análisis y la representación gráfica de los resultados obtenidos y en la redacción del manuscrito.

En las publicaciones 2, 3, 4 y 8 (Seija M, Rammauro F et al. 2021; Seija M, Rammauro F et al. 2022; Prieto J, Rammauro F et al. 2021 y Seija M, García-Luna J, Rammauro F et al. 2023) realicé la determinación de anticuerpos específicos anti-RBD mediante ELISA de todas las muestras de pacientes trasplantados y grupo control, y el análisis de los resultados obtenidos. Colaboré en el diseño experimental, la redacción del manuscrito y en la revisión de este. La recolección de muestras y la asociación de los resultados obtenidos de niveles de anticuerpos y tasas de seroconversión con parámetros clínicos fue realizada por otros autores.

Con respecto a los resultados de respuesta a la vacunación contra COVID-19 en pacientes en diálisis crónica, realicé la determinación de los niveles de anticuerpos

específicos anti-RBD en las muestras de suero de los pacientes y el análisis de estos resultados en función del esquema de vacunación utilizado. La recolección de muestras y recopilación de datos clínicos fue realizada por otros integrantes del equipo. Este trabajo fue realizado por integrantes de la UdelaR, el IP Montevideo, y los centros de diálisis del Hospital de Clínicas y el CASMU.

En la publicación 5 (Duhalde Vega M, Olivera D, Davanzo G et al 2022) realicé la determinación de anticuerpos específicos en las muestras de los pacientes y colaboré en la redacción del manuscrito.