

## EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES A LA VACUNA SPUTNIK V EN UNA COHORTE EN CORDOBA Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS NATURALES Y VACUNALES FRENTE A LA VARIANTE MANAOS.

### *Grupo de trabajo*

**Universidad Nacional de Córdoba: Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella” FCM/ CONICET**– Señor Decano Facultad de Ciencias Médicas Dr. Rogelio Pizzi, Dra. Sandra Gallego, Bioq. Sebastián Blanco, Dra. Brenda Konigheim, Dra. Lorena Spinsanti, Dr. Adrian Díaz, Bioq. Juan Aguilar, Dr. Mauricio Beranek, Dra. María Elisa Rivarola, Dra. Silvia Nates, Dra. Viviana Ré, Dra. Belén Pisano. **Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales** - Dr. Arnaldo Mangeaud.

**Hospital Rawson- Ministerio de Salud:** Med. Esp. Infect. Miguel Díaz, Bioq. Esp. Hematol. César Collino, Bioq. Aldo Barrera, Dra. Alejandra Álvarez, Dra. Lorena Ravera, Dra. Liliana Zappia, Bioq. Canela Brarda, Bioq. Josefina Eynard Asua, Dra. Claudia Toledo, Bioq. Carla Daniela Barrientos Alvarado, Bioq. Julia Sabbatini, Bioq. Laura Belén Coletti, Tec. Lab. Margarita Inés Cáceres.

**Ministerio de Salud de la Provincia Córdoba:** Ministro de Salud Dr. Diego Cardozo; Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud Bioq. Esp. Virol. María Gabriela Barbás, Epidemiología Mg. Laura López, Dra. Sandra Belfiore. **Laboratorio Central:** Bioq. Esp. Virol. Gonzalo Castro.

**Equipo asesor:** Dr. Rodolfo Rodriguez, Dr. Juan Pablo Caeiro, Dr. Hugo Pizzi

Se evaluó la respuesta de anticuerpos tipo IgG totales anti S y anticuerpos neutralizantes (AcNT) a la vacuna Sputnik V en 800 muestras tomadas a una cohorte de 285 personas en la ciudad de Córdoba. Las muestras fueron tomadas en tres momentos diferentes: una muestra basal previo a la colocación de la vacuna (en los casos en que fue posible), una muestra luego de la primera dosis de la vacuna (día 14) y una muestra luego de la segunda dosis correspondiente (día 42 desde la 1er dosis). El promedio de la edad de las personas que conforman la cohorte es de 39,24 ( $\pm 9,76$ ), con un mínimo de 20 años y un máximo de 65 años. El 26,67% de ellos (n=76) tuvieron exposición previa al virus SARS-CoV-2.

La determinación de anticuerpos tipo IgG contra la proteína S del virus se realizó mediante las técnicas COVIDAR IgG (Laboratorio Lemos S.R.L.) y SARS-CoV-2 IgG II Quant (Abbott). Las muestras que resultaron discordantes o negativas se evaluaron por inmunofluorescencia indirecta “in house” (IFI). La capacidad neutralizante de los

anticuerpos en las muestras de las personas vacunadas se evaluó por una técnica de Neutralización por reducción de placas (TNRP) frente al virus salvaje SARS-CoV-2 (hCoV-19/Argentina/PAIS-G0001/2020, GISAID ID: EPI\_ISL\_499083) utilizando células Vero CI76 (ATCC CRL-587). Los anticuerpos neutralizantes fueron titulados, estableciéndose como el título a la máxima dilución del plasma con capacidad de neutralizar al menos el 80% de las Unidades Formadoras de Placa (UFP) inoculadas, como previamente ha sido descripto (Blanco y col., 2021)

Los resultados se describen en tablas y gráficos con frecuencias absolutas y porcentajes. Para probar asociaciones se realizaron pruebas Chi cuadrado de independencia (con corrección de Montecarlo). El análisis de la variación de los AcNT en el tiempo se realizó con Test de Wilcoxon (apareado) y Test de Friedman. Se utilizaron los soft R-Medic (Mangeaud y col., 2018) e InfoStat (Di Rienzo y col., 2020) y en todos los casos el nivel de significación fue del 5%.

Los resultados de la detección de anticuerpos tipo IgG contra SARS-CoV-2 en las muestras basales previas a la vacunación, a los 14 días (1er dosis), y 42 días (2da dosis) de la vacuna **SPUTNIK V** se muestran en la tabla 1.

Anticuerpos	MUESTRA basal		DÍA 14		DÍA 42	
	N	%	N	%	N	%
Negativo	183	74,69	39	14,5	1	0,35
Positivo	62	25,31	230	85,5	284	99,65
NR	40	-	16	-	0	-
TOTAL	245		269		285	

Tabla 1. Detección de anticuerpos tipo IgG contra SARS-CoV-2 en la muestra basal, a los 14 y 42 días luego de la primera dosis de la vacuna. NR= No Realizado. TOTAL= indica número de muestras procesadas en cada tiempo.

La presencia y el título de los anticuerpos con propiedades neutralizantes para el virus en los mismos tiempos (muestra basal, 14 días y 42 días) se muestran en la figura 1.

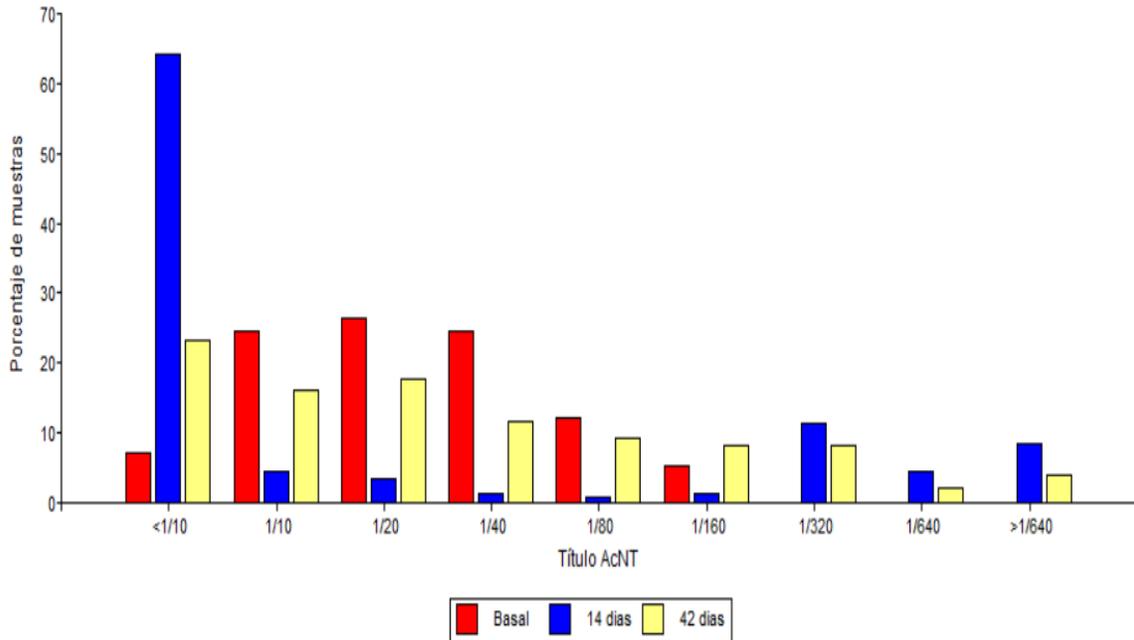


Figura 1. Distribución de los títulos de AcNT contra el virus en las muestras: basal, 14 días (1er dosis) y 42 días (2da dosis) de la vacuna.

Se analizó la cohorte de personas vacunadas diferenciando los que habían tenido infección confirmada por SARS-CoV-2 previo a la vacunación, de quienes no la habían tenido, obteniéndose los siguientes resultados:

De los 76 individuos con infección previa a la vacunación, 68 fueron evaluados para anticuerpos anti-SARS-CoV-2, resultando positivos el 91,2% (62/68) de ellos. 57 de estas muestras fueron estudiadas por TNRP, detectándose AcNT en el 93% (53/57) (Mediana 1/20 (Q1: 1/10; Q3: 1/40; Moda 1/20). Respecto de la detección de anticuerpos tipo IgG totales a los 14 días luego de la primera dosis de la vacuna se observaron diferencias significativas entre los vacunados con infección previa y los que solo recibieron la vacuna ( $p < 0,001$ ), mientras que a los 42 días no hubo diferencias significativas entre ambos grupos ( $p = 0,546$ ). El análisis de las frecuencias de los títulos AcNT en las personas que habían tenido infección previa comparado con los que no estuvieron expuestos previo a la vacunación, mostró diferencias significativas tanto a los 14 días ( $\text{Chi}^2: 203.72; p < 0,001$ ) como a los 42 días ( $\text{Chi}^2: 190,47; p < 0,001$ ). Así, a los 14 días la mayor parte de los no expuestos (88,61%) no tenían anticuerpos neutralizantes luego de recibir la primera dosis de la vacuna, mientras que de las personas con infección previa sólo el 8,70% eran negativos luego de la primera dosis.

Además, a los 42 días en ambos grupos se reducen los negativos a un 30,43% y 2,63% respectivamente.

El título de los AcNT se incrementa significativamente del día 14 al día 42 post vacunación para las personas solo vacunadas y sin infección previa ( $p < 0,001$ ), mientras que la Mediana a los 14 días es de  $< 1/10$ ; a los 42 días la Mediana es  $1/10$ .

Sin embargo, en el grupo de personas con infección previa, el máximo valor se obtiene a los 14 días post vacunación. La Mediana basal es de  $1/20$ , a los 14 días presenta una Mediana de  $1/320$  y a los 42 días la Mediana desciende a  $1/160$ ; siendo estas diferencias todas significativas ( $p < 0,001$ ). Figura 2.



Figura 2. Distribución de las frecuencias de los títulos de AcNT en las personas vacunadas con infección previa y sin exposición previa al virus. Cohorte de 285 personas vacunadas.

Los resultados muestran una buena respuesta en la producción de anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 en la cohorte de 285 personas inmunizadas con la vacuna Sputnik V. Si bien el 91,2% de los individuos que había tenido exposición previa al virus tenía anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en la muestra basal (62/285), aquí se evidencia que al día 14, luego de la primera dosis de la vacuna, el 85,5% de la cohorte tenía anticuerpos contra el virus y al día 42, luego de recibir la segunda dosis, el 99,65% tenía anticuerpos, resultando negativo solo

un individuo. Estos resultados son concordantes con los obtenidos y comunicados en dos informes previos de personas vacunadas en Córdoba y Buenos Aires.

Los resultados demuestran la importancia de administrar la segunda dosis de la vacuna a quienes no han tenido exposición previa al virus, ya que no solo la proporción de individuos con anticuerpos IgG totales anti S es mayor, sino que también el título de AcNT se incrementa significativamente en este grupo al día 42 post vacunación. Al día 14 la mayoría de las personas de este grupo (88,61%) no tenían anticuerpos neutralizantes y luego de recibir la segunda dosis la situación se invierte, si bien, un 30,43% permanece sin anticuerpos neutralizantes detectables. En contraste con esto, en el grupo de individuos con infección previa a la vacunación se observó que los mayores títulos de AcNT se obtienen luego de la primera dosis de la vacuna (día 14) y luego decaen pese a recibir la segunda dosis. Esto último, corrobora que la segunda dosis de la vacuna en este grupo sería prescindible desde el punto de vista de la respuesta humoral, y específicamente, para la producción de anticuerpos con propiedades neutralizantes frente al virus.

#### **Evaluación de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes frente a la variante Manaus**

Con el objetivo de determinar la capacidad neutralizante frente a la variante Manaus (linaje P.1) de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V, se evaluaron muestras de plasma correspondientes a 157 personas correspondientes a las siguientes categorías:

Grupo 1- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 (N=44);  
Grupo 2- Individuos recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 que recibieron 1 dosis de la vacuna Sputnik V (N= 30); Grupo 3- Individuos recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 que recibieron 2 dosis de la vacuna Sputnik V (N= 37); Grupo 4- Individuos vacunados con 1 dosis de Sputnik V (N=10) sin exposición previa al virus; Grupo 5- Individuos vacunados con 2 dosis de Sputnik V (N=36) sin exposición previa al virus.

Los ensayos para la determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos en las muestras de plasma mencionadas frente a la variante Manaus se realizaron mediante una

técnica de Neutralización por reducción de placas (TNRP) frente al virus salvaje SARS-CoV-2 linaje P.1 (hCoV19/Argentina/PAIS-G0234/2021, GSAID ID: EPI\_ISL\_2037442), aislado recientemente en el Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, FCM, UNC, Córdoba. Se utilizaron células Vero CI76 (ATCC CRL-587). Los anticuerpos neutralizantes fueron titulados, estableciéndose como el título a la máxima dilución del plasma con capacidad de neutralizar al menos el 80% de las UFP inoculadas como ya fue descrito (Blanco y col., 2021). En paralelo, se ensayaron las propiedades neutralizantes de la muestras frente a la cepa wild type linaje B.1 (hCoV-19/Argentina/PAIS-G0001/2020, GISAID, ID: EPI\_ISL\_499083) como se describió anteriormente.

Con el objetivo de comparar los títulos de AcNT frente a ambas variantes virales se realizaron gráficos y Test de los signos de Wilcoxon. Se utilizó el soft InfoStat y el nivel de significación fue del 5%. Para comparar la capacidad neutralizante de los anticuerpos frente a la variante Manaos entre los diferentes grupos, se realizó la prueba de Kruskal Wallis.

En todas las categorías evaluadas se observó neutralización de la variante P.1, aunque algunas muestras con anticuerpos neutralizantes contra la cepa wild type B.1 fueron negativas al enfrentarlas a la variante Manaos. Además, si consideramos todas las muestras en su conjunto, se observó una mayor capacidad neutralizante frente a la cepa wild type que frente a la P.1, diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Así, si bien ambas Medianas del título de AcNT son iguales (1/80), el cuartilo 1 es 1/40 y 1/20 para las variantes wild type B.1 y Manaos, respectivamente.

<b>Variantes virales</b>	<b>Min</b>	<b>Q 1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q 3</b>	<b>Max</b>	<b>Valor p</b>
<b>Wild type linaje B.1</b>	1/10*	1/40	1/80	1/320	>1/640	<b>&lt;0.001</b>
<b>Manaos linaje P.1</b>	<1/10	1/20	1/80	1/320	>1/640	

Tabla 2. Comparación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos frente a las cepas wild type linaje B.1 y Manaos P.1. \*Título de AcNT.

Cuando se analizaron las muestras por categoría, se observó que los anticuerpos mostraron una capacidad neutralizante significativamente mayor frente a la variante wild type que frente a la Manaus en los grupos de personas recuperadas de infección natural por SARS-CoV-2 cepa pandémica ( $p=0.0112$ ) y en las personas que habían sido vacunadas con dos dosis pero no tenían exposición previa al virus ( $p<0.001$ ), no observándose diferencias para las demás categorías (Tabla 3, Figura 3).

<b>Categorías</b>	<b>Variantes virales</b>	<b>Mín</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máx</b>	<b>Valor p</b>
<b>Recuperados de infección (B.1)</b>	<i>Wild type</i>	1/10*	1/40	1/80	1/160	1/640	<b>0,0112</b>
	<i>Manaos</i>	<1/10	1/20	1/40	1/160	>1/640	
<b>Recuperados de infección (B.1) + 1 dosis de vacuna</b>	<i>Wild type</i>	1/40	1/320	1/320	>1/640	>1/640	0,37
	<i>Manaos</i>	1/40	1/160	1/320	1/640	1/640	
<b>Recuperados de infección (B.1) + 2 dosis de vacuna</b>	<i>Wild type</i>	1/10	1/160	1/160	1/320	>1/640	0,3062
	<i>Manaos</i>	1/40	1/160	1/320	1/640	>1/640	
<b>Vacunados 1 dosis sin exposición</b>	<i>Wild type</i>	1/10	1/10	1/20	1/40	1/40	0,169
	<i>Manaos</i>	<1/10	<1/10	1/10	1/40	1/40	
<b>Vacunados 2 dosis sin exposición</b>	<i>Wild type</i>	1/10	1/20	1/40	1/80	1/320	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Manaos</i>	<1/10	1/10	1/20	1/40	1/320	

Tabla 3. Comparación de la capacidad neutralizante frente a la variante Manaus linaje P.1 y a la variante wild type B.1 de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V. \*Título de AcNT.

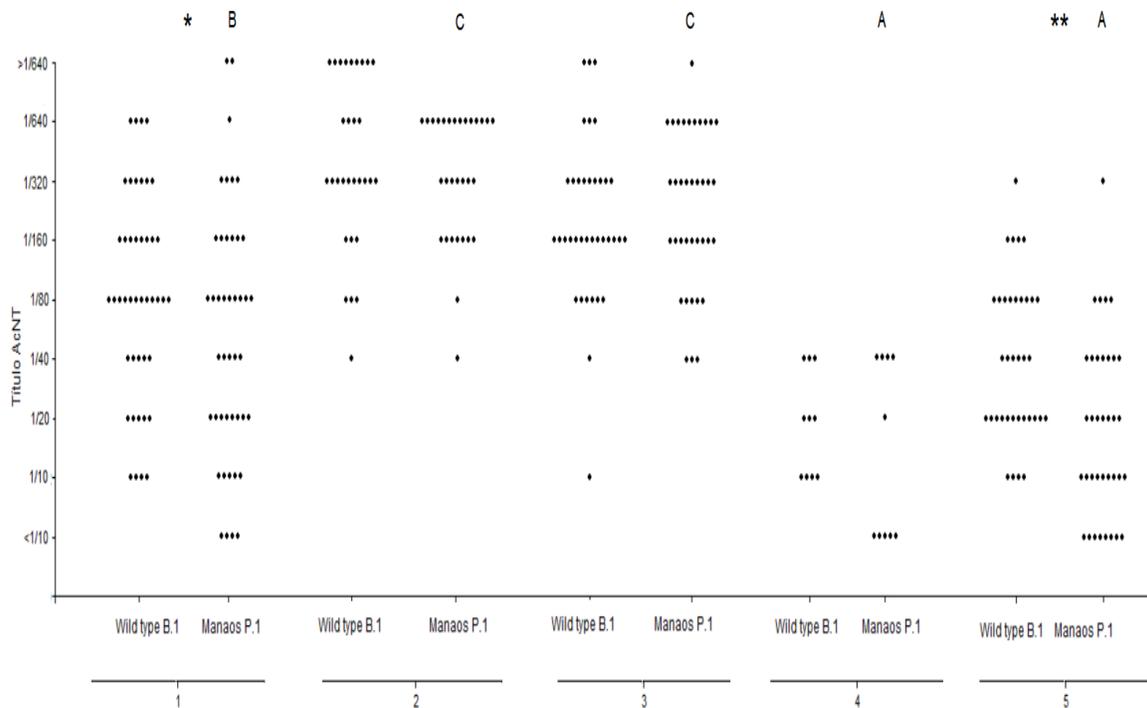


Figura 3. Comparación de la capacidad neutralizante frente a la variante Manaos linaje P.1 y a la variante wild type B.1 de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V. Grupo 1- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 (N=44); Grupo 2- Individuos recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 que recibieron 1 dosis de la vacuna Sputnik V (N= 30); Grupo 3- Individuos recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 que recibieron 2 dosis de la vacuna Sputnik V (N= 37); Grupo 4- Individuos vacunados con 1 dosis de Sputnik V (N=10) y sin exposición previa; Grupo 5- Individuos vacunados con 2 dosis de Sputnik V y sin exposición previa (N=36). Las letras diferentes representan diferencias significativas <0,0001 entre los grupos para neutralizar a la variante Manaos. Los asteriscos muestran los grupos en los cuales hay diferencias significativas para neutralizar la cepa wild type versus la Manaos \*<0,05; \*\*<0,01.

Cuando se hace el análisis reagrupando las categorías en 3:

1- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1; 2- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 y haber recibido una o dos dosis de la vacuna Sputnik V; y 3- Haber sido vacunado con una o dos dosis de la vacuna Sputnik V y no tener exposición previa al virus. Se observó una capacidad neutralizante significativamente mayor frente a la cepa B.1 para los grupos de individuos recuperados de la infección por el virus wild type y para el grupo de individuos vacunados sin exposición previa al virus, no habiendo diferencias en el grupo de individuos vacunados previamente expuestos (Tabla 4, Figura 4).

Categorías	Variantes virales	Mín	Q1	Mediana	Q3	Máx	Valor p
Recuperados de infección (B.1)	<i>Wild type</i>	1/10*	1/40	1/80	1/160	1/640	<b>0,0112</b>
	<i>Manaos</i>	<1/10	1/20	1/40	1/160	>1/640	
Recuperados de infección (B.1) + 1 o 2 dosis de vacuna	<i>Wild type</i>	1/10	1/160	1/320	1/640	>1/640	0,5587
	<i>Manaos</i>	1/40	1/160	1/320	1/640	>1/640	
Vacunados con 1 o 2 dosis y sin exposición previa.	<i>Wild type</i>	1/10	1/20	1/20	1/80	1/320	<b>0,0004</b>
	<i>Manaos</i>	<1/10	<1/10	1/20	1/40	1/320	

Tabla 4. Comparación de la capacidad neutralizante frente a la variante Manaos linaje P.1 y a la variante wild type B.1 de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V. \*Título de AcNT.

Al comparar la capacidad de los anticuerpos presentes en cada grupo para neutralizar a la variante Manaos, se observó que no hay diferencias entre haber sido vacunado con una dosis o dos dosis de la vacuna en personas sin exposición previa al virus, ni entre las condiciones de haber tenido exposición previa y haber sido vacunado luego con una dosis o con dos dosis de la vacuna. Si bien, sí hay diferencias significativas en la capacidad neutralizante de los anticuerpos al comparar las categorías anteriores mencionadas con la condición de ser un recuperado de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 (Figura 3).

Al realizar el análisis reagrupando, se observó que hay diferencias significativas en la capacidad de los anticuerpos presentes en cada grupo para neutralizar a la variante Manaos, entre las tres categorías: 1- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1; 2- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1

y haber recibido una o dos dosis de la vacuna Sputnik V; y 3- Haber sido vacunado con una o dos dosis de la vacuna Sputnik V y no tener exposición previa al virus.

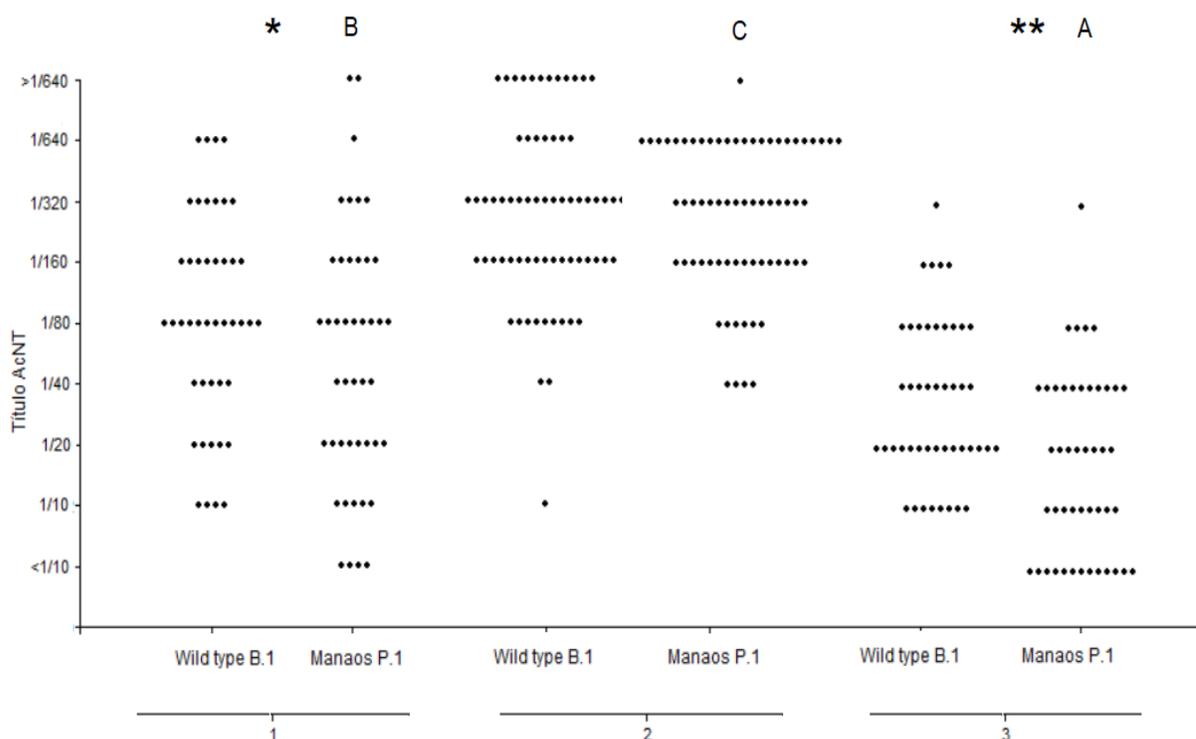


Figura 4. Comparación de la capacidad neutralizante frente a la variante Manaos linaje P.1 y a la variante wild type B.1 de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V. Grupo 1- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1; Grupo 2- Recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 y haber recibido una o dos dosis de la vacuna Sputnik V; y Grupo 3- Haber sido vacunado con una o dos dosis de la vacuna Sputnik V y no tener exposición previa al virus. Las letras diferentes representan diferencias significativas <0,0001 entre los grupos para neutralizar a la variante Manaos. Los asteriscos muestran los grupos en los cuales hay diferencias significativas para neutralizar la cepa wild type versus la Manaos \*<0,05; \*\*<0,01.

### Principales conclusiones

Los resultados muestran una **buena respuesta en la producción de anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 en la cohorte de 285 personas inmunizadas con la vacuna Sputnik V**. Se evidencia que al día 14, luego de la primera dosis de la vacuna, el 85,5% de la cohorte tenía anticuerpos contra el virus y al día 42, luego de recibir la segunda dosis, el 99,65% tenía

anticuerpos, resultando negativo solo un individuo (*teniendo en cuenta que de la cohorte 76 personas vacunadas habían tenido una infección previa a la vacunación y que al menos el 91,2% de ellas tenía anticuerpos previos a la vacunación*). Los resultados demuestran la importancia de administrar la segunda dosis de la vacuna a quienes no han tenido exposición previa al virus, ya que no solo la proporción de individuos con anticuerpos IgG totales anti S es mayor, sino que también el título de anticuerpos neutralizantes (AcNT) se incrementa significativamente en este grupo al día 42 post vacunación. Contrario a esto, en el grupo de **individuos con infección previa** a la vacunación se observó que los mayores títulos de AcNT se obtienen luego de la primera dosis de la vacuna (día 14) y luego decaen, **demostrando que la segunda dosis de la vacuna en este grupo sería prescindible desde el punto de vista de la respuesta humoral, y específicamente, para la producción de anticuerpos con propiedades neutralizantes frente al virus.**

Con el objetivo de determinar la capacidad neutralizante frente a la variante Manaos (linaje P.1) de los anticuerpos generados como resultado de infecciones naturales por el virus SARS-CoV-2 cepa wild type pandémica y de los anticuerpos vacunales generados luego de la inmunización con la vacuna Sputnik V, se evaluaron muestras de plasma correspondientes a 157 personas (entre las cuales hay muestras de individuos recuperados de infección natural por SARS-CoV-2 cepa wild type B.1 y de personas vacunadas con Sputnik V que tenían o no exposición previa al virus). **En todas las categorías evaluadas se observó neutralización de la variante Manaos**, aunque algunas muestras con anticuerpos neutralizantes contra la cepa wild type B.1 fueron negativas al enfrentarlas a la variante Manaos. se observó que los anticuerpos mostraron una capacidad neutralizante significativamente mayor frente a la variante wild type que frente a la Manaos en los grupos de personas recuperadas de infección natural por SARS-CoV-2 cepa pandémica ( $p=0.0112$ ) y en las personas que habían sido vacunadas con dos dosis pero no tenían exposición previa al virus ( $p<0.001$ ).

## Referencias

- Sebastián Blanco, Juan Javier Aguilar, Brenda Salomé Konigheim, Luis Adrian Diaz, Lorena Spinsanti, Mauricio Beranek, César Collino, Lab Central Córdoba working group, Miguel Diaz, María Gabriela Barbás, Sandra Verónica Gallego. The extent of infectious SARS-CoV-2 shedding in an Argentinean cohort. *Journal of Public Health* 2021 | pp. 1–5 | doi:10.1093/pubmed/fdab145.
- Mangeaud, A. & D. Elías Panigo. 2018. R-Medic. Un programa de análisis estadísticos sencillo e intuitivo. *Revista Methodo* 3 (1) 18-22. URL <http://www.r-medic.com>
- Di Rienzo, J.A.; F. Casanoves; M. G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada; C. W. Robledo *InfoStat* versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>