

**JORNADA DEPARTAMENTO DE APS. Fundación Barceló. Director Mitelman, J.**

## **VIROLOGIA- COVID-2 : UNA MIRADA DESDE EL LABORATORIO**

**Carrera de Análisis Clínicos. Brich T, Camilletti M., Simes, L.**

### **1) ROL DEL LABORATORIO DURANTE LA PANDEMIA SARS COV-2.**

**DRA TELMA BRICH**

Profesora de Analítica y Post Analítica

Carrera de Análisis Clínicos .

Bioquímica del Hospital Tornú

La situación epidemiológica del Hospital Tornú es comparable a la de CABA en general, ya que la proporción de pruebas de rtPCR Covid 19 positivas respecto a los casos testeados es similar: 39%.

El laboratorio ha desarrollado un rol importante durante este lapso ya que hasta fines de setiembre/2020 se han procesado 9700 muestras de PCR para Covid con un máximo mensual en julio de 2700. Estas muestras se originan en diferentes puntos: pacientes identificados por el "Plan detectar" en el Playón Chacarita (área programática), pacientes que ingresan a la UFU sintomáticos, y personal del hospital testeado con prueba rápida positiva para Covid-19.

Esta situación ha impactado notablemente en la reingeniería de los procesos de laboratorio desde la modificación de los circuitos de trabajo, redistribución y entrenamiento del recurso humano en diferentes áreas y disponibilidad de personal bioquímico y técnico 24 hs los 7 días de la semana.

Un gran desafío ha sido la validación de las pruebas de laboratorio disponibles en el mercado, con la finalidad de establecer la sensibilidad diagnóstica y la concordancia entre resultados.

Se tomaron diferentes estrategias de trabajo, en cuanto a las pruebas diagnósticas:

Pruebas de screening: Test rápidos para detección de anticuerpos IGG e IGM, prueba inmunocromatográfica, por punción digital, y demora de 10 minutos. Hasta el momento se realizaron 9730 tests al personal del hospital lo que permitió detectar sospechosos para confirmación y aislamiento. Estos tests tienen alto poder predictivo positivo (VPP), y la concordancia que se encontró entre test rápido/ PCR fue del 10%.

Pruebas confirmatorias de anticuerpos: Se pusieron en marcha ensayos realizados por ELISA y ECLIA. Estas pruebas permiten, además, la cuantificación de anticuerpos para evaluación los posibles donantes de plasma.

Prueba rtPCR para antígeno viral: El ensayo es RTPCR Real time, primers para Ag N1 N2 con extracción automática, nos permite entregar resultados entre 3 y 4 horas.

Otra instancia para considerar ha sido el seguimiento del paciente Covid crítico en la UTI. El perfil de los pedidos de laboratorio cambió notablemente, incrementándose la solicitud de marcadores de daño de miocardio (Tns ), Dímero D y Ferritina entre un 100 y 500%, lo que provocó demora en las respuestas, en algunos casos por falta de insumos por colapso en la producción de reactivos a nivel mundial.

## **2) EXPERIENCIA EN PROGRAMA DE VOLUNTARIADO: DIAGNÓSTICO DE SARS-COV 2 POR NEOKIT (CONICET-CASSARA)**

DRA. MARIA ANDREA CAMILLETTI

Prof. Titular de Microbiología-Immunología.  
Carrera de Análisis Clínicos

El programa de voluntariado para el diagnóstico de SARS-COV 2 surgió como una iniciativa del sector científico para asistir al personal de salud en el procesamiento de muestras de pacientes con sospecha de COVID19 en hospitales y centros públicos distribuidos en el país. En particular, la experiencia en el laboratorio de análisis clínicos en el Hospital Petrona V. de Cordero de San Fernando consistió en la detección del virus de forma directa mediante la extracción de ARN viral de las muestras de hisopados. Esto fue realizado, en primer lugar, a partir de la extracción del ARN viral con columnas utilizando Kits comerciales con una capacidad de procesamiento de alrededor de 30-40 muestras por jornada. Una vez obtenido el ARN de cada muestra, las determinaciones se realizaron con el NeoKit, un test desarrollado por científicos/as pertenecientes al Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein (CONICET) y de la Fundación Pablo Cassará. Dicho test permite la detección molecular rápida del virus SARS-COV 2 a partir de una retrotranscripción del ARN viral y una posterior amplificación isotérmica en un único paso a temperatura constante (1h a 64°C), observable a través del cambio de color por el viraje del azul de hidroxinaftol (del violeta al azul) cuando la reacción de amplificación es positiva.

## **3) EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO en ATENCIÓN PRIMARIA DE LA SALUD**

Bq. LUIS SIMES

Director de Carrera de Análisis Clínicos  
Corrección: Tc. Aldana Simes

*¿Por qué el conocimiento y la difusión de estas novedades de las ciencias básicas son de importancia para la APS?*

*Porque ese conocimiento básico se traducirá y empleará en las ciencias aplicadas. De ello provendrán planes de prevención, diagnóstico y tratamiento que van a desenvolver un rol manifiesto en la Salud Pública.*

En la historia de las ciencias, el diagnóstico -al igual que el tratamiento viral,-resultaron evasivos al conocimiento científico. Las vacunas fueron la principal respuesta, constituyendo el muro esencial de la prevención. La implementación de la técnica de Kary Mullis en 1985 - Polymerase Chain Reaction (PCR)- revolucionó al mundo, mas allá de los límites de la ciencia contribuyendo entre otros aspectos, con el diagnóstico y la prevención de patologías infecciosas, a través de la identificación directa de los agentes causales, aunque se hallaren en exiguas concentraciones.

El sistema inmunitario, mediante los procesos de memoria, queda convenientemente preparado para reaccionar mas eficazmente ante el reingreso de los mismos antígenos. Las inmunoglobulinas (principalmente M, G y A) se unen al determinante antigénico (motivo o

secuencia estructural característica de una región del Antígeno) denominadas *Epitopes*<sup>1</sup>. La región del Anticuerpo que se une al Epitope, que bloquea la unión al receptor, y por ende la acción infecciosa, se denomina *Paratope*. Las pruebas de inmunodifusión, inmunocromatografía, inmunoelectroforesis, inmunoprecipitación, ELISA y otras conforman una batería para la identificación y cuantificación de anticuerpos (inmunoglobulinas), actores principales de la inmunidad adaptativa humoral. Las mismas son aplicadas metodológicamente y caracterizadas en sus paratopes.

La revolución tecnológica, continuamente contribuye con nuevas herramientas diagnósticas. Entre las más novedosas, se encuentra VirScan, cuyo fundamento abordaremos parcialmente en esta jornada .

#### La tecnología VirScan.

La implementación de un método capaz de detectar individuos portadoras constituyó un paso gigantesco en la caracterización epidemiológica de microorganismos patógenos<sup>2</sup>, con sus consecuentes preeminencias.

La introducción en el año 2015 de la técnica Vir-Scan<sup>3</sup> abrió un terreno sorprendente: La determinación e identificaciones de variantes antigénicas identificatorias de alrededor de 400 virus en una sola prueba. Mediante esta herramienta (en un momento donde estamos atrapados entre los hisopados y la búsqueda de Acs. específicos), VirScan es competente para informar en una única muestra sanguínea, la presencia de secuencias variantes de virus conocidos<sup>4</sup>, o por conocer<sup>5</sup>. Nótese que en 2015, el SARS- Cov-2 no se había conocido aún.

Virus Scan es un aplicativo programable que combina inmunoprecipitación en fagos y secuenciación de anticuerpos.(Programmable phage-display) . Combina la síntesis de microarrays y visualización de bacteriófagos para crear una representación sintética uniforme de los Epitopes de péptidos que comprenden el viroma humano. La inmunoprecipitación y la secuenciación de ADN de alto rendimiento revelan los péptidos reconocidos por los anticuerpos en la muestra. El color de cada mapa múltiple en sus pocillos de reacción representa la secuencia de Epitopes vinculantes.

Esta composición, en lo que a virus se refiere, es conocida como viroma.

Una de las primeras investigaciones realizadas mediante Virus-Scan<sup>6</sup> incluyó 569 individuos adultos de USA, Tailandia, Sudáfrica y Perú, siendo encontrados 206 Epitopes, cuyo particular agrupamiento es capaz de identificar a más de mil cepas virales. El control de la técnica se realizó contra el historial de infecciones de los participantes en el estudio.

Cuando la muestra sanguínea del paciente se expone a una superficie que tiene fijados bacteriófagos con las variantes virales conocidas , los anticuerpos que se corresponden con el antígeno específico se fijan siendo entonces visualizados por la técnica.

Una lectura de los resultados de diversas investigaciones muestran que los anticuerpos más frecuentes son los correspondientes a cuadros de resfríos, mononucleosis y los productos de las vacunas obligatorias.

---

<sup>1</sup> También se encuentran nominados como Epitopos o Epítopos.

<sup>2</sup> Si bien la técnica puede aplicarse a otros usos, en el presente artículo, en razón del contexto, mundial, se enfocará en el diagnóstico virológico.

<sup>3</sup> Hospital Brigham y de Mujeres y la Universidad de Harvard (EEUU),

<sup>4</sup> George J. Xu<sup>1,2,3,4,\*</sup>, et. Al Science 05 Jun 2015:Vol. 348, Issue 6239, aaa0698; DOI: 10.1126/science.aaa0698

<sup>5</sup> A medida de que aparezcan nuevos patógenos, se podrán ir incorporando sus perfiles antigénicos al estudio.

<sup>6</sup> Science, Sarah C. P. Williams | Jun 4th, 2015. DOI: 10.1126/science.aac6790

## VirScan y COVID-19

En su edición del 29 de Septiembre, la revista *Science* publicó el artículo *Viral Epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity*<sup>7</sup>

El objetivo de la investigación fue determinar el tipo y características de las respuestas humorales al SARS-CoV-2 mediante Vir-Scan.

El estudio incluyó a 232 pacientes con COVID-19 y 190 como controles correspondientes al perfil serológico previas a la aparición del SARS-CoV-2.

### Escaneo sistemático de epítomos virales.

A través del estudio fueron identificados más de 800 Epitopes en el proteoma del SARS-CoV-2. De ellos, 10 determinantes antigénicos parecían corresponder a 10 Epitopes complementarios de Acs. neutralizantes. Los principales correspondían a la espiga y a la nucleoproteína.

En cambio, los sueros controles, previos a la aparición del CoV-2 reconocieron la secuencia del ORF-1<sup>8</sup> (para alfa-coronavirus -HCoV-229E y HCoV-NL63- y beta-coronavirus -HCoV-OC43 y HCoV-HKU-, incluyendo SARSCoV y MERS-CoV).

El empleo de la técnica Luminex<sup>9</sup> es útil desde la perspectiva de agilizar los estudios, en razón de su capacidad para determinar 100 ensayos simultáneamente.

Un diagnóstico sérico mediante Luminex<sup>10</sup> mostró que los individuos con COVID-19 más graves exhibieron respuestas serológicas más fuertes y más amplias, mientras que la cohorte control tuvo reacciones más débiles con una mayor presencia de identificación CMV y HSV-1<sup>11</sup>.

Por otra parte, en los pacientes hospitalizados se observó que los hombres producen mayores respuestas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 que las mujeres.

### Desarrollo de una biblioteca VirScan dirigida a la identificación de Coronavirus.

La plataforma utilizada se diseñó con fagos de una biblioteca de oligonucleótidos codificantes capaces de identificar los marcadores de más de 400 virus que afectan al ser humano.

Se utilizaron 3 sub-bibliotecas para Virus-Scan.

- 1: Péptidos de 56 unidades en mosaicos de 28 aminoácidos expresados por los seis HCoV y tres coronavirus de murciélago estrechamente relacionados con el SARS-CoV-2;
- 2: Péptidos de 20 aa. en mosaico de 5 unidades orientada a localizar Epitopes.
- 3: Triple alanina mutantes de los péptidos 56-mer en mosaico para el mapeo aminoacídico de los límites del epítomo.

Las determinaciones sobre 550 individuos, cumplieron los siguientes pautas:

- a. Muestras longitudinales de los participantes divididos en 9 cohortes, según origen geográfico

---

<sup>7</sup> El perfil viral de Epitopes de pacientes con COVID-19, demuestra reactividad cruzada y correlación con la gravedad

<sup>8</sup> Open Reading Frame 1.

<sup>9</sup> Dunbar SA. 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* 363:71–82

<sup>10</sup> La interacción producida se evidencia por un código de colores al incidir un laser doble que produce fluorescencia.

<sup>11</sup> Un estudio comparativo entre Luminex y Real Time- PCR, puede encontrarse en Munro, S. B., Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2013). Comparison of a multiplex real-time PCR assay with a multiplex Luminex assay for influenza virus detection. *Journal of clinical microbiology*, 51(4), 1124–1129. <https://doi.org/10.1128/JCM.03113-12>

- b. Transversales en individuos SARS-CoV-2 positivos, con tratamiento hospitalario o ambulatorio, y convalecientes.
- c. En las muestras se evaluaron 12 péptidos altamente indicativos del historial de exposición al SARS-CoV-2 y
- d. Para los controles positivos se eligieron dos péptidos de control positivo de Rhinovirus A y virus Epstein-Barr (VEB) que se reconocieron en más del 80% de los seropositivos y
- e. Como control negativo un péptido del VIH-1.

Este trabajo encontró la extraordinaria cantidad de ~100 millones de interacciones potenciales Péptido-Anticuerpo.

En cuanto a las variables, se comparó la seropositividad para SARS-CoV-2 frente a muestras control de la era anterior al COVID-19.

Esto permitió:

1. Identificar péptidos de SARS-CoV-2 que codifican a) Epitopes y b) péptidos de SARS-CoV-2
2. Conocer la codificación de Epitopes que presentan reactividad cruzada con anticuerpos respondedores a los VHC del resfriado común, resultado esperable en razón de la distribución del patógeno causante de una alta exposición poblacional.
3. Evaluar la potencia de reactividad, que evidenció la mayor intensidad correspondiente al SARSCoV-2 en comparación con los controles de la era anterior al COVID-19.
4. Determinar reactividades cruzadas que fueron observadas:
  - a. Con otros HCoV altamente patógenos,
  - b. Con SARS-CoV y
  - c. Y mucho más estructuralmente con MERS-CoV. Además
  - d. Contra péptidos derivados de los tres coronavirus de murciélago.
5. Mostrar una mayor reactividad a los péptidos de HCoV estacionales en comparación con los controles y así evidenciar la
6. Reactividad cruzada por memoria inmunológica de los Linfocitos B.

El análisis de las proteínas del SARS-CoV-2 a las que se dirigen los anticuerpos del paciente COVID-19 reveló que las respuestas primarias al SARSCoV-2 son más reactivas PARA

1. Péptidos derivados del pico (S) y
2. Nucleoproteínas (N). Estas dos proteínas exhiben un comportamiento diferencial significativo respecto de los controles.
3. La tercera estructura más frecuente es la poliproteína replicasa ORF1, aunque de grado inferior a los anteriores. Esto sugeriría otras reacciones cruzadas con antígenos previos a la era Covid-19, con una respuesta menor.
4. La respuesta inmune inicial no mostró preferencia por S o N.
5. Los anticuerpos que reconocen los Epitopes ORF1 del SARS-CoV-2 no se elevan con el tiempo, lo que permite asumir su preexistencia y similitud antigénica. Muchos anticuerpos fueron reconocidos a nivel poblacional solo como IgG, otros sólo como IgA o ambos (IgG como IgA) simultáneamente en un mismo paciente: Aunque se generen reacciones diferentes, parece que las regiones objetivo se comparten. Esto sugiere que un clon de IgM respectivo a menudo evoluciona hacia un anticuerpo IgG o IgA según sean las señales involucradas. En un mismo individuo la respuesta a un epítipo dado puede ser monoclonal.

Además fue hallado un grupo de mutaciones:

1. El primer péptido mutante codificó 3 alaninas en lugar de los 3 primeros residuos,

2. El segundo péptido mutante que contenía las 3 alaninas movió un residuo aguas abajo, secuencialmente.
3. Anticuerpos que reconocen el péptido de 56 mer de tipo salvaje no reconoce las versiones mutantes del péptido que contiene sustituciones de alanina .

En síntesis, este estudio, utilizando VirScan , permitió trazar la distribución de epitopes lineales del proteoma del SARS-CoV-2, caracterizar especificidad o entrecruzamiento de especies y observar respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 en pacientes positivos.

Los anticuerpos específicos fueron prioritariamente anti proteína S y anti proteína N, con una reactividad cruzada mas significativa con el SARS-CoV que con el MERS-CoV y los HCoV estacionales.

El análisis mediante la plataforma de mutagénesis triple alanina reveló 145 Epitopes en S, 116 en N y 562 en el resto del proteoma del SARS-CoV-2.

La mayoría de los Epitopes S se ubicaron o en la superficie de la proteína o cercanas y no superpuestas con los sitios de glicosilación.

Se encontraron variantes entre Acs. altamente conservadas para algunos grupos de Epitopes y huellas de anticuerpos con niveles variables de conservación.

Los Epitopes mostraron un variación de privado a público con el 79% de los pacientes COVID-19 Positivos. Estos últimos, según los autores, serían útiles para clonar Inmunoglobulinas de Células B, con receptores específicos. El estudio de sus efectos protectores, inertes o deletéreos servirá de base para el diseño de futuras vacunas.

La relación entre la frecuencia de variantes isotópicas parece estar correlacionada con el perfil de la anamnesis.

#### Anticuerpos Ultrapotentes

Otros autores han publicado el hallazgo de Anticuerpos anti SARS CoV-2 que denominaron Ultrapotentes.

Fueron Científicos de la Universidad de Washington quienes publicaron el hallazgo. Los denominaron Anticuerpos Ultrapotentes S2E12 y S2M11.

Este trabajo de investigación publicado en Science<sup>12</sup>, encontró mediante criomicroscopía que ambos Anticuerpos bloquean con éxito la unión del Receptor ACE2 y además que el S2M11 también bloquea la espiga en una conformación cerrada mediante el reconocimiento de un epítipo cuaternario que abarca dos dominios de unión a receptores adyacentes. Los cócteles que incluyen S2M11, S2E12 o el anticuerpo S309 previamente identificado, neutralizan ampliamente al SARS-CoV-2 circulante.

El hallazgo de antígenos virales, previo a la aparición de signos y síntomas, conforme regiones, edades, origen del patógeno, y/o estrategias de prevención facilitarán la implementación de medidas públicas, políticas sanitarias, operaciones comunitarias y de educación epidemiológica y de seguimiento de casos, en síntesis , un neto enfoque de APS que justifica su inclusión en este seminario dirigido por el Dr. Jorge Mitelman que destaca la conveniencia del trabajo integrado en equipo provenientes de diferentes áreas, profesiones y carreras.

Dirección: Prof. Dr. Jorge Mitelman . Coordinación Dra. Luisa Gimenez . Corrección: Aldana Simes. Edición Luis Simes- María A. Camilletti.

---

<sup>12</sup> Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. M. Alejandra Tortorici et al. *Science* 24 Sep 2020: eabe3354. DOI: 10.1126/ science.abe3354