

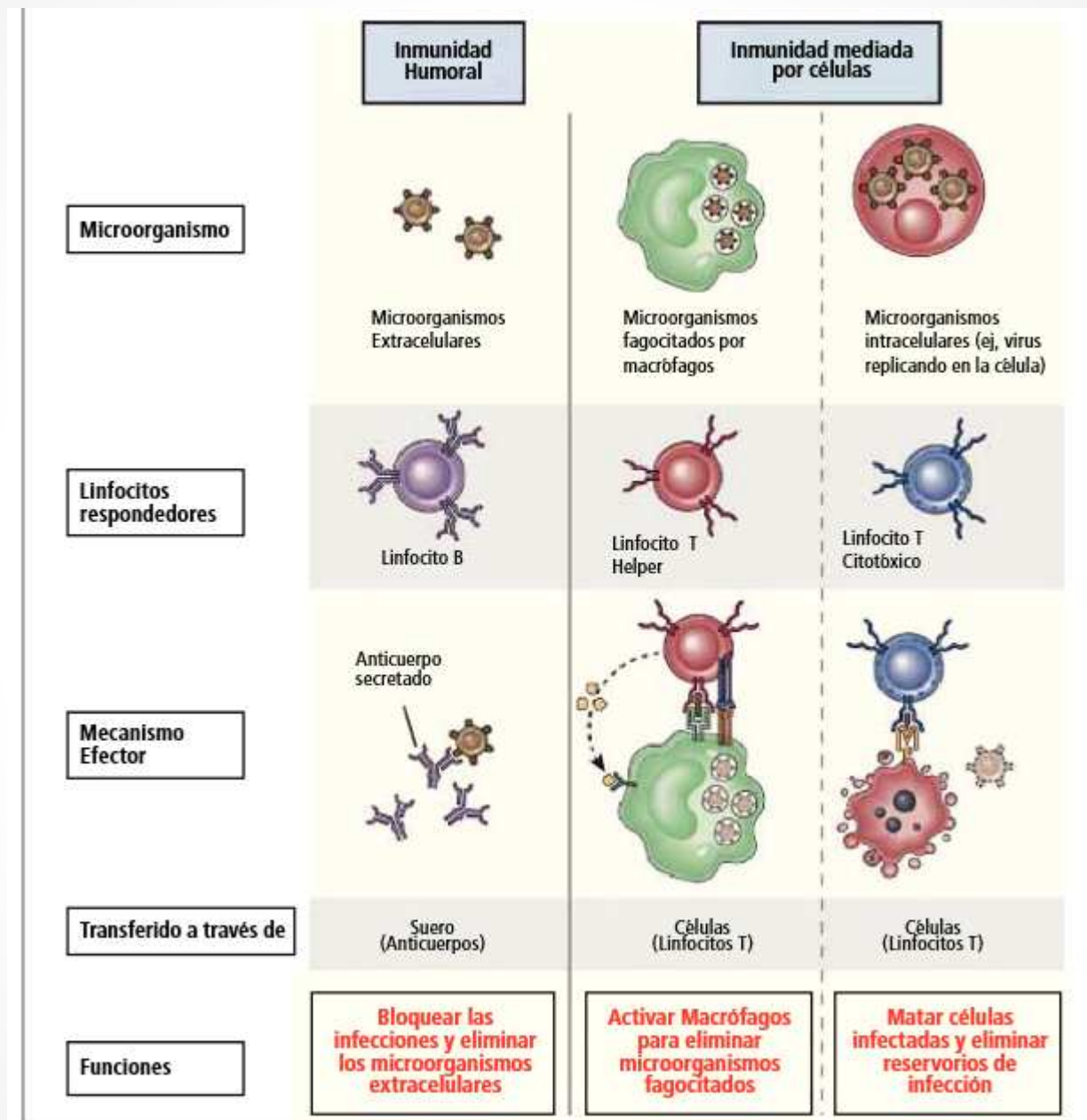
SEMINARIO: COVID-19: La epidemiología, la microbiología y la investigación en las estrategias de vigilancia y control de la pandemia.

Sesión I. La vigilancia y el diagnóstico microbiológico de COVID-19.

**Técnicas serológicas de alto rendimiento.
Eficacia en la vigilancia según avanza la
pandemia.**

Jesús Oteo Iglesias

I- ¿Qué se entiende por técnicas serológicas de alto rendimiento?



I- ¿Qué se entiende por técnicas serológicas de alto rendimiento?

Capaces de alcanzar una alta sensibilidad y especificidad

Corto tiempo de procesamiento

Procedimiento operativo simple

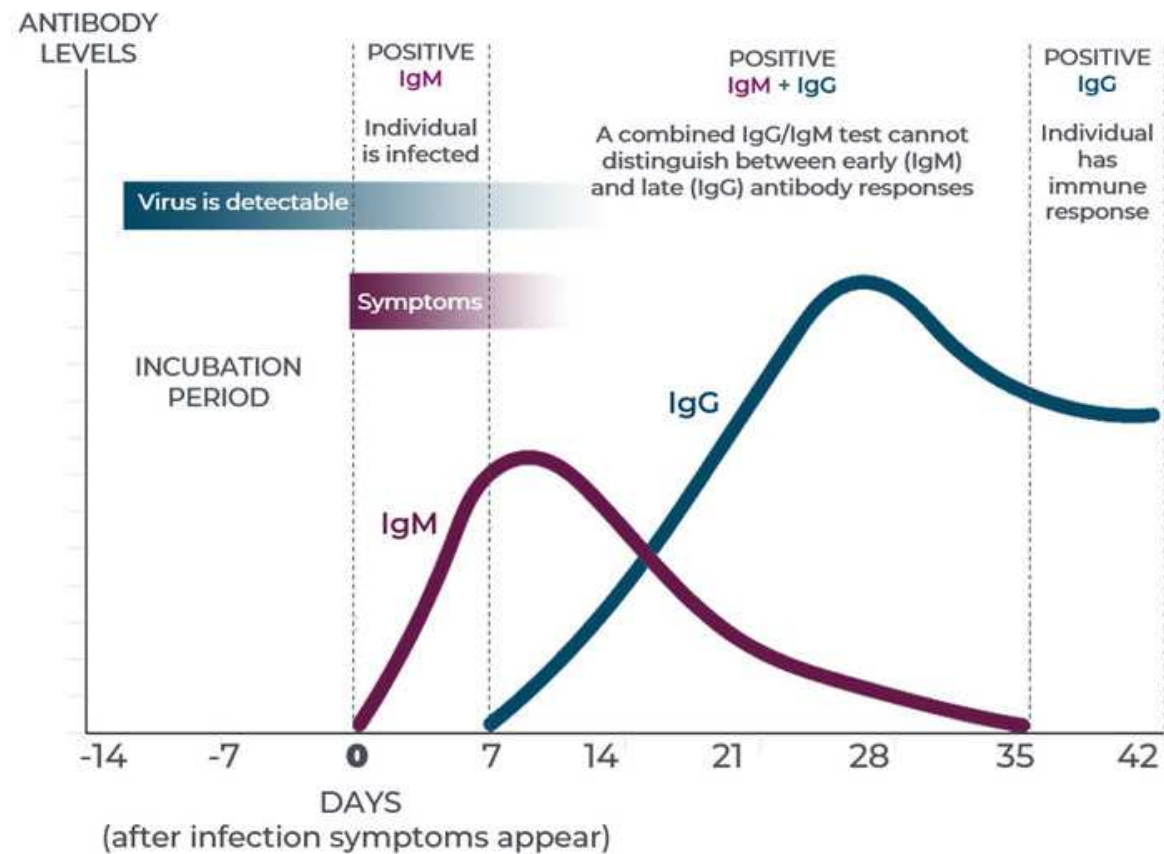
Técnicas de detección de anticuerpos adecuadas para el cribado de primera línea debido a:

Fáciles de automatizar

Ampliamente automatizadas y estandarizadas

Posibilidad de hacer muchas determinaciones en poco tiempo

- ✓ Detección de Ac totales, IgM, IgG o IgA.
- ✓ Cinética habitual de IgM e IgG.



< Latest evidence

Coronaviruses

Epidemiology

Transmission

Diagnostic testing and screening for SARS-CoV-2



Assay types

There are three main types of detection assays relevant for COVID-19 diagnostic testing and screening, based on the target that is being detected:

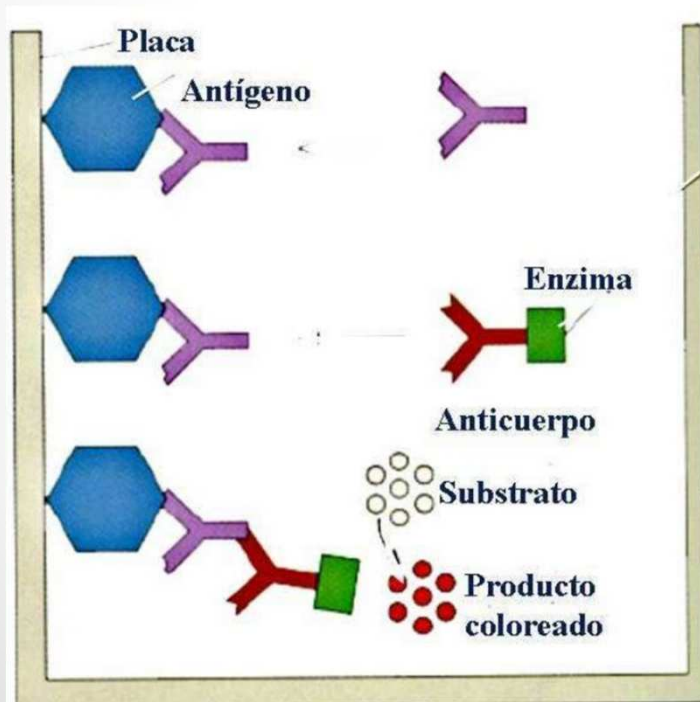
- Nucleic acid tests detect the presence of viral RNA. Typically, these use an amplification step based on RT-PCR.
- Antigen tests detect the presence of a viral antigen, typically part of a surface protein.
- Antibody tests detect the presence of antibodies generated against SARS-CoV-2. The three most used assays are enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), chemoluminescence assays (CLIA) and lateral flow assays (LFA). In addition, virus neutralisation tests are used, which can specifically detect neutralising antibodies, but this is mainly used for assay validation and research. Preliminary reports on ELISA assays have shown good correlation of antibody titration results with virus-neutralising antibodies [116,160].

Las más utilizadas para COVID-19 son las técnicas de inmunoensayo:

- ✓ ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática)
- ✓ CLIA (inmunoensayo de quimioluminiscencia)

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática

- ✓ Se basa en una reacción Ag-Ac.
- ✓ Se realizan sobre un soporte sólido al que se ha fijado el Ag específico.
- ✓ Sobre la unión Ag-Ac se añaden Ac conjugados a una enzima, que junto con un sustrato cromogénico, cataliza una reacción química produciendo un cambio de color visible y cuantificable.

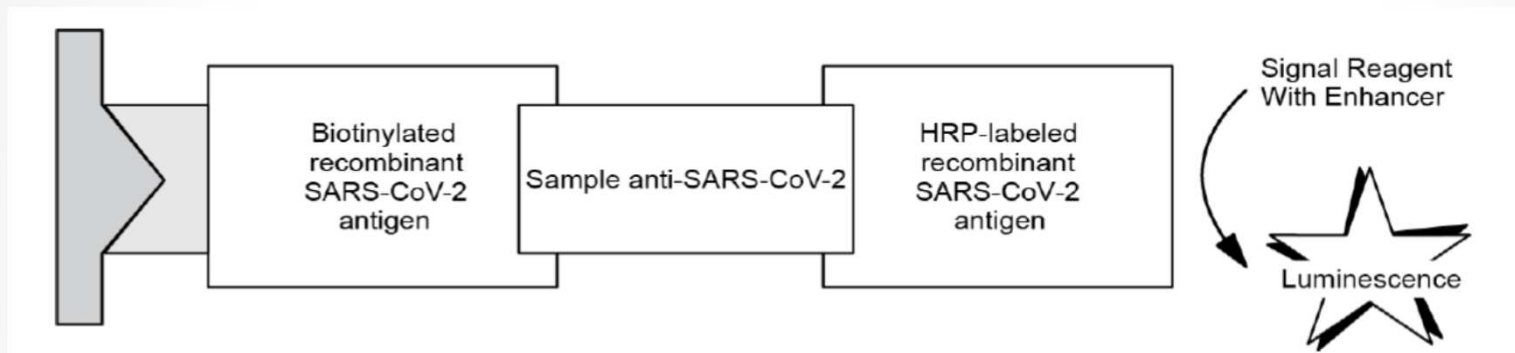


Características.

- ✓ Técnica muy sensible.
- ✓ Rápida y fácil de automatizar.
- ✓ Ampliamente utilizada y estandarizada.
- ✓ Sustratos cromogénicos, mide cambio de color.
- ✓ Lectura debe hacerse en un periodo corto tras la reacción enzima-sustrato.

CLIA: Inmunoensayo de quimioluminiscencia.

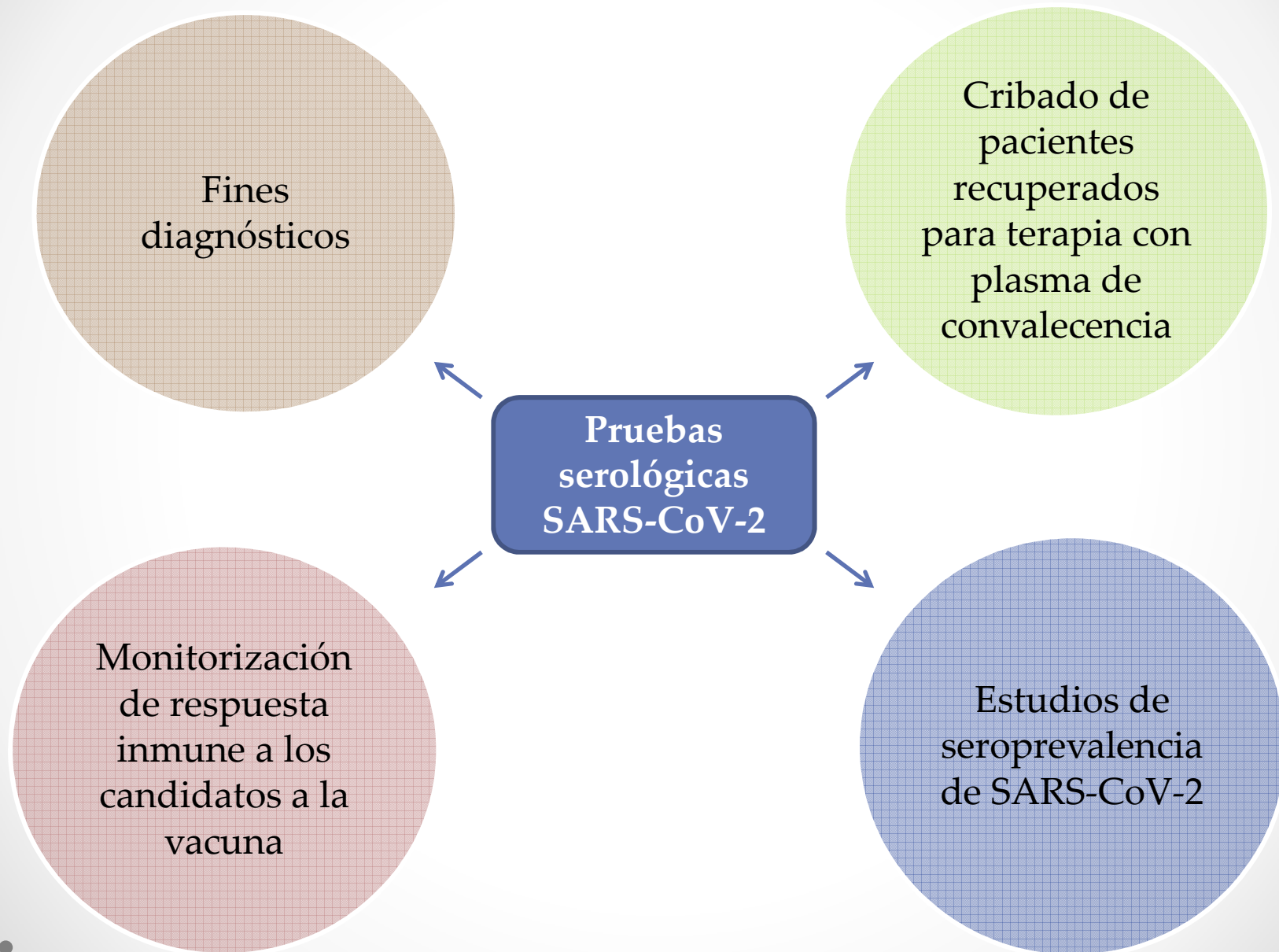
- ✓ Mismas bases que el ELISA.
- ✓ Sobre la unión Ag-Ac se añaden Ac conjugados a una enzima, que junto con un sustrato luminiscente, cataliza una reacción quimioluminiscente produciendo emisión de luz visible y cuantificable.



Características.

- ✓ Técnica ultrasensible
- ✓ Fácil de automatizar.
- ✓ Reactivos altamente estables.
- ✓ Sustratos luminiscentes, mide emisión de luz.
- ✓ Necesita lector de quimioluminiscencia

2- Usos de las técnicas serológicas de alto rendimiento en la estrategia contra la pandemia



A- Fines diagnósticos

VENTAJAS

Más rápido y menos complejo que la detección de ARN viral por RT-PCR

Infección aguda por detección de IgM

Casos clínicamente compatibles con PCR repetidamente negativa

Manifestaciones tardías de la enfermedad

Seroconversión. Tres semanas tras el inicio de los síntomas >95% han seroconvertido

LIMITACIONES

Falsos negativos en primeras fases de la infección (> transmisión)

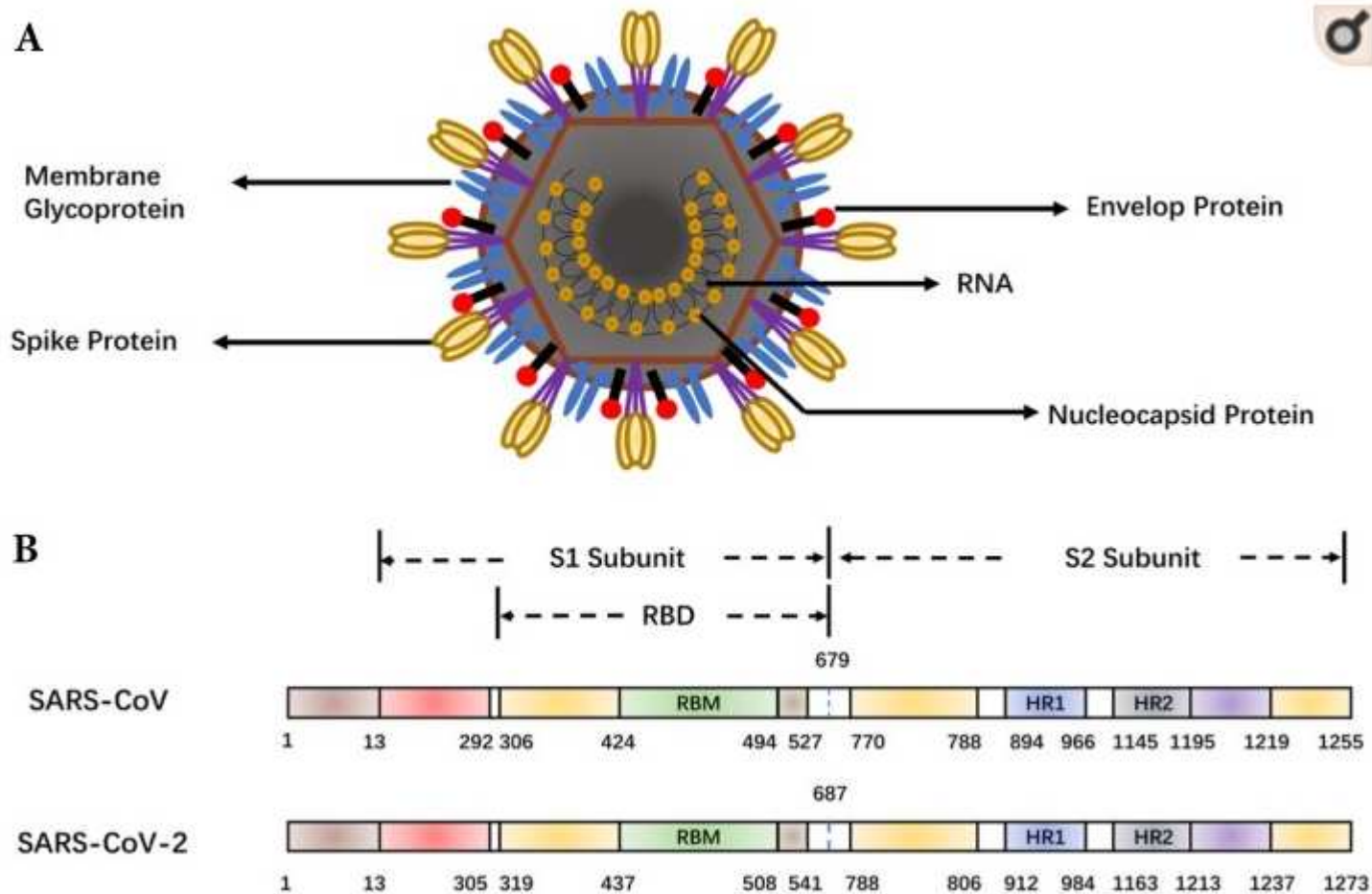
Falsos positivos de IgM por factor reumatoide.

Falsos positivos por reactividad cruzada?

Importancia del Ag diana, variabilidad S y E

Superposición de curvas cinéticas. Dificultad de interpretar los resultados.

• ¡Técnica de referencia detección de ARN vírico por RT-PCR! •



Zhou G, Zhao Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Int J Biol Sci.* 2020;16(10):1718-1723. Published 2020 Mar 15. doi:10.7150/ijbs.45123



A Method To Prevent SARS-CoV-2 IgM False Positives in Gold Immunochromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Qiang Wang,^{a,b,c} Qin Du,^{a,c} Bin Guo,^{a,b,c} Daiyong Mu,^d Xiaolan Lu,^{a,c} Qiang Ma,^{a,b,c} Yangliu Guo,^{a,b,c} Li Fang,^{a,b,c} Bing Zhang,^d Guoyuan Zhang,^{a,c} Xiaolan Guo^{a,b,c}

TABLE 4 Comparison of specificities of ELISA SARS-CoV-2 IgM detection before and after urea dissociation

Control	No. of cases	% specificity (no. of cases showing indicated level of ELISA specificity/total no. of cases)	
		Before dissociation	After dissociation
RF-IgM negative	36	100.00 (36/36)	100.00 (36/36)
RF-IgM positive	36	38.89 (14/36)	91.67 (33/36) ^a
Total	72	69.44 (50/72)	95.83 (69/72) ^a

^a $P < 0.001$ (compared with results determined before dissociation).

B- Estudios de seroprevalencia de SARS-CoV-2

VENTAJAS

Detección de IgG en estudios poblacionales evolutivos con grandes cohortes.

Determinar la **prevalencia del virus** (infección asintomática variable)

Denominador de infectados para el cálculo de la tasa de letalidad.

Factores de riesgo asociados con la infección por SARS-CoV-2

Permite monitorizar tendencias.
¿Persistencia de Ac? ¿Inmunidad colectiva?

LIMITACIONES

No nos dicen qué porcentaje de la población es inmune y no puede volver a reinfectarse

Ni cuántos Ac son necesarios para estar protegidos contra la reinfección

Técnicas de alta especificidad: En poblaciones grandes con baja prevalencia ↑↑ los falsos positivos

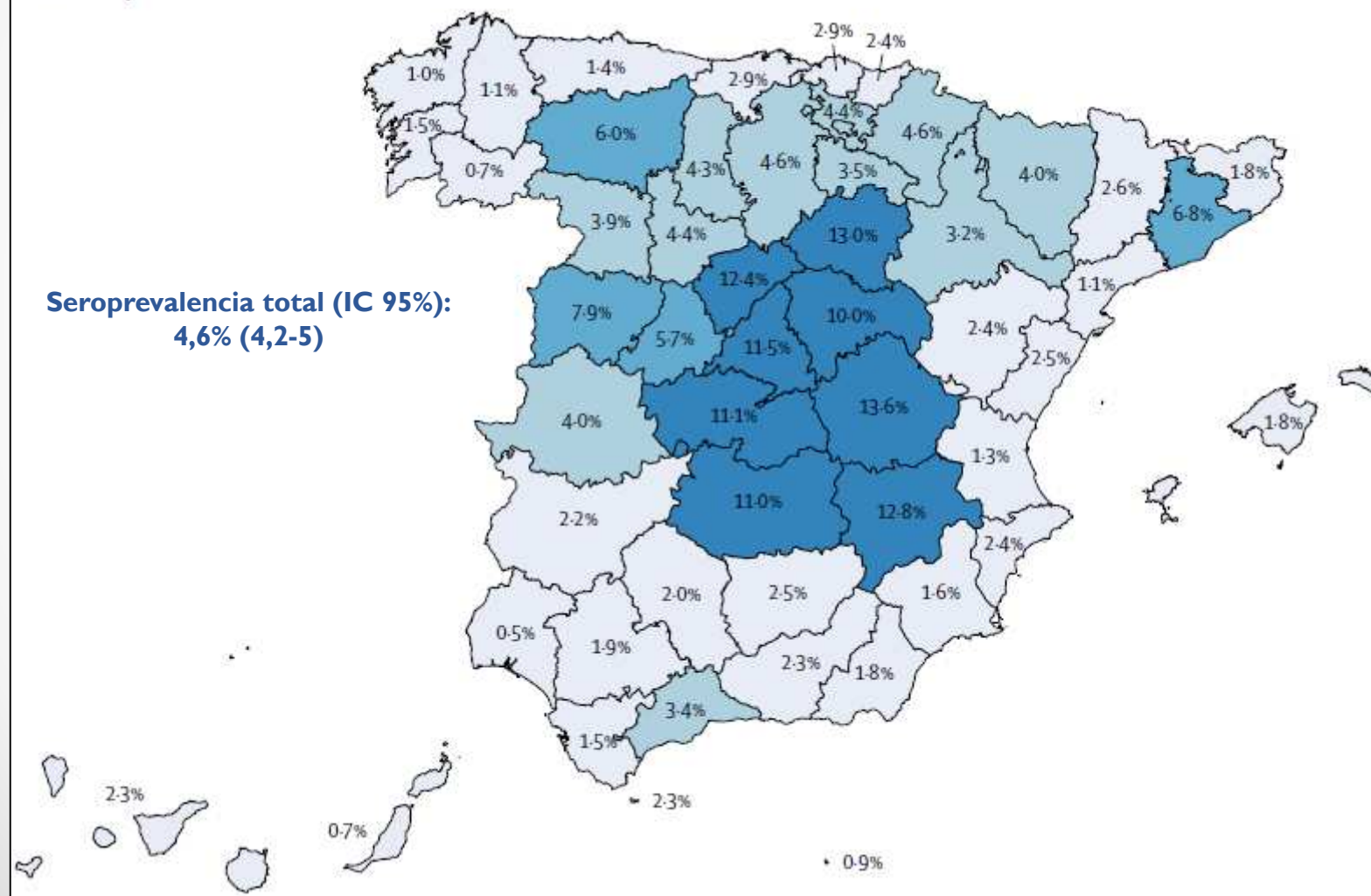
Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study



Marina Pollán, Beatriz Pérez-Gómez, Roberto Pastor-Barriuso, Jesús Oteo, Miguel A Hernán, Mayte Pérez-Olmeda, Jose L Sanmartín, Aurora Fernández-García, Israel Cruz, Nerea Fernández de Larrea, Marta Molina, Francisco Rodríguez-Cabrera, Mariano Martín, Paloma Merino-Amador, Jose León Paniagua, Juan F Muñoz-Montalvo, Faustino Blanco, Raquel Yotti, on behalf of the ENE-COVID Study Group*

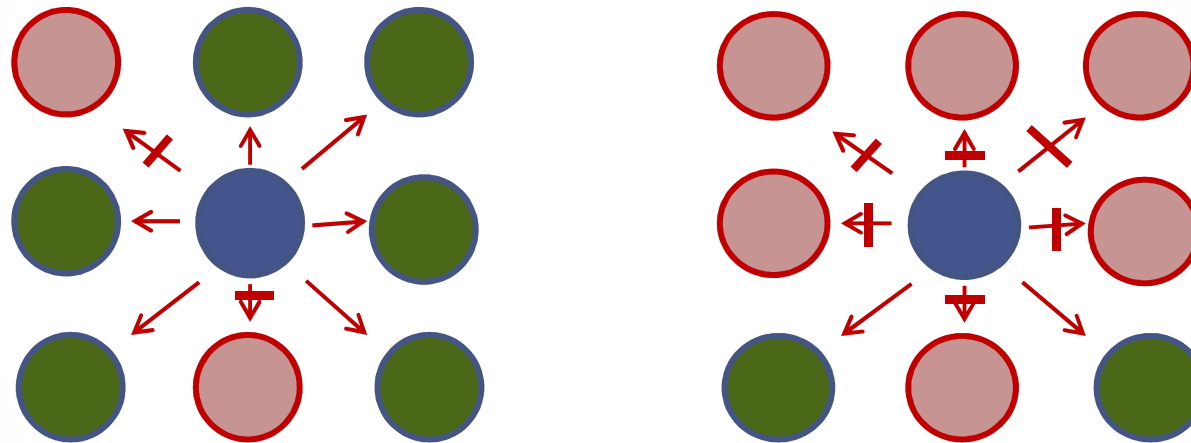
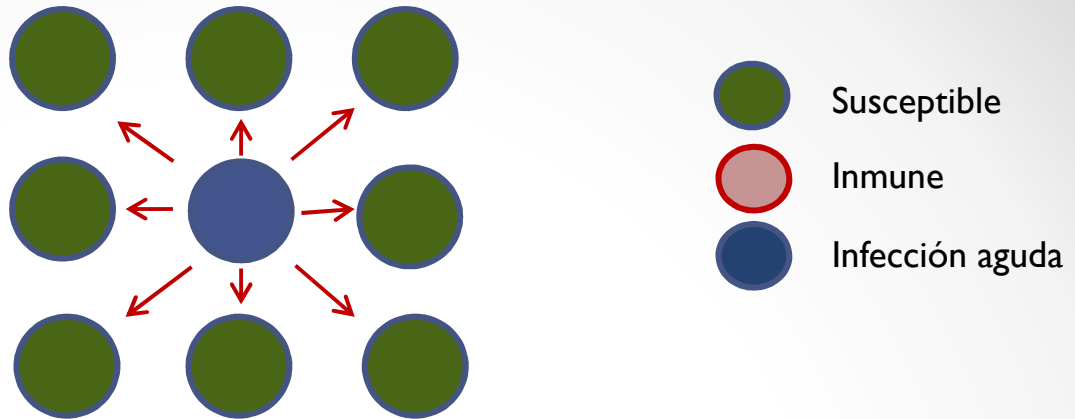
Immunoassay

**Seroprevalencia total (IC 95%):
4,6% (4,2-5)**



Inmunidad colectiva

- ✓ Cuando una proporción suficiente de la población es inmune al agente infeccioso y limita la posibilidad de transmisión.



- ✓ Depende múltiples factores; principalmente de la transmisibilidad del virus: cuanto más transmisible, mayor es el porcentaje de la población que necesita ser inmune para que la inmunidad colectiva sea eficaz.
- ✓ Porcentaje no está bien definido; podría variar entre el 50-80% dependiendo del número reproductivo básico de SARS-CoV-2 (R_0).
- ✓ También muy dependiente las medidas de aislamiento y distanciamiento social.

C- Monitorización de la respuesta inmune a los candidatos a la vacuna COVID-19

- El desarrollo de una vacuna eficaz pieza clave en la estrategia de control de la enfermedad a nivel mundial.
- Más de 150 candidatos a vacunas contra el SARS-CoV-2 en desarrollo, en etapas preclínicas iniciales o en ensayos clínicos en humanos.
- Las pruebas serológicas para el SARS-CoV-2 desempeñan un papel importante en su desarrollo para:
 - ✓ La preselección de las personas para los ensayos clínicos de la vacuna.
 - ✓ El control y seguimiento de la respuesta inmunitaria en los receptores de la vacuna.
 - ✓ La definición de la eficacia de la vacuna.

- **Mismo tipo de aplicación para cualquier ensayo clínico de profilaxis.**
- **Evitar sesgos en los resultados seleccionando las personas a incluir.**



D- Cribado de pacientes COVID-19 recuperados para terapia con plasma de convalecientes.

- ✓ Detección de Ac anti-SARS-COV-2 en pacientes recuperados.
- ✓ Uso del plasma de estos pacientes como tratamiento o profilaxis.

- ✓ Necesidad de cuantificar los Ac neutralizantes.
- ✓ Dificultad en realizar pruebas de Ac neutralizantes.

- ✓ ConPlas-19, un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, de terapia con plasma de convalecientes añadido a terapia estándar versus terapia estándar para el tratamiento de pacientes hospitalizados por COVID-19, promovido por el H. U. Puerta de Hierro y con financiación del ISCIII.

D- Cribado de pacientes COVID-19 recuperados para terapia con plasma de convalecientes.



Transfusion and Apheresis Science

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

Review

Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19

Bethany L. Brown^{a,*}, Jeffrey McCullough^b

✓ Tres series de casos en China con 19 pacientes en total

Table 1

Use of Convalescent Plasma for COVID-19.

Reference	Infectious Agent	Patient Condition Study Design	Antibody Titer	Patient Outcomes
Convalescent Plasma for COVID-19				
Shen et al., 2020 [14]	SARS-CoV-2	Critically Ill Case Series	> 1:1000	Body temperature normalized within 3 days in 4/5 patients SOFA score decreased, and PAO ₂ /FIO ₂ increased within 12 days ARDS resolved in 4 patients at 12 days
Duan et al., 2020 [16]	SARS-CoV-2	Severely Ill Case Series	> 1:640	Improved oxygenation and reduced inflammation and viral load
Zhang et al., 2020 [30]	SARS-CoV-2	Critically Ill Case Series	–	All 4 patients recovered

✓ Necesidad de altos títulos de Ac neutralizantes (>1:160 o 1:320)

3- Cuestiones a considerar en la interpretación de los resultados de las técnicas serológicas de alto rendimiento.

Sensibilidad limitada en la primera fase de la infección.



Detectables a partir de la segunda semana de la infección

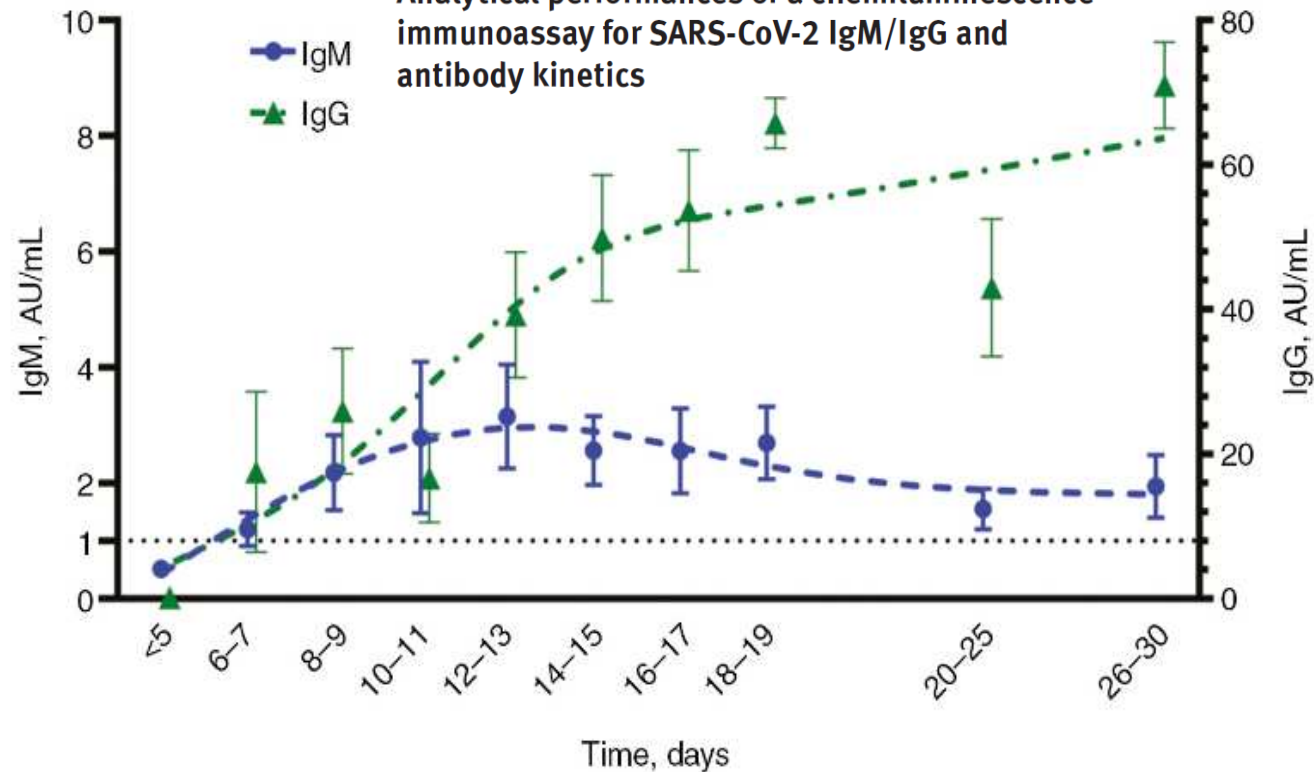
Figure 2:

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2020; 58(7): 1081–1088

Andrea Padoan, Chiara Cosma, Laura Sciacovelli, Diego Faggian and Mario Plebani*

Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics





ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Narrative review

Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results

G. Caruana¹, A. Croxatto¹, A.T. Coste¹, O. Opota¹, F. Lamoth^{1,2}, K. Jaton¹, G. Greub^{1,2,*}

- ✓ Los resultados obtenidos pueden variar en función del Ag diana que se utilice en su detección.
- ✓ No evidencias muy fuertes en algunos temas, pero:

	Anti N (nucleocápside)	Anti S (espícula)
Sensibilidad	Mayor S (sobre todo en fases iniciales)	Persisten más tiempo
Especificidad		Mayor E (S1-RBD)
Diagnóstico	Uso de ambos combinados	Uso de ambos combinados
Seroprevalencia	Aparece y desaparece antes	Preferible por su permanencia en el tiempo
Capacidad neutralizante	Menor	Mayor (S1-RBD)

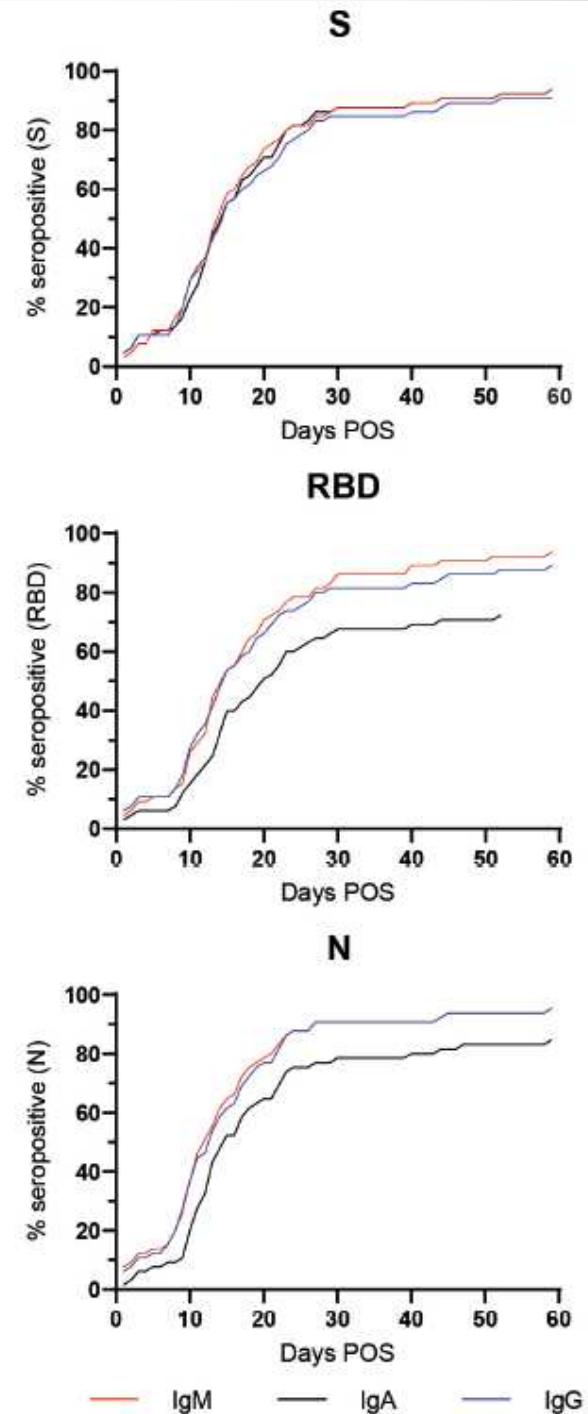
Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection

Variabilidad de respuesta de Ac según Ag.
Seguimiento de 65 pacientes.

Ag S: IgG 92,3% / IgM 92,3%

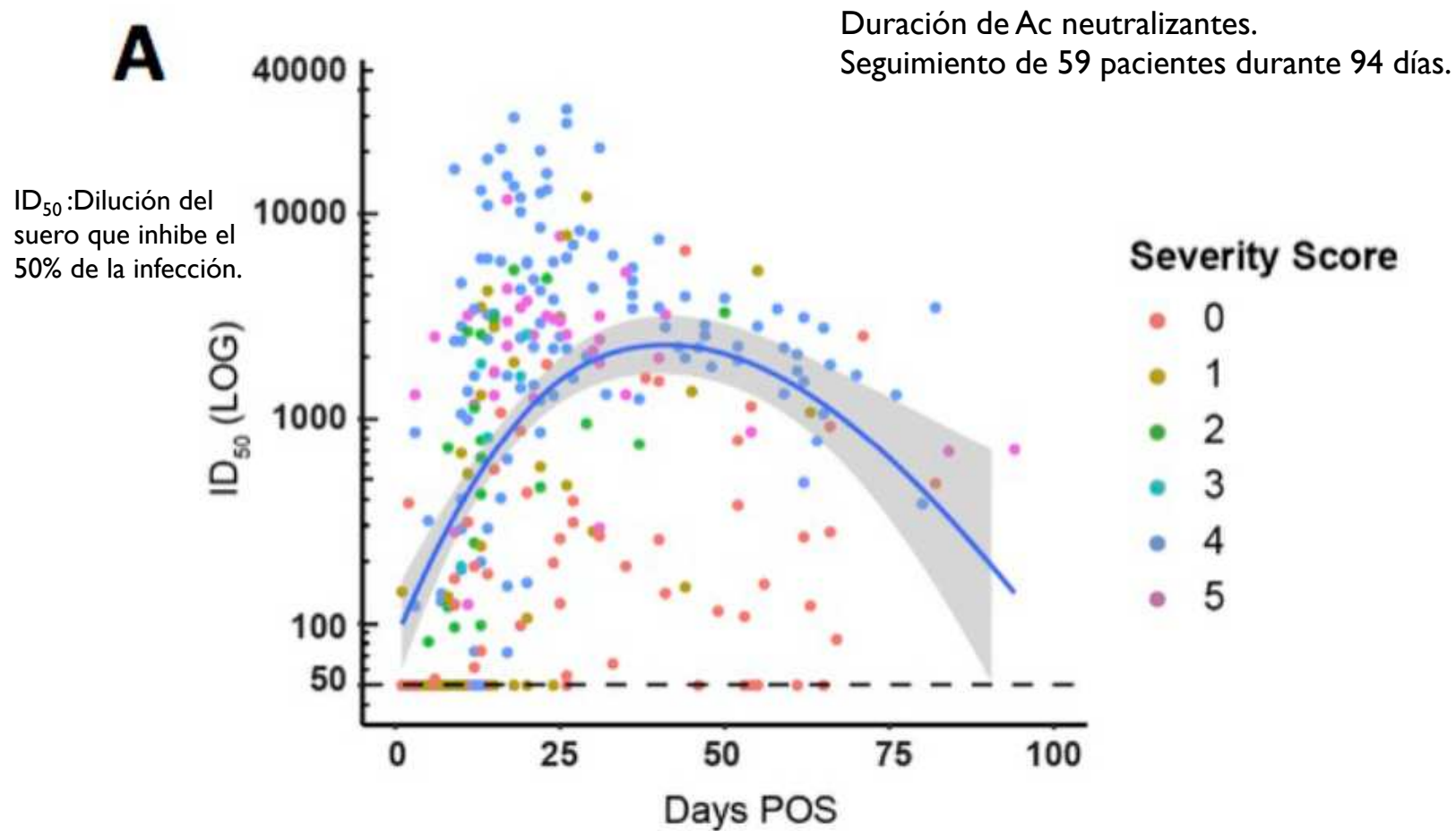
Ag RBD: IgG 89,2% / IgM 92,3%

Ag N: IgG 93,8% / IgM 95,4%



Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection

Jeffrey Seow¹#, Carl Graham¹#, Blair Merrick²#, Sam Acors¹#, Kathryn J.A. Steel³,



Más Ac a más gravedad.
Disminución progresiva de Ac.

Determinación al inicio de la infección: Aun no se han desarrollado Ac.

Determinación tardía: posible negativización sobre todo si Ac anti-N.

Falso positivo de PCR.

A vueltas con la sensibilidad: ¿Qué sucede con casos confirmados con PCR y serología negativa?

Inmunodepresión: Aparición tardía de Ac relacionada con mala evolución.

¿Baja sensibilidad de las técnicas?. Desarrollo muy rápido, habitualmente se consigue el mejor rendimiento a partir de la 2ª o 3ª generación.

15 técnicas evaluadas en el CNM
S aumenta según aumenta la enfermedad
S >95% a las dos semanas de la infección

¡Casos clínicos con PCR repetidamente positiva sin Ac por diferentes técnicas serológicas!

¿Peculiaridades de la respuesta inmune?

Bajos niveles de Ac en asintomáticos o leves: ¿Control precoz por la inmunidad innata y no necesaria la intervención de la inmunidad adquirida?

¿Preponderancia de la inmunidad celular sobre la humoral?

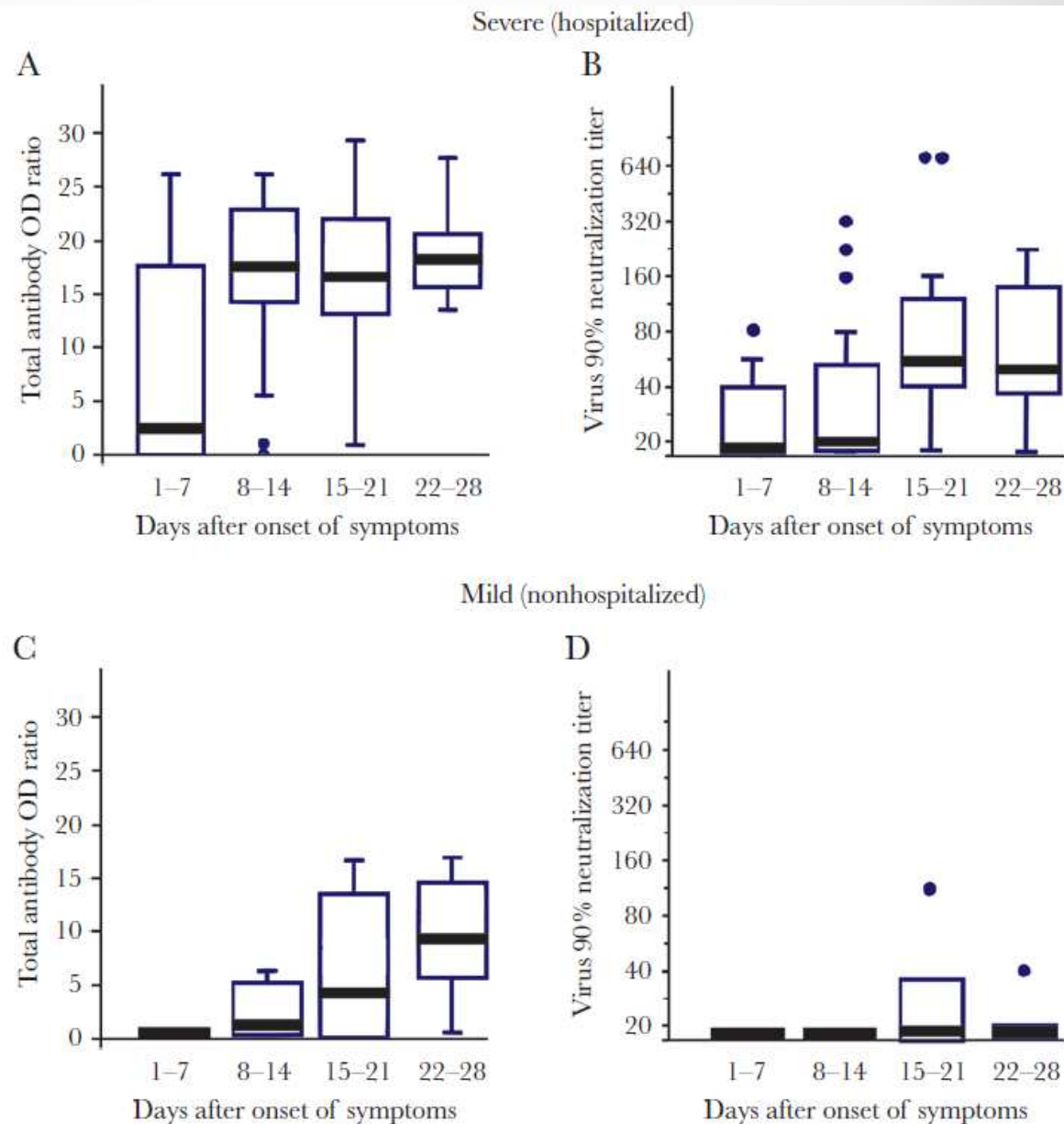
BRIEF REPORT

Differences in Antibody Kinetics and Functionality Between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections

Ger Rijkers,^{1,2,3} Jean-Luc Murk,^{2,4} Bas Wintermans,^{1,4} Bieke van Looy,¹ Marcel van den Berge,⁵ Jacobien Veenemans,¹ Joep Stohr,² Chantal Reusken,⁶ Pieter van der Pol,¹ and Johan Reimerink⁶

34 hospitalizados.
24 no hospitalizados.

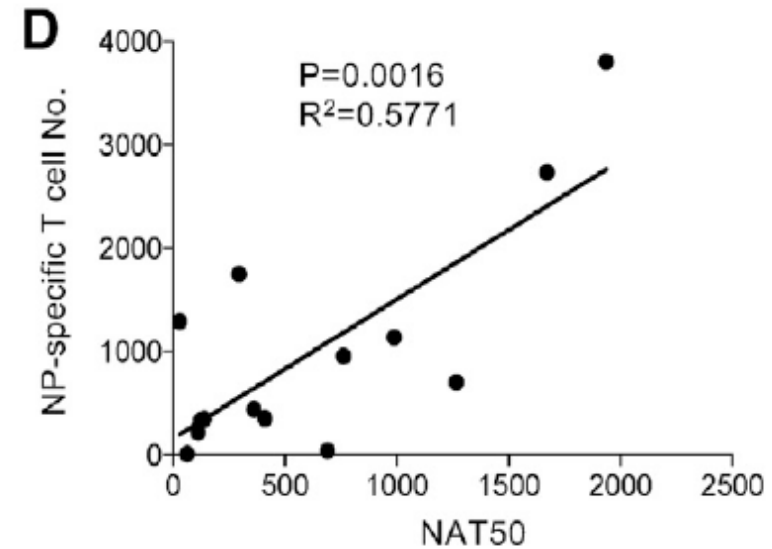
- ✓ ¿Impacto en estudios de seroprevalencia?
- ✓ ¿Repercusión en protección contra futuras infecciones?
- ✓ Rol de la inmunidad en la infección grave versus rol protector??



Report

Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals

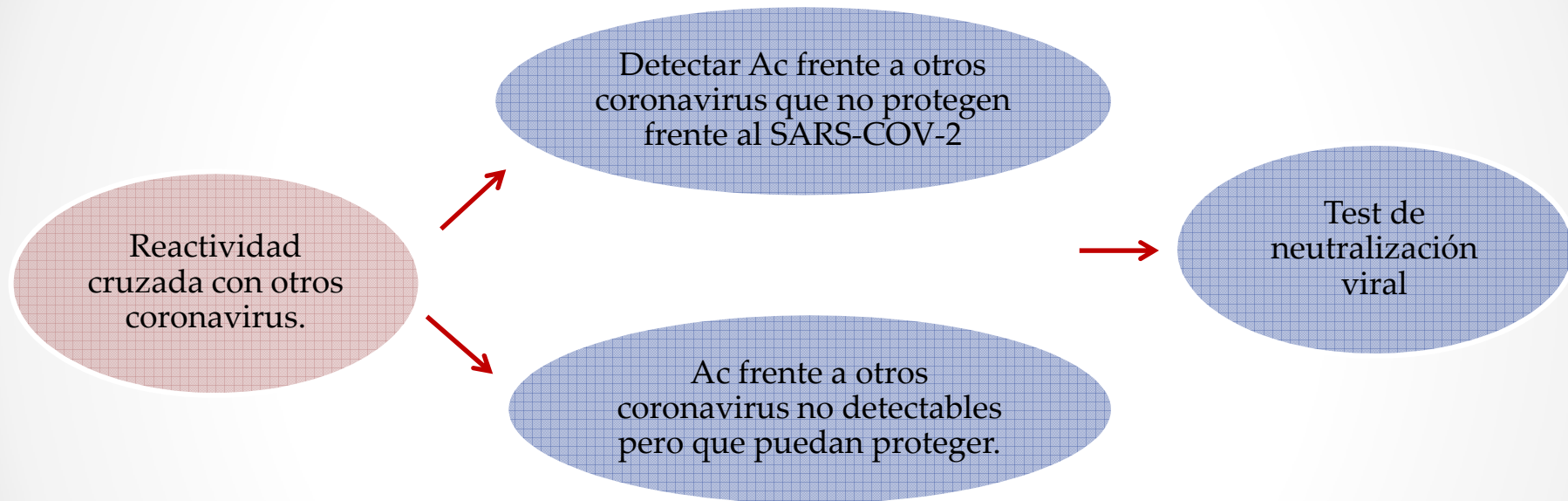
Ling Ni,^{1,2,9} Fang Ye,^{3,9} Meng-Li Cheng,^{4,9} Yu Feng,¹ Yong-Qiang Deng,⁴ Hui Zhao,⁴ Peng Wei,¹ Jiwan Ge,⁵ Mengting Gou,¹ Xiaoli Li,¹ Lin Sun,¹ Tianshu Cao,⁴ Pengzhi Wang,¹ Chao Zhou,⁴ Rongrong Zhang,⁴ Peng Lian Han Guo,⁷ Xinquan Wang,⁵ Cheng-Feng Qin,^{4,*} Fang Chen,^{6,*} and Chen Dong^{1,2,8,10,*}



Highlights

- SARS-CoV-2-specific antibodies are detected in COVID-19 convalescent subjects
- Most COVID-19 convalescent individuals have detectable neutralizing antibodies
- Cellular immune responses to SARS-CoV-2 are found in COVID-19 convalescent subjects
- Neutralization antibody titers correlate with the numbers of virus-specific T cells.

3- Cuestiones a considerar en la interpretación de los resultados de las técnicas serológicas de alto rendimiento.



Reactividad cruzada con otros coronavirus y especificidad según Ag diana

www.nature.com/cmi

Cellular & Molecular Immunology

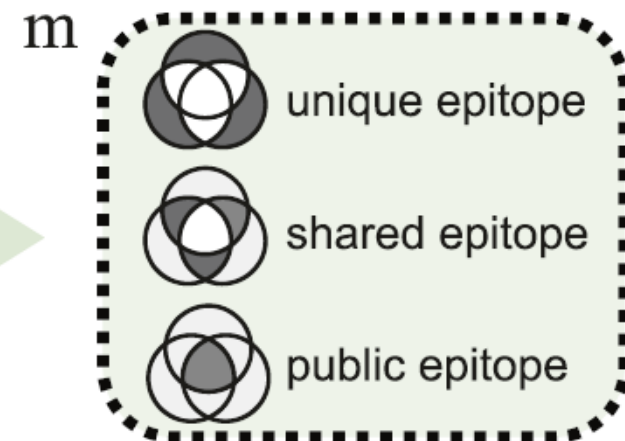
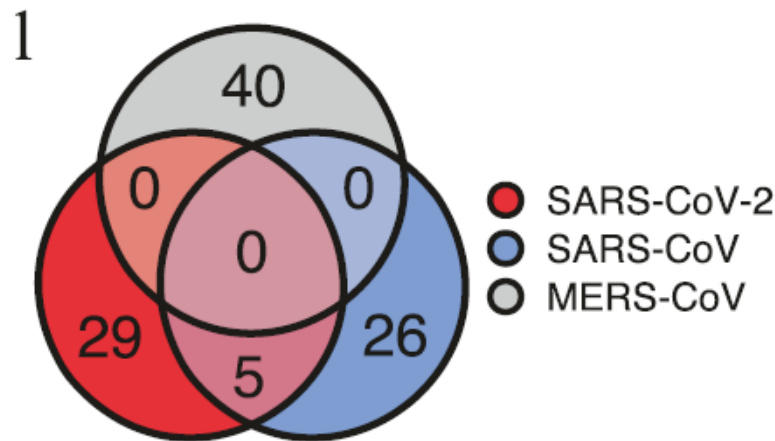


CORRESPONDENCE

Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV

Ming Zheng¹ and Lun Song¹

- ✓ A pesar de la alta homología genética con SARS-CoV (75,5%) ...
- ✓ La mayoría (85,3%) de los epítomos de anticuerpos de la proteína S de SARS-CoV-2 son nuevos y diferentes a SARS-COV.
- ✓ Falta de eficacia de Ac frente SARS-CoV contra COVID-19.
- ✓ Refuerza la especificidad de la pruebas serológicas Anti S.

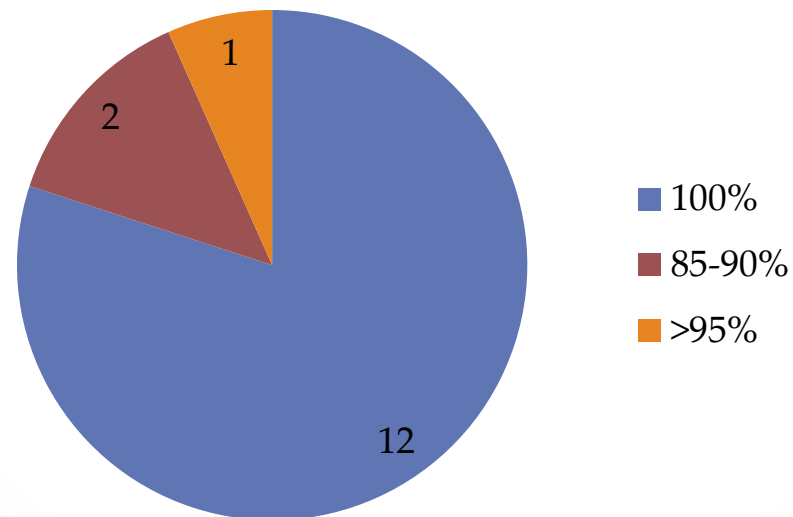


Experiencia de validaciones en el CNM.

¿Qué sucede con coronavirus humanos implicados en infecciones respiratorias comunes HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1?

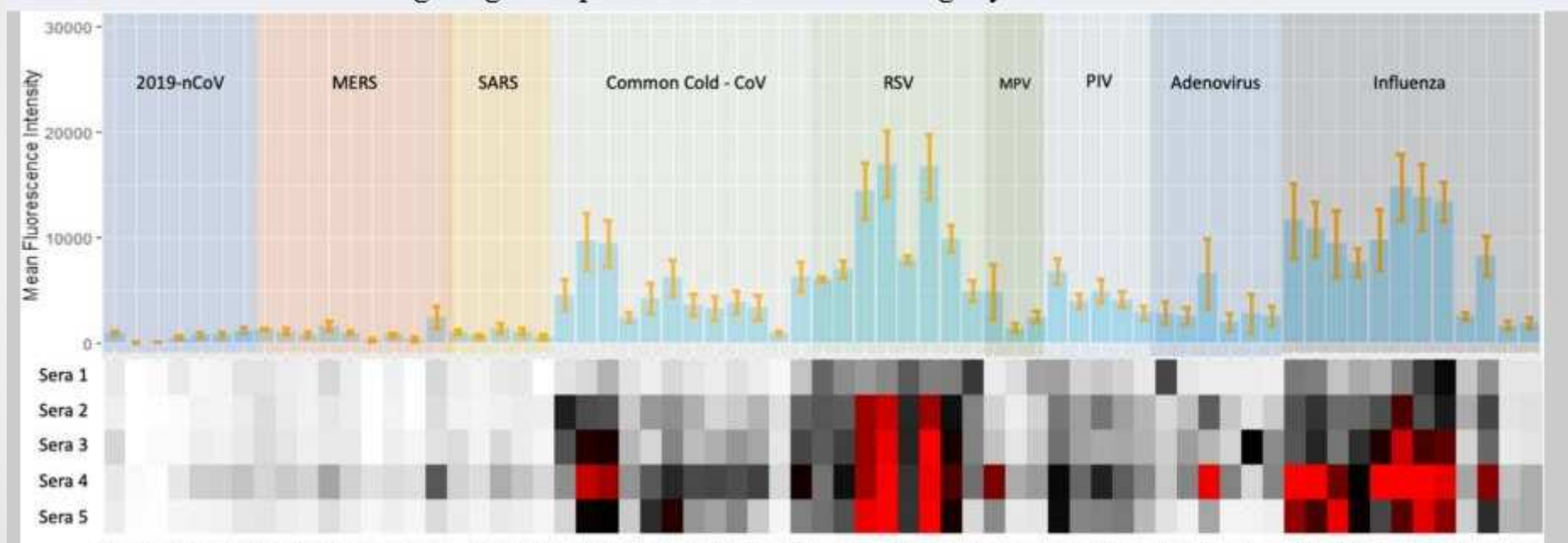
- ✓ 15 técnicas validadas.
- ✓ Sueros negativos extraídos antes de noviembre del 2019, enviados al CNM para el diagnóstico serológico de diferentes patógenos respiratorios.

Especificidad



Analysis of Serologic Cross-Reactivity Between Common Human Coronaviruses and SARS-CoV-2 Using Coronavirus Antigen Microarray

[Saahir Khan](#),^{(1)*} [Rie Nakajima](#),⁽²⁾ [Aarti Jain](#),⁽²⁾ [Rafael Ramiro de Assis](#),⁽²⁾ [Al Jasinskas](#),⁽²⁾
[Joshua M. Obiero](#),⁽²⁾ [Oluwasanmi Adenaiye](#),⁽³⁾ [Sheldon Tai](#),⁽³⁾ [Filbert Hong](#),⁽³⁾ [Donald K. Milton](#),⁽³⁾
[Huw Davies](#),⁽²⁾ [Philip L. Felgner](#),⁽²⁾ and Prometheus Study Group



- ✓ Estudio preliminar.
- ✓ 5 sueros positivos para coronavirus comunes
- ✓ S1 (incluido lugar de unión RBD): muy baja reactividad cruzada
- ✓ S2 y N: baja reactividad cruzada.

3- Cuestiones a considerar en la interpretación de los resultados de las técnicas serológicas de alto rendimiento.

¿Un resultado positivo de IgG implica protección frente al virus?

¿Protegen de igual forma los Ac frente a diferentes partes del virus?

Determinación de Ac neutralizantes

Prueba de neutralización por reducción en placa (PNRP):

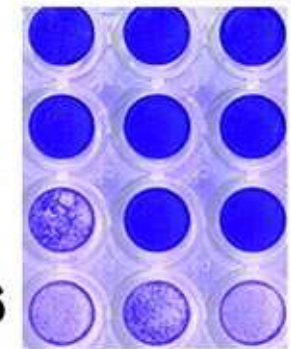
- Cultivo celular.
- Solución suero problema (diluciones dobles del suero) +virus vivo
- Transferir al cultivo celular.
- Observar efectos citopáticos.

1:2

1:4

1:8

1:16



- ✓ No es una técnica sencilla ni ampliamente disponible. Necesidad de P3.
- ✓ No suficiente evidencia de la correlación entre los ensayos comerciales habitualmente disponibles y los títulos de anticuerpos neutralizantes.
 - ✓ Evidencias de que correlacionan mejor con Ac anti SI-RBD.

4- Resumen de las indicaciones de las pruebas serológicas.

Diagnóstico.

I. En general desaconsejado.

Solo aconsejable para resolver discrepancias entre clínica y resultados de la RT-PCR:

- Síntomas muy compatibles con PCR negativa = IgM. ¡Cuidado con la especificidad!
Falsos positivos con FR
- Manifestaciones tardías en ausencia de diagnóstico inicial (meningoencefalitis, gastroenteritis)
- Complicaciones: Kawasaki, Guillain-Barré, tromboembolismo.



Casos con carga vírica baja en
muestras respiratorias

4- Resumen de las indicaciones de las pruebas serológicas.

Estudios de seroprevalencia.

- Magnitud de la pandemia. ¡Cuidado con especificidad en poblaciones con prevalencias bajas!
- Tasa de letalidad.
- Evolución y patrones de transmisión. Seguimiento de grandes cohortes.
- Identificar factores de riesgo.

Apoyo al desarrollo de vacunas.

- Selección de candidatos para ensayos clínicos, monitorizando la respuesta.

Apoyo al desarrollo de alternativas terapéuticas.

- Uso de plasma de convalecientes.