



DETECCIÓN Y TITULACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-SPIKE Y NEUTRALIZANTES PARA LA INFECCIÓN CON SARS-COV-2

-Selección de plasmas y sueros-

GRUPO COVIDAR: Diego S. Ojeda, María Mora Gonzalez Lopez Ledesma, Horacio M. Pallarés, Guadalupe S. Costa Navarro, Lautaro Sanchez, Sergio M. Villordo, Diego E. Alvarez, Jorge Carradori, Julio J. Caramelo, Marcelo J. Yanovsky, y Andrea V. Gamarnik

Fundación Instituto Leloir

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires
(IIBBA-CONICET)**

Este trabajo contó con la colaboración de Yesica Longueira, María L. Polo, Gabriela Turk y Natalia Laufer en representación del Grupo Biobanco de Enfermedades Infecciosas (BBEI) y de Leandro Burgos Prax y Ventura Simonovich del Hospital Italiano en representación del grupo PlasmAr.

Agradecemos la colaboración de los Drs. Benhur Lee (Escuela de Medicina Icahn, Mount Sinai, Nueva York, EEUU) y Sean Whelan (Universidad de Washington, Saint Louis, EEUU) por proveer las herramientas para el uso de virus pseudotipados, a los Drxs. Matias Ostrowski y Paula Pérez (INBIRS) por colaborar en la puesta a punto de dichos sistemas. A los Drs. Jorge Geffner y Horacio Salomón (INBIRS) por recomendaciones y aportes a este trabajo. A los Drxs. Beatriz Perazzi y Marcelo Rodriguez Fermepin (Hospital de Clínicas "José de San Martín"), Marcela Echavarría (CEMIC), Alicia Mistchenko (Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez"), Belén Bouzas (Hospital de Infecciosas "Francisco Javier Muñoz"), Marisa Gimenez (Hospital Italiano), Nadia Ahmed (Hospital Sirio Libanes y Sanatorio Güemes), Romina Musante (Sanatorio de La Trinidad Mitre), Juan Stupka (Hospital General de Agudos "Parmenio Piñero"), Susana Curi (Hospital General de Agudos "Dr. I. Pirovano"), María Alejandra Morales (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humana "Dr. Julio Maistiegui"), Luciano Leguizamón y Alejandra Margari (Hospital Naval "Dr. Pedro Mallo"), Gabriela Barbas (Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba), Miriam Pereiro (Hospital "Dr. Pedro Fiorito"), Ana Buchovsky (Hospital Garrahan), María Eugenia Bernardi (Laboratorio de Hemoderivados de la UNC), Ana Solarz (Sanatorio "Dr. Julio Méndez"), Damián Álvarez Paggi, Sebastián Esperante y Fernando Polack (Fundación INFANT) y Mariela Aranda (ANMAT) por sus aportes durante la validación de COVIDAR.

Por el financiamiento de este trabajo agradecemos al Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM), al CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a la Fundación Williams y a la Asociación Civil SAND.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es poner a disposición de las autoridades y profesionales de la salud la información generada por el grupo COVIDAR sobre la estandarización de protocolos para cuantificar anticuerpos de tipo IgG específicos contra SARS-CoV-2 y para la evaluación de anticuerpos neutralizantes de la infección. En este estudio se presentan los resultados obtenidos a partir de un análisis de la distribución de títulos de anticuerpos del tipo IgG en plasma de individuos convalecientes, el análisis desagregado de los títulos asociados a la gravedad de la infección y la correlación entre títulos de IgG (específicos contra la proteína viral *spike*) y su actividad neutralizante empleando tanto la cepa salvaje de SARS-CoV-2 como dos métodos basados en el uso de virus pseudotipados con la proteína *spike* del nuevo coronavirus. Los datos aquí presentados fueron generados a partir de 3 cohortes de muestras. La primera compuesta por 561 plasmas de convalecientes anonimizados, titulados empleando el test COVIDAR IgG. El segundo compuesto por una cohorte de 34 muestras de suero obtenidas del BBEI empleadas para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes utilizando el virus salvaje y empleando dos sistemas de virus pseudotipados. El tercero corresponde a una cohorte de 176 plasmas de donantes convalecientes que fueron utilizados para evaluar la correlación entre el título de IgG medido por COVIDAR y el título de anticuerpos neutralizantes de la infección. **En conjunto este estudio provee información que da robustez a la metodología empleada para la cuantificación de anticuerpos IgG empleando el test COVIDAR, muestra la correlación positiva entre los títulos de IgG totales contra la proteína *spike* y los títulos neutralizantes, y pone a disposición información sobre las características de plasmas de convalecientes de distintas cohortes de nuestro país.**

Proyecto COVIDAR: *En respuesta a la actual pandemia por el virus SARS-CoV-2 y por iniciativa del MINCYT y el CONICET, se crea el grupo COVIDAR. Dicho grupo abordó el desarrollo, la producción y la distribución de un test serológico nacional específico para la detección de anticuerpos de los tipos IgG e IgM contra el nuevo coronavirus. El test serológico COVIDAR ha sido distribuido en forma gratuita y empleado tanto en centros de salud públicos y privados, como por autoridades de salud de prácticamente todas las provincias de nuestro país. Asimismo, el grupo COVIDAR se involucró directamente en proyectos colaborativos de cooperación sanitaria con diversos hospitales y en proyectos de investigación clínica.*

Parte de los resultados presentados en este informe han sido publicados por el grupo COVIDAR en:

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009161>

INTRODUCCION

La expansión del virus SARS-CoV-2 y el impacto de la enfermedad que causa dicho virus (“coronavirus disease-19”, COVID-19) dieron lugar a una respuesta de emergencia por parte de la comunidad científica mundial. Esta respuesta se abocó al desarrollo de múltiples herramientas de control de la pandemia. Con una velocidad sin precedentes, se desarrollaron vacunas que, con aprobación de emergencia, ya se están suministrando en diferentes partes del mundo [1–5]. Por otro lado se iniciaron cientos de ensayos clínicos en búsqueda de terapias que pudieran interrumpir la progresión, disminuir la gravedad o reducir la mortalidad asociada a COVID-19. Entre las terapias estudiadas, se encuentra la utilización de plasmas de personas que cursaron la infección. Esta terapia se basa en la transferencia pasiva de anticuerpos presentes en el plasma de individuos que han resuelto la infección a individuos con infecciones agudas. Los anticuerpos transferidos específicos contra el SARS-CoV-2 pueden tener la capacidad de disminuir la infección viral en las personas receptoras y potencialmente mejorar la evolución clínica de la enfermedad. En los últimos meses se han presentado diversos estudios clínicos con el fin de evaluar el beneficio de la aplicación de plasmas de convalecientes en pacientes con COVID-19 que se encuentran en diferentes estadios de la infección.

En Argentina se realizaron recientemente dos estudios clínicos aleatorizados, controlados con placebo y doble ciego, con el fin de definir la utilidad de plasmas de convalecientes como terapia para COVID-19. El primer estudio, coordinado por el Hospital Italiano, mostró que la administración de plasma de convalecientes no ofrece beneficio clínico significativo en pacientes con neumonía grave. En este estudio se empleó una cohorte de 333 pacientes de los cuales 228 recibieron plasma de convalecientes de un donante o de un *pool* de 2 a 5 donantes con títulos de anticuerpos IgG totales contra SARS-CoV-2 entre 1/800 y 1/3200 [6]. El segundo estudio, dirigido por la Fundación INFANT, evaluó la aplicación de plasma de convalecientes al inicio de los síntomas en personas de riesgo, incluyendo mayores de 65 años con comorbilidades o mayores de 75 en general. En este ensayo, se administró el plasma dentro de las primeras 72 horas del inicio de síntomas y arrojó resultados que mostraron una eficacia del 73% cuando los títulos de IgG administrados correspondían a una media superior a 1/3200 [7], sin mostrar efectos adversos. Asimismo, se realizaron ensayos clínicos

adicionales en nuestro país para evaluar la utilidad del uso de plasmas, entre los que se puede mencionar un estudio coordinado por el Ministerio de Salud bonaerense, que mostró que la administración de plasma se asoció a una reducción en la mortalidad de pacientes con neumonía [8].

En este contexto, teniendo en cuenta las limitaciones del uso de plasmas de convalecientes en ciertos casos y resaltando los resultados promisorios en aplicaciones tempranas, el Ministerio de Salud de la Nación ha emitido guías para el uso apropiado de plasma de pacientes recuperados de COVID-19 con fines terapéuticos. Dichas guías se actualizan periódicamente en vista a los avances científicos reportados. En el procedimiento de selección de plasmas de convalecientes es crucial la determinación de los niveles de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el SARS-CoV-2. De hecho se ha demostrado que los plasmas con altos títulos de anticuerpos muestran mayores beneficios terapéuticos [7,9]. La guía del mes de diciembre 2020 sugiere transfundir unidades de plasma que cuenten con un título de IgG no menor a 1/800 o mayor a 1/1600 (en base al informe del Ministerio de Salud de CABA de enero 2021), empleando como referencia el reactivo COVIDAR IgG.

Cabe resaltar que frente a toda infección viral, el sistema inmune adaptativo genera un repertorio de anticuerpos específicos contra el virus. Estos anticuerpos son de distinto tipo (IgM, IgG e IgA) y están dirigidos a diversos blancos o *epitopes* del patógeno. Dentro de los anticuerpos generados, existe una variedad denominada anticuerpos neutralizantes, que tienen la capacidad de impedir que el virus infecte a la célula. Dichos anticuerpos bloquean regiones del virus necesarias para la infección, cumpliendo un rol fundamental en frenar la propagación viral. Al respecto, es importante mencionar que los anticuerpos dirigidos contra la proteína *spike* son los de mayor capacidad neutralizante ya que bloquean la unión del virus al receptor celular [10,11]. Los anticuerpos neutralizantes son uno de los pilares de las terapias inmunes pasivas, como es el uso de anticuerpos monoclonales, plasma de individuos convalecientes, sueros hiper-inmunes o inmunoglobulinas purificadas.

Frente a la relevancia de la inmunidad pasiva con fines terapéuticos y a la importancia de evaluar la respuesta humoral a las vacunas, es necesario disponer de métodos robustos para la cuantificación de anticuerpos específicos contra la proteína *spike* del SARS-CoV-2. En este trabajo se presentan protocolos estandarizados para la titulación de anticuerpos contra la proteína *spike* mediante el uso del ensayo COVIDAR IgG en sueros o plasmas y se evalúa la

correlación con su capacidad neutralizante de la infección viral. Esperamos que esta información sea de utilidad para emplear la metodología descrita con fines apropiados.

RESULTADOS

Titulaciones de anticuerpos IgG contra spike en sueros o plasmas

Con el fin de evaluar los niveles de anticuerpos de tipo IgG contra la proteína *spike* presentes en plasmas de convalecientes, se empleó una cohorte de 561 donantes (Figura 1A). Se realizaron titulaciones a punto final por diluciones seriadas empleando el reactivo COVIDAR IgG (protocolo incluido en el Manual de COVIDAR). El 72% de las muestras analizadas presentaron títulos de IgG superiores a 1/800, el 55% superiores a 1/1.600 y aproximadamente el 15% de las muestras mostró títulos de anticuerpos iguales o menores a 1/50 (las muestras con títulos menores a 1/50 se excluyeron de la Figura 1A). Cabe destacar la identificación de 83 plasmas de donantes con títulos superiores 1/12.800, incluyendo muestras con títulos de hasta 1/409.600 (Figura 1A). Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis desagregado teniendo en cuenta la sintomatología presentada por los donantes durante la infección. Este análisis indicó diferencias

significativas en los títulos de IgG en individuos que cursaron la enfermedad con síntomas leves o asintomáticos respecto a aquellos con síntomas severos o moderados, obteniendo medianas de 1/800 y 1/6.400, respectivamente ($p=0,0001$) (Figura 1B). Si bien el

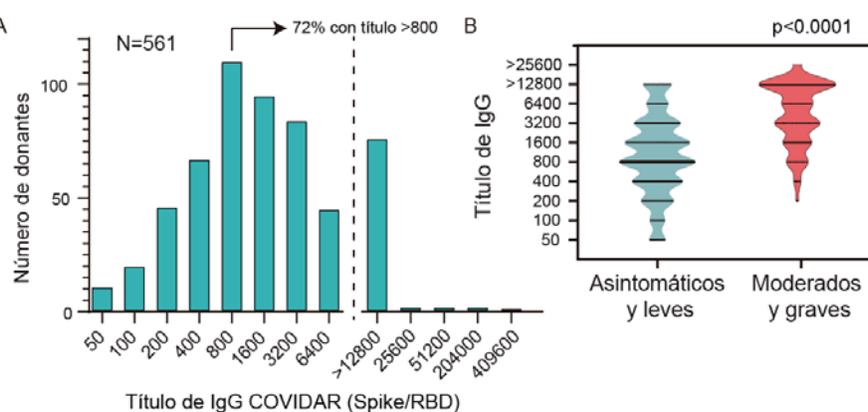


Figura 1. Títulos de IgG contra la proteína spike en plasmas de donantes. En A se muestra un gráfico de distribución de 561 muestras y en B se muestra que los títulos son significativamente diferentes en muestras de personas que sufrieron infección asintomática o leve en comparación con moderada o grave ($p < 0,0001$, Mann-Whitney test)

análisis estadístico arroja diferencias significativas entre estos grupos, cabe remarcar que los donantes que experimentaron sintomatología leve muestran un amplio rango de títulos de IgG, desde niveles bajos a niveles muy altos (Figura 1B). Esto indica que individuos que han tenido sintomatología leve pueden ser potenciales buenos donantes. Para ilustrar esta observación, se representan las titulaciones de muestras de 118 donantes, 59 individuos que cursaron la

enfermedad con sintomatología leve y 59 individuos que cursaron con sintomatología severa (Figura 2). En los mapas de color se muestran los títulos determinados para cada plasma, se remarca que los títulos altos están representados mayoritariamente en color rojo y los títulos

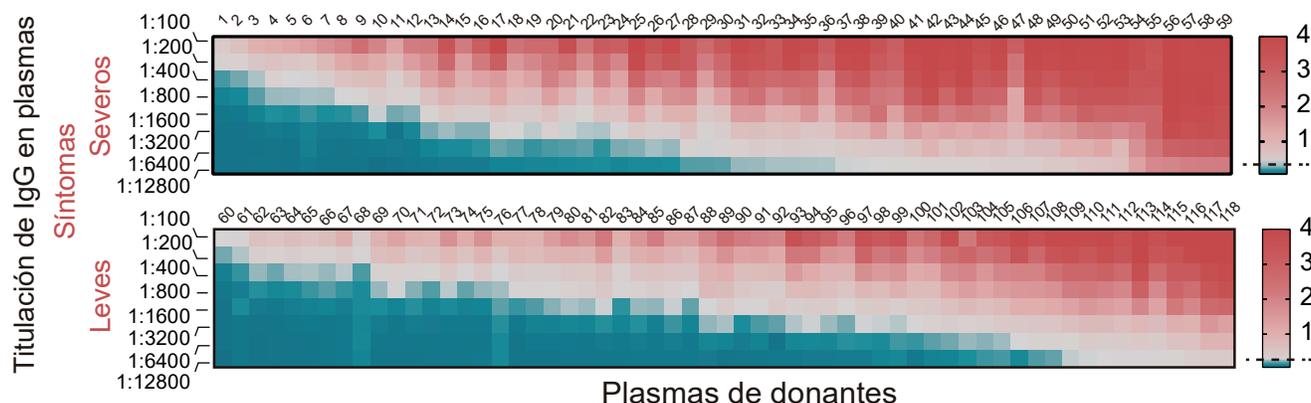


Figura 2 Curvas completas de titulación de IgG de plasmas de donantes que se recuperaron de infecciones severas o leves de COVID-19 como se indica a la izquierda. Se muestran mapas de color donde el rojo representa altos y azul bajos niveles de anticuerpos como se indica a la derecha. Las diluciones de los plasmas empleadas se muestran a la izquierda. En la parte superior se indica cada una de las muestras tituladas. Las muestras fueron ordenadas en forma creciente de niveles de anticuerpos.

bajos mayoritariamente en color azul. Se puede observar que la distribución de títulos en los donantes analizados de los dos grupos (con síntomas leves o severos) es diferente (Figura 2).

En estudios clínicos realizados para evaluar la utilidad de plasmas de convalecientes se ha utilizado la estrategia de combinar plasmas en *pools*, incluyendo de 2 a 5 donantes [6]. La estrategia se usó con el fin de estandarizar y aumentar el título de anticuerpos en las dosis aplicadas. En relación a esto, se observó que la presencia de un único plasma con alto título dentro de un *pool* incrementó significativamente el título de anticuerpos de dicho *pool*. A modo de ejemplo, una muestra compuesta por iguales volúmenes de plasmas de cuatro donantes con títulos de IgG correspondientes a la inversa de 400, 800, 1.600 y 25.600 resultó en un *pool* de título equivalente a la inversa de 12.800, generando dosis de ese nivel de anticuerpos. El análisis de diseño de *pools* mostró que el empleo de un plasma con título alto aumenta el promedio de los títulos en las dosis preparadas. Teniendo en cuenta la importancia de identificar altos títulos de anticuerpos en los tratamientos con plasmas de convalecientes es relevante considerar esta estrategia con el fin de aumentar los títulos de IgG administrados.

Sistemas de medida de anticuerpos neutralizantes de la infección de SARS-CoV-2: La respuesta humoral frente a una infección viral genera anticuerpos específicos contra distintos componentes virales. Entre los anticuerpos generados existe un subgrupo dirigido a regiones del virus que cumplen funciones esenciales en el proceso de la infección. Estos anticuerpos capaces de bloquear una infección productiva se denominan anticuerpos neutralizantes y son marcadores de protección de la infección. Por este motivo es relevante evaluar la presencia de este tipo de anticuerpos tanto en personas infectadas como en personas vacunadas. Los ensayos que cuantifican dichos anticuerpos neutralizantes se basan en determinar la capacidad de un plasma o suero de impedir una infección.

En el caso de las infecciones por SARS-CoV-2, los anticuerpos neutralizantes están dirigidos principalmente contra la proteína estructural *spike*. La proteína *spike* tiene dos dominios: dominio S1 responsable de la unión al receptor celular (que incluye al dominio RBD) y el dominio S2 que contiene el péptido de fusión. Se ha demostrado que gran parte de los anticuerpos neutralizantes para SARS-CoV-2 están dirigidos a RBD [10]. Sin embargo, se han reportado anticuerpos contra otras regiones de la proteína *spike* capaces de bloquear la infección [12].

Los ensayos de neutralización se realizan evaluando la capacidad de un plasma o suero de inhibir la infección del virus SARS-CoV-2 en células susceptibles en cultivo.

Debido a que la manipulación del virus salvaje SARS-CoV-2 impone el requerimiento de bioseguridad de tipo 3 (BSL3) y limita la posibilidad de uso para evaluar muestras a gran escala, se desarrollaron sistemas simplificados que se basan en la construcción de virus quimera que contienen a la proteína *spike* en su superficie y utilizan el mecanismo *spike*-ACE2 para la entrada a la célula. Para esto se emplean distintos tipos de virus como

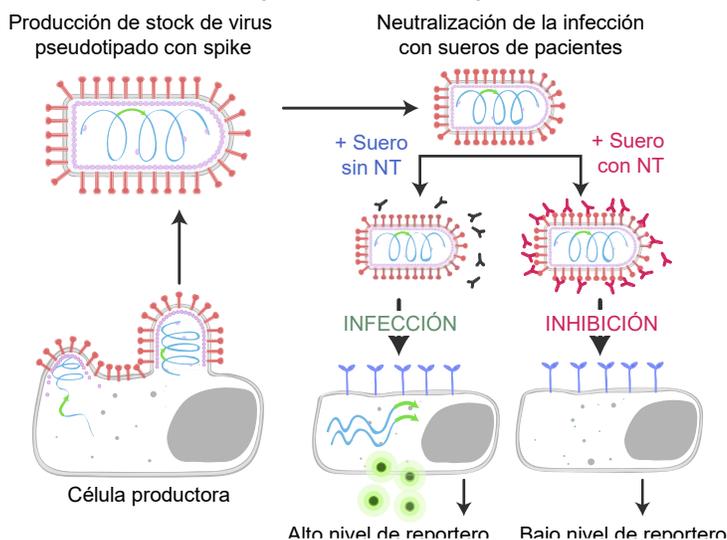


Figura 3. Representación esquemática del sistema de virus pseudotipados empleado para evaluar la actividad neutralizante de un plasma. A la izquierda se representa la producción del stock del virus y a la derecha se muestra el ensayo de neutralización y la medida de infección por medio de la expresión de una proteína reportera.

el virus de la estomatitis vesicular VSV o los lentivirus. A estos virus quimera se los llama virus pseudotipados o pseudovirus [13] y pueden ser manipulados en áreas con menor nivel de bioseguridad (BSL2) y por ende aplicarse a gran escala. Los stocks de pseudovirus se obtienen a partir de cultivos de células productoras que expresan a la proteína *spike* del SARS-CoV-2 (Figura 3). Para evaluar la capacidad neutralizante empleando estos sistemas, se incubó el suero o plasma con el stock de pseudovirus y luego se mide su infectividad. Para simplificar el análisis, se han desarrollado pseudovirus que incluyen genes reporteros que codifican proteínas con actividad enzimática como la luciferasa o que se pueden detectar como la proteína verde fluorescente GFP, y se usan como marcadores de infección (Figura 3). La disminución de expresión de luciferasa o GFP es un indicador de la inhibición de la infección.

Anticuerpos neutralizantes de la infección de SARS-CoV-2 y su correlación con títulos de IgG anti-spike: El test COVIDAR permite cuantificar la cantidad de anticuerpos de tipo IgG específicos contra la proteína *spike* en plasmas y sueros [14]. Sin embargo, es relevante determinar la fracción de anticuerpos neutralizantes de la infección, como un marcador de protección. Con el objetivo de evaluar la correlación entre anticuerpos totales contra la proteína *spike* y aquellos capaces de neutralizar la infección, se ensayaron 176 plasmas de donantes. Dentro de esta cohorte se incluyeron plasmas de donantes convalecientes y dosis preparadas para aplicaciones terapéuticas obtenidas de *pools* de plasmas de donantes convalecientes. Los ensayos de neutralización se realizaron empleando el virus pseudotipado CoV2pp-Luc que codifica para el gen de la luciferasa como indicador de la infección.

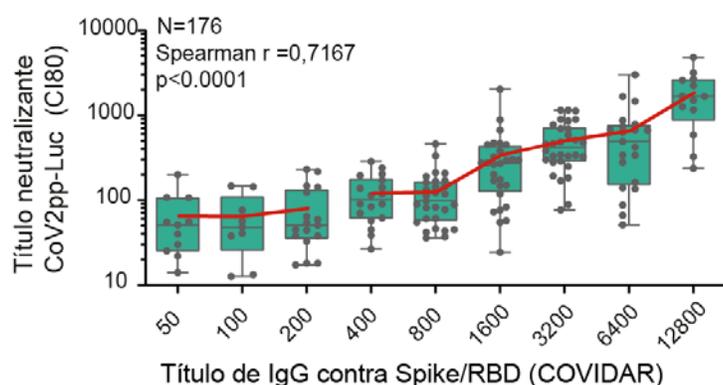


Figura 4. Correlación de títulos de IgG y actividad neutralizante empleando el sistema de virus pseudotipado CoV2pp-Luc ($n=176$). La recíproca de la concentración inhibitoria del 80% (CI80) se correlaciona con la recíproca del título de IgG medido a punto final con COVIDAR. Las cajas muestran la mediana, y la línea roja el promedio de los CI80% para cada título de IgG.

En este estudio se obtuvieron los títulos de IgG empleado el protocolo estandarizado de COVIDAR para las 176 muestras (manual de COVIDAR), y en forma paralela se determinó la inhibición de la infección con el virus CoV2pp-Luc. Se emplearon diluciones seriadas de los plasmas y se determinó la concentración inhibitoria del 80% de la infección (CI80%). Los datos

obtenidos fueron ajustados según el modelo de regresión de 4 parámetros que describe un patrón de respuesta sigmoidea. Como controles se empleó por un lado el virus pseudotipado en ausencia de plasma y por otro, células sin infectar. Cada determinación de CI80% fue el resultado de mediciones realizadas por triplicado. Los datos obtenidos de títulos de IgG fueron correlacionados con los valores de CI80% obtenidos para cada muestra (Figura 4).

Se observó que los plasmas de individuos convalecientes con títulos bajos de IgG, de 1/50 a 1/200, poseen títulos de anticuerpos neutralizantes de 16 a 132, lo cual indica que incluso las muestras con bajos niveles de IgGs presentan anticuerpos neutralizantes. Cabe mencionar que existe una variabilidad individual y que para cada título de IgG medido se ve un rango de CI80%. Sin embargo, los plasmas con alto título de IgG se asocian mayoritariamente a una elevada capacidad neutralizante.

Si bien se ha demostrado que la proteína *spike* es inmunodominante en relación a los anticuerpos neutralizantes y los virus pseudotipados recapitulan el proceso de entrada del SARS-CoV-2, es posible que un repertorio mayor de anticuerpos pueda actuar sobre el virus completo. Con el fin de comparar los distintos métodos disponibles, se utilizaron dos sistemas de pseudovirus y el sistema del virus SARS-CoV-2 salvaje midiendo la capacidad neutralizante de una cohorte de 34 plasmas. Para esto se emplearon dos pseudovirus: CoV2pp-Luc [15] y CoV2pp-GFP (que codifica para GFP) [16]. Los pseudovirus y el virus cepa salvaje se incubaron con los plasmas y se emplearon para infectar células en cultivo. La inhibición de la infección al 80% fue medida por efecto citopático (muerte celular) con el virus salvaje y por actividad de luciferasa o GFP para los virus CoV2pp-Luc y CoV2pp-GFP, respectivamente.

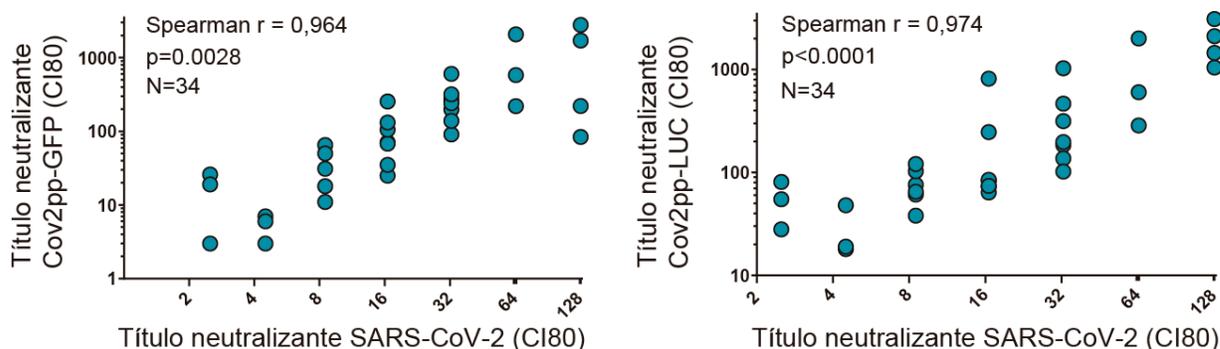


Figura 5. Correlación de actividad neutralizante empleando al virus cepa salvaje y dos sistemas de virus pseudotipados CoV2pp-GFP (izquierda) y CoV2pp-Luc (derecha). Se representa la recíproca de la concentración inhibitoria del 80% de la infección (CI80).

Los datos obtenidos fueron ajustados y se determinó la inhibición de la infección expresándola como CI80%. Cada determinación de CI80 corresponde al promedio de mediciones que fueron realizadas por triplicado (Figura 5).

Los resultados obtenidos indican una alta correlación positiva entre los niveles de anticuerpos neutralizantes medidos con el virus salvaje y los medidos con los dos virus pseudotipados. Se observa un coeficiente de correlación de Spearman con un $r=0,97$ para el sistema CoV2pp-Luc y con un $r=0,96$ para el sistema CoV2pp-GFP. Estos resultados indican que los métodos que emplean los sistemas de pseudovirus representan una herramienta valiosa para cuantificar la presencia de anticuerpos neutralizantes para SARS-CoV-2. Los valores absolutos obtenidos indican que los CI80% para CoV2pp-Luc y CoV2pp-GFP guardan una relación de 12 y 8, respectivamente, respecto a los valores obtenidos de CI80% para la cepa salvaje. Esta relación es importante cuando se comparan datos obtenidos con distintos sistemas.

Por último se compararon los títulos de IgG medidos por COVIDAR con la capacidad neutralizante de las 34 muestras, medida con el virus salvaje SARS-CoV2 (Figura 6). Los resultados obtenidos muestran una alta correlación positiva entre título de IgG total y los valores de CI80% medidos por efecto citopático del virus salvaje. El coeficiente de correlación de Spearman mostró un $r=0,78$. Estos resultados sostienen que las titulaciones de IgG totales contra *spike* empleando COVIDAR son altamente informativos para estimar la capacidad neutralizante presente en suero o plasmas de persona que han sido infectadas con SARS-CoV-2.

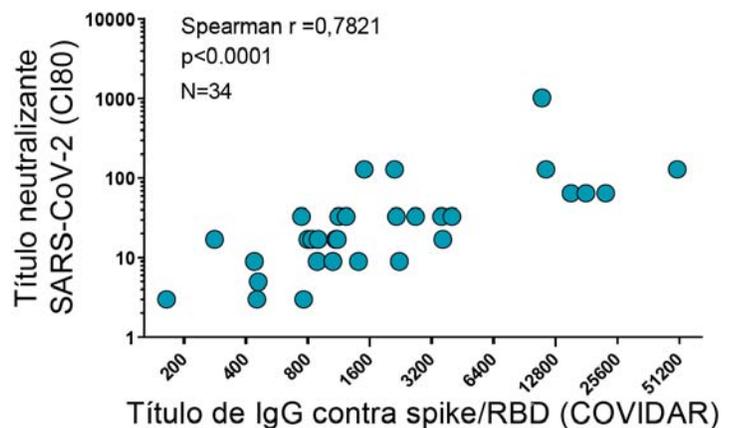


Figura 6. Correlación de títulos de IgG y actividad neutralizante empleando el virus SARS-CoV-2 cepa salvaje. El gráfico representa la correlación de la recíproca de la concentración inhibitoria al 80% (CI80%) de la infección y la recíproca del título de IgG medido a punto final con COVIDAR.

CONCLUSIÓN

El presente informe provee protocolos estandarizados e información sobre la evaluación de anticuerpos de tipo IgG totales contra la proteína *spike* y su correlación con la actividad neutralizante de la infección medidos en cohortes de muestras de individuos SARS-CoV-2 positivos de nuestro país. El análisis aquí presentado nos permite concluir que la titulación de anticuerpos mediante el uso del reactivo COVIDAR IgG es una herramienta útil para realizar estudios en forma descentralizada y obtener información para la selección de plasma de donantes convalecientes y para otros estudios que requieran cuantificación de anticuerpos contra SARS-CoV-2. Los protocolos estandarizados y los reactivos COVIDAR se encuentran a disposición de las autoridades sanitarias para su uso en la forma que éstas lo requieran.

REFERENCIAS

1. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, 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. *Lancet*. 2020;396: 467–478. doi:10.1016/S0140-6736(20)31604-4
2. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine*. 2020. doi:10.1056/NEJMoa2034577
3. Yong SEF, Anderson DE, Wei WE, Pang J, Chia WN, Tan CW, et al. Connecting clusters of COVID-19: an epidemiological and serological investigation. *Lancet Infect Dis*. 2020;20: 809–815. doi:10.1016/S1473-3099(20)30273-5
4. Logunov DY, Dolzhikova I V., Zubkova O V., Tukhvatullin AI, Shcheblyakov D V., Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396: 887–897. doi:10.1016/S0140-6736(20)31866-3
5. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* (London, England). 2020; 99–111. doi:10.1016/S0140-6736(20)32661-1
6. Simonovich VA, Burgos Pratz LD, Scibona P, Beruto M V., Vallone MG, Vázquez C, et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020 [cited 15 Dec 2020]. doi:10.1056/nejmoa2031304
7. Libster R, Marc GP, Wappner D, Coviello S, Bianchi A, Braem V, et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. 2021; 1–9. doi:10.1056/NEJMoa2033700
8. Gonzalez SE, Regairaz L, Ferrando NS, Estenssoro E. Terapia Con Plasma De

Convalecientes En Pacientes Covid-19 En La Provincia De Buenos Aires. 2020;80: 8.

9. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; NEJMoa2031893. doi:10.1056/NEJMoa2031893
10. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020;183: 1024-1042.e21. doi:10.1016/j.cell.2020.09.037
11. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181: 281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
12. Sauer MM, Alexandra Tortorici M, Park Y-J, Walls AC, Homad L, Acton O, et al. Structural basis for broad coronavirus neutralization. *bioRxiv*. 2021; 2020.12.29.424482. doi:10.1101/2020.12.29.424482
13. Khoury DS, Wheatley AK, Ramuta MD, Reynaldi A, Cromer D, Subbarao K, et al. Measuring immunity to SARS-CoV-2 infection: comparing assays and animal models. *Nature Reviews Immunology*. *Nature Research*; 2020. pp. 727–738. doi:10.1038/s41577-020-00471-1
14. Ojeda DS, Gonzalez Lopez Ledesma MM, Pallarés HM, Costa Navarro GS, Sanchez L, Perazzi B, et al. Emergency response for evaluating SARS-CoV-2 immune status, seroprevalence and convalescent plasma in Argentina. Diamond MS, editor. *PLOS Pathog*. 2021;17: e1009161. doi:10.1371/journal.ppat.1009161
15. Oguntuyo KY, Stevens CS, Hung C-T, Ikegame S, Acklin JA, Kowdle SS, et al. Quantifying absolute neutralization titers against SARS-CoV-2 by a standardized virus neutralization assay allows for cross-cohort comparisons of COVID-19 sera. (*mBio* en prensa 2021)
16. Case JB, Rothlauf PW, Chen RE, Liu Z, Zhao H, Kim AS, et al. Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020;28: 475-485.e5. doi:10.1016/j.chom.2020.06.021