

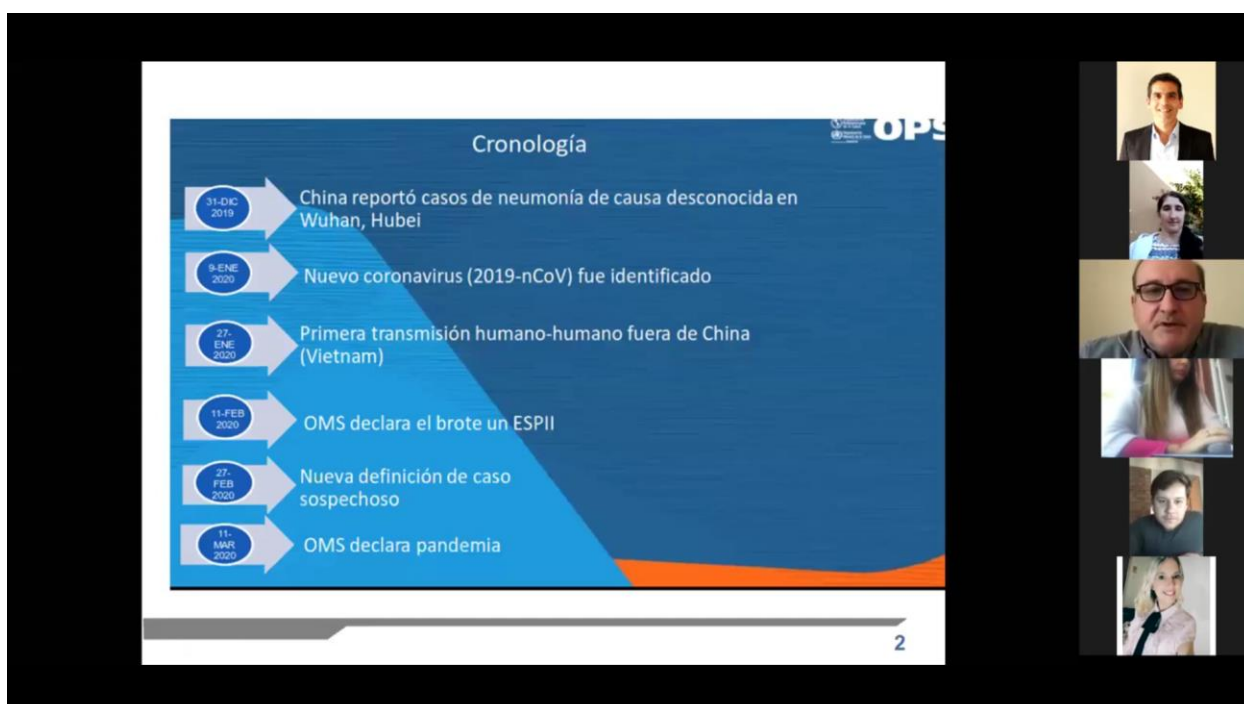


Expositor: **Daniel Alberto Allemandi**

Universidad Nacional de Córdoba – Facultad de Ciencias Químicas

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica

Conferencia completa en: <https://www.youtube.com/watch?v=zp7rSrNrQSY>



### Distribución geográfica de casos COVID-19, 26 de Abril 2020

**GLOBAL**

Casos confirmados  
**2.856.015**

Muertes  
**202.680**

Países  
**212**

Actualización permanente mapa:  
<https://covid19.who.int/>

3



### Charla Allemandi Hemoderivados

#### Curva epidémica COVID-19, al 26 de abril.

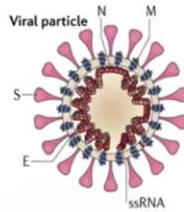
- La incidencia diaria de casos parece estar disminuyendo en España, Italia, Austria y Alemania en comparación con marzo.
- En Asia (Bangladesh, India y Pakistán) continúan viendo aumentos constantes.
- Singapur continúa informando un número cada vez mayor de casos nuevos a diario, y la mayoría de ellos entre los residentes de dormitorios de trabajadores migrantes que han estado acelerando su brote.
- China no ha reportado fallecidos en los últimos 9 días.

4

4:38 / 52:25



**CARACTERISTICAS DE SARS-CoV-2**



El tamaño de los viriones de SARS-CoV-2 es de aproximadamente **50 a 200 nm de diámetro**, y su genoma es de **ARN** monocatenario de sentido positivo. SARS-CoV-2 esta filogenéticamente muy relacionado a SARS-CoV (79,6% identidad genómica) Consta de **cuatro proteínas estructurales** características de los coronavirus:

- ❖ **Proteína S** (glicoproteína cuyo ensanchamiento distal de sus pliegues forma las puntas de la superficie),
- ❖ **Proteína E** (pequeña proteína de la envoltura),
- ❖ **Proteína M** (proteína de la matriz que une la envoltura con el núcleo vírico) y
- ❖ **Proteína N** (fosfoproteína de la nucleocápside)

La **proteína S** contienen el dominio de unión al receptor celular (**RBD**) y juega un rol clave en el proceso de infección siendo el principal antígeno con capacidad de generar anticuerpos neutralizantes

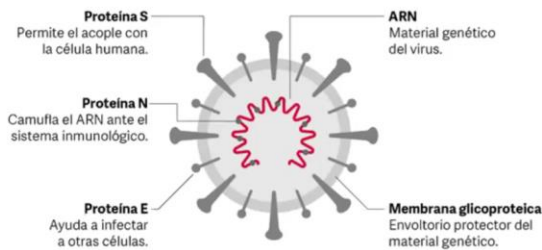
A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. Huang et al <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>doi: medRxiv preprint



**Como actúa el coronavirus**

El virus que causa Covid-19 ingresa al cuerpo a través de la nariz, la boca o los ojos. El período de incubación oscila entre 1 y 14 días, y en general se sitúa en torno a los 5.

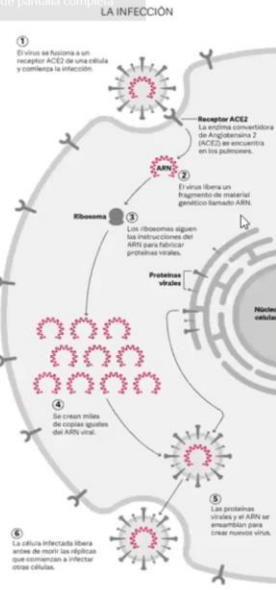
**EL VIRUS**



## PATOGENIA DE SARS-CoV-2

1. **Proteína S** interacciona con receptor celular **ACE2**.
2. Endocitosis y liberación de la **nucleocápside (N)** al citoplasma.
3. Genoma del virus (ARN) queda libre en el citoplasma.
4. Replicación y transcripción.
5. Ensamble en nuevos virus.
6. Muerte celular y liberación de réplicas.

SARS and MERS: recent insights into emerging corona viruses. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. Nat Rev Microbiol. 2016 Aug;14(8):523-34).



## Charla Allemandi Hemoderivados

### ANTICUERPOS - INMUNIDAD

La inmunidad contra las infecciones virales es mediada por una combinación de mecanismos inmunes humorales (Acs) y celulares (macrófagos, mastocitos, células NK).

Los **anticuerpos** contribuyen a la inmunidad de tres formas distintas:

- **Neutralización**: impiden que los patógenos entren en las células o las dañen al unirse a ellas
- **Opsonización**: estimulan la eliminación de un patógeno mediante los macrófagos y otras células (fagocitosis).
- **Lisis**: estimulan otras respuestas inmunes como por ej. la vía del complemento.

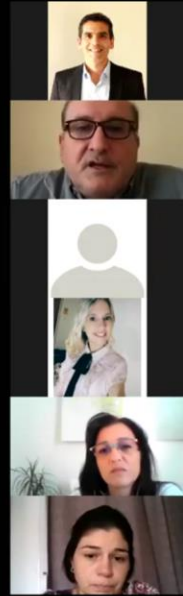
**Los Acs NEUTRALIZANTES son muy importantes porque bloquean el progreso de la infección por lo tanto son PROTECTORES**

8

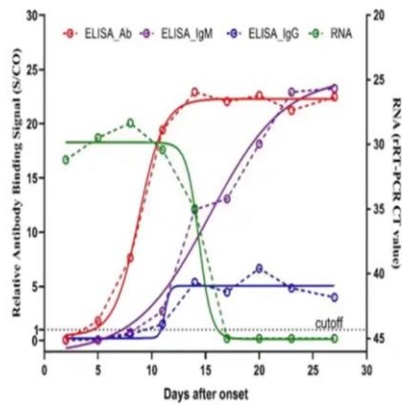
## INMUNIDAD EN COVID 19

- Generación de **anticuerpos neutralizantes** (modelos animales como en casos humanos)\*.
- China: evidencia en animales de generación de anticuerpos.
- Respuesta inmune en humanos (**diferentes antígenos virales**: NP, la proteína S o el RBD).
- Anticuerpos totales (Ab), IgM e IgG, con una sensibilidad creciente en el curso de la infección, siendo mayor del 90% a la segunda semana tras el inicio de los síntomas.
- Relevante: **dinámica de generación de anticuerpos.**

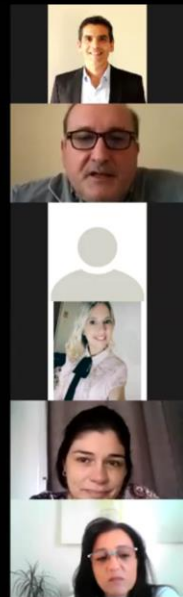
\*Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. Lou et al. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20041707> China  
 \*SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. Okba et al. medRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059> Holanda  
 \*Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. Fan Wu et al <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>



## Dinámica de la aparición de Anticuerpos totales, IgM e IgG, en 80 pacientes con COVID 19, diagnosticados por RT-PCR, desde el inicio de los síntomas



- Métodos:**
- 3 ELISA (ELISA-Ab, ELISA-IgM and ELISA-IgG),
  - 3 Lateral-flow immunoassays (LFIA-Ab, LFIA-IgM and LFIA-IgG)
  - 2 Chemiluminescence microparticle immunoassays (CMIA-Ab and CMIA-IgM)



## DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS (Acs) ANTI COVID 19

### Neutralización (Gold Standard)

- ❑ Se determinan Acs neutralizantes.
- ❑ Cultivo de células (VeroE6) y cabina de seguridad (BSL III)
- ❑ Cepa viral replicante (ciclo 4-7 días)
- ❑ Muy específica y sensible
- ❑ Incubación 7-10 días
- ❑ Alternativa: Técnica con pseudovirus + IF.

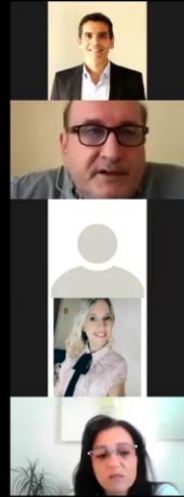
### Enzimoanálisis (ELISA)

- ❑ Acs totales, IgM, IgA e IgG
- ❑ Equipamiento de mediana complejidad (lector placas, lavador placas)
- ❑ Controles positivos (plasma de recuperados, Ac Monoclonales) y negativos (prepandemia)
- ❑ Elevada sensibilidad (mas 90%, 14-20 días)
- ❑ Especificidad variable (87-100%) dependiendo del Ag empleado (RBD, Prot S, Prot N)
- ❑ Tiempos de realización (3 hs aproximadamente)
- ❑ Medición por DO y puede ser semicuantitativa (diluciones)

### Test rápidos (lateral flow)-POC

- ❑ Presencia/ausencia de IgM/IgG frente a un Control
- ❑ Rápido y sencillo (15 min)
- ❑ Mínima cantidad de sangre capilar.
- ❑ Riesgo de falsos negativos en fases tempranas. Variabilidad en la respuesta IgM e IgG.
- ❑ Riesgo de falsos positivos si el paciente ha estado expuesto a otros coronavirus.
- ❑ Calidad discutida (<30% en algunos casos)
- ❑ Bajo rendimiento.

11



## Charla Allemandi Hemoderivados

## DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS (Acs) ANTI COVID 19

### Kits para pruebas serológicas para COVID-19

<https://www.argentina.gob.ar/noticias/reactivos-covid-19>

#### Pruebas serológicas para COVID-19 - test rápidos

Se utilizan en entornos de investigación epidemiológica y no de diagnóstico.

TEST	MARCA (ORIGEN)	METODO
2019-nCoV Ab Test (colloidal gold)	Innovita (Tangshan) Biological Technology Co., (China)	Test Rápido - Inmunocromatográfico
Diagnostic Kit for IgM/IgG Antibody to Corona Virus (nCoV-2019) (colloidal gold)	Zhuhai Lixun Diagnostics, Inc.	Test Rápido - Inmunocromatográfico

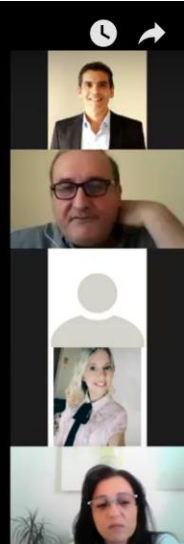


La performance de estos kits ha sido muy discutida en Europa (España y Reino Unido) y en algunos casos se han retirado más de 8.000 kits de prueba procedentes de China debido a resultados dudosos.

Más de una docena de compañías que han notificado a la FDA que están produciendo pruebas de anticuerpos están autorizadas a distribuir las pruebas a hospitales y centros médicos, pero deben incluir la leyenda "Esta prueba no ha sido revisada por la FDA". La exactitud y la fiabilidad no se garantizarán sin validación y experiencia a lo largo del tiempo. FDA ha aprobado hasta ahora una prueba de este tipo, de la compañía Cellex

12

27:22 / 52:25



Pulsa Esc para salir del modo de pantalla completa

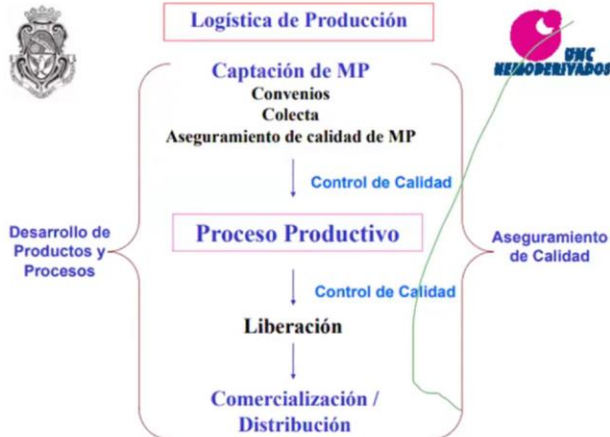
### PROYECTO PARA LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINA ANTI CORONAVIRUS COVID-19 CON FINES TERAPÉUTICOS

- SUBPROYECTO I: Elaboración de **Gammaglobulina Poli-específica Enriquecida**, a partir de plasma de convalecientes de Infección por COVID-19.
- SUBPROYECTO II: Desarrollo y Registro de **Gammaglobulina Específica** para COVID-19



### Esquema integral

Pulsa Esc para salir del modo de pantalla completa



### Principales características del Proceso Gammaglobulina T UNC

- **Captación de Materia Prima:** recepción de unidades de plasma sometidas a controles serológicos obligatorios y con resultado No reactivo  
Reanálisis en el Laboratorio previo a su ingreso para el fraccionamiento plasmático proceso de fraccionamiento.
- **Proceso Productivo:**
  - La IgG se purifica por **fraccionamiento alcohólico** a través de los métodos 6 y 9 de Cohn Oncley, sin conservantes microbianos y en condiciones controladas de etanol, pH, fuerza iónica y temperatura. **Obtención de Fracción II**(IgG de pureza requerida)
  - La Fracción II disuelta se somete a **calentamiento** en solución acuosa con Sorbitol como estabilizante a 60 °C por un tiempo de 10 hs. para destrucción viral con Sorbitol como estabilizante.
  - En la Formulación final se agregan **Glicina** como estabilizante y **Tiomersal** como conservante
  - Se somete la solución a **filtración esterilizante** y posteriormente se dosifica en proceso de **envasado aséptico**

15

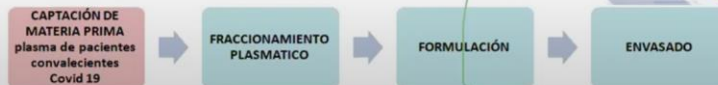
▶ 39:38 / 52:25



### PROCESO DE ELABORACIÓN DE GAMMAGLOBULINA T UNC

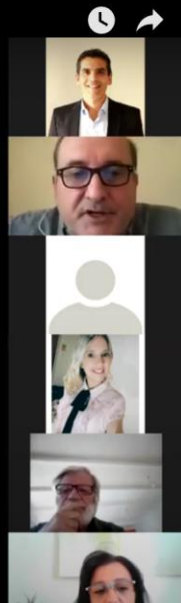


### PROCESO DE ELABORACIÓN DE GAMMAGLOBULINA POLIESPECÍFICA ENRIQUECIDA



1 Salir del modo de pantalla completa (f)

⏸ 43:19 / 52:25





### Ensayo clínico sobre uso de plasma de pacientes recuperados de COVID-19

Cabe señalar que el ensayo clínico nacional que se pondrá en marcha es de carácter experimental, ya que al momento no existe información científica que demuestre que los beneficios del empleo del plasma de convalecientes para tratar enfermos de coronavirus supere sus riesgos.

El estudio permitirá disponer de información sistematizada y de un monitoreo permanente, que en poco tiempo posibilitará lograr información sobre su seguridad y eficacia terapéutica.

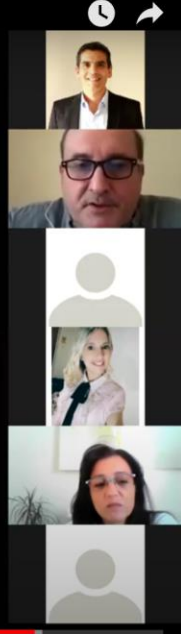
El pasado 17 de abril, mediante la Resolución 783/2020 publicada en el Boletín Oficial, el Ministerio de Salud aprobó el "Plan Estratégico para regular el uso del plasma de pacientes recuperados de COVID-19 con fines terapéuticos", que coordina la Secretaría de Calidad en Salud a través de la dirección de Medicina Transfusional con tres líneas de acción a partir del plasma de convalecientes.

**Entre las mismas se estipula el desarrollo del ensayo clínico nacional; la producción de gammaglobulina hiperinmune en colaboración con la Universidad Nacional de Córdoba; y la promoción del desarrollo de proyectos de investigación en un trabajo colaborativo entre la cartera sanitaria nacional y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.**

<https://www.argentina.gob.ar/noticias/pacientes-recuperados-de-covid-19-podran-inscribirse-en-seis-centros-de-salud-para-donar>

18

46:50 / 52:25



### Aspectos críticos

- Logística de la captación de materia prima
- Adecuación de los procesos de producción.
  - Escalado.
  - Equipos.
  - Validaciones.
- Aspectos regulatorios.
- Organigrama de producción.

1 Salir del modo de pantalla completa (f)

48:39 / 52:25

