

Nombre del Estudio:

Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti SARS-CoV-2 y eficacia posterior a la vacunación con vectores virales no replicantes o a virus inactivado en pacientes trasplantados hepáticos

Investigadores:

Manuel Mendizabal¹, Margarita Anders², Mirna Bigliome³ y Ezequiel Mauro⁴

Sitio:

¹ Unidad de Hígado y Trasplante Hepático, Hospital Universitario Austral, Pilar. Pcia. de Buenos Aires. Argentina

² Unidad de Hígado y Trasplante Hepático, Hospital Alemán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, INBIRS UBA-CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

⁴ Sección Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

1. Introducción

La infección por el virus SARS-CoV-2 causa en el humano principalmente cuadros respiratorios leves y, en general, con una baja tasa de letalidad (1). Sin embargo, en cierto grupo de pacientes se manifiesta en formas graves como neumonía grave, síndrome de distress respiratorio, disfunción multiorgánica y muerte. Los factores asociados a peor pronóstico son personas mayores de 60 años, presencia de diabetes, enfermedad cardiovascular, obesidad, enfermedad hepática avanzada y enfermedad renal crónica (2,3). En los receptores de trasplantes de órganos sólidos (TOS), el grado de inmunosupresión se correlaciona con la gravedad de diversas enfermedades infecciosas, lo que llevó a la especulación inicial de que el receptor de TOS puede ser más propenso a presentar un curso grave de infección por COVID-19. Sin embargo, aunque el riesgo de mortalidad en los receptores de TOS parecería ser mayor que en la población general, esto no se ha podido comprobar de forma universal, siendo la presencia de comorbilidades previamente descritas las más relacionadas al desarrollo de formas graves (4,5).

Los esfuerzos mundiales en el desarrollo y la evaluación clínica de las vacunas contra el SARS-CoV-2 han avanzado a un ritmo sin precedentes. Se están explorando varios tipos de vacunas con diferentes perfiles de seguridad e inmunogenicidad (6). Los ensayos clínicos que evaluaron la eficacia y la seguridad de las vacunas contra el SARS-CoV-2 excluyeron a pacientes receptores de un TOS. Recientemente, se han reportado estudios evaluando la inmunogenicidad en TOS vacunados con ARNm. En estos estudios, la detección de anticuerpos contra la proteína Spike ronda del 4%-15% luego de la primera dosis y asciende a 34%-54% luego de la segunda (7,8). Estos resultados son sensiblemente inferiores a los reportados en la población general. Por lo tanto, otros investigadores han evaluado la aplicación de una 3ra dosis, alcanzando tasas de respuesta del 68% (9). Interesantemente, los individuos que recibieron un trasplante hepático presentaron mayor respuesta humoral que los que recibieron otros órganos. Se especula que esto podría estar relacionado al uso de menores niveles de inmunosupresión para evitar el rechazo del injerto (7,8,10).

La evaluación de la respuesta humoral en pacientes TOS inmunizados con vacunas que utilizan vectores virales no replicantes o virus inactivados es cuando menos muy escasa. Al momento contamos solo con el reporte de 12 pacientes TOS que recibieron una dosis única de la Ad26.COV2.S (Janssen) (11). Luego de una media de 33 días solo dos pacientes presentaron anticuerpos detectables en sangre, sin poder conocer la eficacia neutralizante de los mismos. Al momento, no se han descrito resultados de sujetos TOS que hayan sido vacunados con vacunas a virus inactivado, tanto en materia de desarrollo de anticuerpos, así como tampoco su capacidad neutralizante. El desarrollo de nuevas estrategias de detección de anticuerpos de isotipo IgG anti antígeno Spike del SARS-CoV-2 en suero o plasma humano mediante ensayo ELISA, así como la detección de la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti SARS-CoV-2 del paciente a la unión RBD/ACE2, también mediante ensayo ELISA, resultan vitales en el control de la eficacia de la inmunización.

En el escenario descrito, el presente estudio tiene por objetivo evaluar la respuesta humoral y la eficacia neutralizante de los anticuerpos de pacientes trasplantados hepáticos que hayan sido inmunizados para SARS-CoV-2 con vacunas a vectores virales no replicantes o a virus inactivados.

2. Propósito del Estudio

Evaluar la respuesta humoral y la capacidad neutralizante de los anticuerpos, en pacientes trasplantados hepáticos inmunizados para SARS-CoV-2 con vacunas a vectores virales no replicantes o a virus inactivados.

2.1 Objetivo primario

Determinar la proporción de pacientes TH que desarrollan de anticuerpos IgG contra la proteína Spike luego de recibir 2 dosis de alguna vacuna COVID-19 en comparación con controles inmunocompetentes.

2.2 Objetivos secundarios

- I. Determinar y comparar entre casos y controles los niveles cuantitativos de anticuerpos IgG.
- II. Determinar y comparar de forma cuantitativa la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti SARS-CoV-2 del paciente a la unión RBD/ACE2
- III. Identificar factores independientemente asociados a la no generación de anticuerpos post-vacunación.
- IV. Determinar la variación en los niveles de anticuerpos IgG contra la proteína Spike en pacientes trasplantados hepáticos a las 3-12 semanas de la 2da dosis de alguna vacuna COVID-19 y a los 12 meses, globalmente y para cada tipo de vacuna administrada.
- V. Evaluar la proporción de pacientes infectados con SARS-CoV-2 luego de la vacunación.
- VI. Describir la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 luego de la vacunación.

3. Materiales y Métodos:

3.1 Escenario

Estudio observacional y prospectivo de pacientes trasplantados hepáticos que fueron vacunados con 2 dosis contra el COVID-19 en diferentes instituciones de Argentina. El estudio es considerado de interés por la comunidad trasplantológica debido a la poca información disponible sobre la respuesta inmune en TOS que fueron vacunados en nuestro país.

3.2 Diseño

Estudio observacional de casos y controles anidado en una cohorte prospectiva de pacientes que recibieron inmunización completa contra el SARS-CoV-2 y fueron trasplantados hepáticos o no.

3.3 Escenario y temporalidad

El estudio se desarrollará en Argentina desde el 01/08/21 hasta el 01/08/22.

3.4 Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Firma del consentimiento informado
3. Pacientes que hayan recibido un trasplante hepático
4. Pacientes que hayan recibido ambas dosis de vacuna anti-SARS-CoV-2 hace mas de 21 días.

Criterios de Exclusión

1. Pacientes que hayan tenido COVID19 confirmado con PCR
2. Pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana.
3. Pacientes con enfermedad oncológica activa
4. Pacientes trasplantados que reciben inmunosupresores diferentes a los inhibidores de calcineurina, mTOR, antimetabolitos o corticoesteroides

3.5 Criterios de selección de casos y controles

El proceso de selección de los casos y controles será previo a la recolección de sangre y será ciego para los resultados de anticuerpos.

Casos: pacientes trasplantados hepáticos que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

Controles: pacientes inmunocompetentes que no hayan tenido COVID19 previo y ni hayan recibido algún tratamiento inmunosupresor en los 3 meses previos.

3.6 Recolección de muestras

La recolección de suero será realizada en el laboratorio del centro INBIRS (UBA-Conicet). Se tomará una muestra entre las 3 y las 12 semanas de recibida la 2da dosis de la vacuna y al año de la vacunación. Se almacenará suero de los pacientes en un tubo seco (ej: tubo amarillo Vacutainer®) y se guardará en freezer entre -08°C y -80°C. Las muestras se almacenarán hasta dos años después de finalizado el estudio.

3.7 Dosaje de anticuerpos

1. Serológico: se evaluará la presencia de anticuerpos anti Spike en cada muestra mediante el uso de test COV19GSPIKE.CE, ensayo de tipo ELISA, que detecta anticuerpos de isotipo IgG anti antígeno Spike del SARS-CoV-2 en suero o plasma humano (DIA.PRO, Milán). Los resultados se expresarán en forma semicuantitativa con un Index (valor de la muestra/valor cut off) o bien en forma cuantitativa en UI/ml (1st WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin NIBSC code 20/136)
2. En aquellos que han desarrollados anticuerpos, se valorará la capacidad neutralizante mediante ACE2-RBDNEUTR.CE: Es un ensayo ELISA, que detecta la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti SARS-CoV-2 del paciente a la unión RBD/ACE2. Los resultados se expresarán como Index o bien en forma semicuantitativa realizando titulación.

4. Metodología del estudio

Los centros participantes identificarán a los pacientes trasplantados que cumplan los criterios de selección durante el período de estudio. Serán contactados vía telefónica o por correo electrónico para ofrecerles la posibilidad de participar del estudio. Se confeccionará un formulario específico codificado para el registro de datos los cuales serán volcados posteriormente a una base de datos informatizada para su posterior análisis. Las variables de exposición incluidas en el formulario serán recolectadas por los médicos investigadores.

El siguiente estudio se realizará siguiendo las recomendaciones internacionales para estudios observacionales guías STROBE (12).

4.1 Potenciales Sesgos y Variables confundidoras

- Sesgo de selección: para evitar dicho sesgo en la selección de casos y controles, se incluirán sujetos de 3 centros de trasplante de referencia en la Argentina y que son seguidos y tratados bajo mismos estándares de cuidados. Se incluirán pacientes con los criterios de selección antes mencionados, con un modo de muestreo no probabilístico consecutivo tanto para casos como controles. Se registrarán las aceptaciones y declinaciones a participar en este estudio, tanto para casos y controles con el fin de evitar sesgo de selección.
- Sesgo de casos: la definición de caso será realizada por un investigador ciego al resultado del estudio de anticuerpos IgG.
- Sesgo de controles: la definición de controles será realizada por un investigador ciego al resultado del estudio de anticuerpos IgG.
- Sesgos de información y selección: todas las mediciones de anticuerpos IgG y su capacidad neutralizante serán realizadas en un mismo laboratorio, en este caso INBIRS para todos los pacientes.
- Potenciales confundidores: Para evitar el efecto de potenciales confundidores, se realizará un emparejamiento o *matching*. Por cada caso, se seleccionará al menos un control, pareados según edad, sexo y tiempo desde la segunda dosis de vacunación. Esta selección de casos y controles se realizará de manera ciega e independiente de los resultados de anticuerpos IgG.

5. Variables del estudio

Ver ficha de recolección de datos (ANEXO I).

6. Análisis estadístico

Hipotesis nula: la proporción de que desarrollan anticuerpos IgG contra la proteína Spike luego de recibir 2 dosis de alguna vacuna COVID-19 es similar entre personas que recibieron un TH y los que no.

Hipótesis alternativa: la proporción de que desarrollan anticuerpos IgG contra la proteína Spike luego de recibir 2 dosis de alguna vacuna COVID-19 es diferente entre personas que recibieron un TH y los que no.

Las variables dicotómicas se expresarán en frecuencias o proporciones y se compararán mediante test de Chi cuadrado o test de Fisher, según corresponda. Para las variables numéricas continuas se expresarán de acuerdo con su distribución como medias (desvío estándar) o medianas (rango intercuartilo), y se compararán mediante test T Student o Wilcoxon, según corresponda. Para comparar los títulos de IgG se empleará un modelo de ecuaciones de estimación generalizadas. Se realizará un análisis de regresión logística para evaluar la asociación de factores asociados con la respuesta de anticuerpos. Las variables que presenten un valor de $p < 0.1$ en el análisis univariado o aquellas con relevancia clínica y bioquímica serán incluidas en el análisis multivariado. Los resultados se presentarán en Odds Ratio, intervalo de confianza (IC) 95% y valores de P. La correlación entre IgG y el logaritmo de anticuerpos neutralizantes se analizará utilizando la correlación de Spearman con t-test paramétrico dos colas e IC 95%. Todos los análisis estadísticos antes mencionados se realizarán mediante STATA versión 12.0. Un valor de $p < 0.05$ se considerará estadísticamente significativo.

6.1 Tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se basa en una proporción de desarrollo de anticuerpos por encima del umbral esperado de 41.8% (IC 95% 34%-54%) según lo mencionado en la literatura hasta el momento (7-10). Dado que el IC 95% de la prevalencia esperada de respuesta humoral a la vacunación contra el COVID19 es amplia y basada en reportes que incluyeron pocos pacientes, se tomó un valor estadístico a dos colas, tipo I de 5% (valor de $p < 0.05$), un poder tipo II de 0.10 (poder de 90%). Se estimó un tamaño muestral de 82 pacientes vacunados con dos dosis. Ajustando por un 20% de pérdidas de seguimiento, el cálculo de tamaño muestral mínimo es de 96 personas.

7. Consideraciones Éticas.

El protocolo del estudio ha sido desarrollado según normas nacionales previstas para requisitos éticos, legales y jurídicos, establecidos en la Resolución Ministerial 1480/11 e internacionales acorde a las guías STROBE y según criterios éticos de la Declaración de Helsinki 2013, código de Núremberg, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO 1997. Así como los estándares de GCP ("Good Clinical Practice" o Buenas Prácticas Clínicas). Se mantendrá estrictamente la confidencialidad de todos los datos de cada individuo mediante su codificación. La identidad de los pacientes será reemplazada por claves numéricas generadas al azar. Los pacientes serán invitados a participar por vía telefónica y el consentimiento informado será enviado y devuelto firmado por correo electrónico.

8. Financiación

El presente estudio no cuenta con el financiamiento de aportes privados ni públicos. Los kits para la evaluación de anticuerpos serán otorgados por BIOARS. S, y la evaluación de los mismos mediante INBIRS (UBA-Conicet). Su realización no generará gastos para los centros participantes ni para los pacientes.

9. Autoría

Estará definida por la cantidad de pacientes enrolados por cada centro y el trabajo realizado. El orden de los autores será acorde al número de pacientes incluidos. A su vez, se incluirán autores por el trabajo de coordinación, manejo de datos y análisis estadístico. Se planea un máximo de 20 autores. El resto de los investigadores serán incluidos en "agradecimientos" pudiendo aparecer como un grupo de autores múltiples en PubMed, de acuerdo con la revista científica que publique los resultados. En caso de modificarse esta disposición deberá ser acordado previamente con todos los involucrados.

10. Cronograma preliminar de actividades.

Se realizará una reunión científica entre los coordinadores del estudio, los investigadores principales y subinvestigadores de cada centro participante. Será vía ZOOM y contemplará la información inherente al desarrollo del estudio, modo explicativo descriptivo y detallado de todo el protocolo. Asimismo, se discutirán y evaluarán preguntas e inquietudes de los investigadores involucrados. Duración de la reunión: 2 horas, fecha a definir.

Cronograma de actividades inherentes al estudio:

5. Fase de reclutamiento 1-9 meses: se registrarán las variables a evaluar en el sistema informático creado especialmente para este estudio.
6. Fase de evaluación de resultados 1-3 meses: fin del estudio y mediciones de variables finales. Eventualmente se contactará a aquellos centros donde la carga de datos este incompleta o se presenten dudas.

Mes	1-9	10	11	12	13
Recolección de datos	X				
Validación de los datos		X	X		
Análisis de los datos		X	X		
Informe preliminar			X	X	
Difusión				X	X
Publicación					X

11. Difusión de Resultados

El análisis de los datos estará a cargo de los investigadores del estudio. Se difundirán los resultados de este proyecto en diferentes congresos médicos de jerarquía a nivel nacional e internacional, incluso en lengua inglesa. Los métodos de difusión serán en formato póster u oral, según corresponda. Se evaluará la posibilidad de divulgar resultados preliminares a medida que avance la investigación. La elección del congreso donde se presentarán los resultados dependerá del

momento en el que se obtengan los resultados, sean preliminares o finales, y las fechas límites para la presentación de trabajos. Finalmente, los resultados finales del proyecto serán enviados a una revista científica con evaluación por pares. La difusión de los resultados deberá estar autorizada previamente por todos los investigadores participantes.

12. Referencias

1. Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:1708–1720. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32109013>
2. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: Prospective observational cohort study. *BMJ* 2020;369:1–12.
3. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area.. *JAMA* 2020;323:2052–9.
4. Danziger-Isakov L, Blumberg EA, Manuel O, *et al.* Impact of COVID-19 in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2021;21:925–937.
5. Kates OS, Haydel BM, Florman SS, *et al.* Coronavirus Disease 2019 in Solid Organ Transplant: A Multicenter Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 2020;6174:1–10.
6. Logunov DY, Dolzhikova I V., Shcheblyakov D V., *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021;397:671–681.
7. Marion O, Bello A Del, Couat C, *et al.* Safety and Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplants. *Ann. Intern. Med.* 2021 [en prensa].
8. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, *et al.* Antibody response to 2-dose sars-cov-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA* 2021;325:2204–2206.
9. Kamar N, Abravanel F, Marion O, *et al.* Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* 2021. [en prensa].
10. Rabinowich L, Grupper A, Baruch R, *et al.* Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J. Hepatol.* 2021 [en prensa].
11. Boyarsky BJ, Chiang TP-Y, Ou MT, *et al.* Antibody Response to the Janssen COVID-19 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients. [Internet]. *Transplantation* 2021 [en prensa].
12. Elm E Von, Altman DG, Egger M, *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement : guidelines for reporting observational studies. *Lancet* 2007;370:1453–1457.