



Universidad Nacional de Loja

Facultad de la Salud Humana

Carrera de Laboratorio Clínico

Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID -
19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad
Nacional de Loja

**Trabajo de Integración
Curricular previo a la
obtención del título de
Licenciada en
Laboratorio Clínico**

AUTORES:

Jarellys Carolina Eras López;
Rebeca de los Ángeles Montero Paccha

DIRECTORA:

Bq. Luisa Ivonne Celi Carrión. Mg.Sc

Loja – Ecuador

2022



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

FECHA: 21/09/2022

DE: BQ. Luisa Ivonne Celi Carrión Mg.Sc., DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

PARA: Dra. Sandra Freire Cuesta. DIRECTORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

ASUNTO: **CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

CERTIFICO:

Que una vez asesorada, monitoreada con pertinencia y rigurosidad científica la ejecución del trabajo de integración curricular del tema: **Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja** de la autoría de las estudiantes **Jarellys Carolina Eras López** y **Rebeca de los Ángeles Montero Paccha**, el mismo cumple con las disposiciones institucionales, metodológicas y técnicas, que regulan esta actividad académica; consecuentemente, dicho trabajo de integración curricular se encuentra **culminado y aprobado**, por lo que autorizo continuar con el proceso de titulación.




Firmado electrónicamente por:
**LUISA IVONNE
CELI CARRION**

.....
BQ. Luisa Ivonne Celi Carrión Mg. Sc.
Directora del Trabajo de Integración Curricular

Autoría

Nosotras, Jarellys Carolina Eras López y Rebeca de los Ángeles Montero Paccha, declaramos ser autoras del presente trabajo de integración curricular y eximimos expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo.

Adicionalmente aceptamos y autorizamos a la Universidad Nacional de Loja la publicación de nuestro trabajo de integración curricular o de titulación en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

Firma: 

Cédula de Identidad: 0705607455

Fecha: 15 de Noviembre del 2022

Correo electrónico: jarellys.eras@unl.edu.ec

Teléfono: 0997926192

Firma: 

Cédula de Identidad: 1105703415

Fecha: 15 de Noviembre del 2022

Correo electrónico: rebeca.montero@unl.edu.ec

Teléfono: 0985532657

Carta de autorización

Nosotras, Jarellys Carolina Eras López y Rebeca de los Ángeles Montero Paccha, declaramos ser autoras del trabajo de integración curricular titulado Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja como requisito para optar el título de Licenciadas en Laboratorio Clínico autorizamos al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del trabajo de integración curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 15 días del mes de Noviembre del año dos mil veintidós.

Firma: 

Autora: Jarellys Carolina Eras López

Cédula: 0705607455

Dirección: Barrio Clodoveo Jaramillo, Calles: Dr. Eduardo Mora y Valparaíso.

Correo electrónico: jarellys.eras@unl.edu.ec

Teléfono: 072998270

Celular: 0997926192

Firma: 

Autora: Rebeca de los Ángeles Montero Paccha

Cédula: 1105703415

Dirección: Cdla. Paraíso de Jipiro

Calles: Cisnes y Mirlos.

Correo electrónico: rebeca.montero@unl.edu.ec

Celular: 0985532657

DATOS COPLEMENTARIOS:

Director del trabajo de integración curricular: BQ. Luisa Ivonne Celi Carrión. Mg.Sc.

Tribunal de Grado:

- Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta (PRESIDENTA)
- Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta
- Bq. Gabriela Alexandra Merino Peralta

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios por concederme la familia que tengo y por permitirme llegar hasta aquí, a mis padres Celia y Darwin, a mis hermanos, sobrinos, tíos, primos y demás familiares por su apoyo incondicional brindado a lo largo de toda mi vida y por ser mi claro ejemplo de superación y disciplina, de manera especial a mis tíos Jorge y Carmita que han sido como unos padres para mí durante mi estadía en esta bella ciudad. Y a todas las personas que de manera física y espiritualmente me han acompañado durante el transcurso de estos años, brindándome palabras de aliento que me impulsan a mejorar cada día, siendo de apoyo fundamental durante mi formación académica.

Jarellys Eras.

Dedicada a Dios, a mi madre Rosa Oliva que es mi fortaleza y ejemplo de superación, a mi amado padre Angel, a mi segunda madre Crimi amiga y compañera de vida, a los pilares fundamentales de mi vida mis hermanas Fátima, María, Magdalena, Shaden, a mi hermano Fabricio, a mi sobrinos mi hermosa Camila, Erick y Benjamín, en el cielo a mis abuelos, a Ernesto P, Eduardo P, Antonio P, a mi Churos preciosa mi Nathy Jhulissa , a todos los familiares que me brindaron su apoyo incondicional y a los amigos que fueron mi soporte durante estos años especialmente a Manuel.

Rebeca Montero Paccha.

Agradecimiento

A Dios por permitirnos culminar una etapa tan importante de nuestra vida.

A nuestras familias por el cariño y apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad de la Salud Humana, especialmente a la Carrera de Laboratorio Clínico por prepararnos en conocimientos y valores para la vida profesional.

A nuestra directora de tesis Bq. Luisa Celi, por guiarnos y asesorarnos con sus conocimientos, por las sugerencias pertinentes y por el apoyo brindado durante el proceso para el desarrollo del presente trabajo.

A los docentes y técnicas de laboratorio que impartieron sus enseñanzas a lo largo de nuestra carrera universitaria.

A los compañeros que formaron parte de nuestro estudio por su colaboración y disposición.

Índice de contenido

Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Índice de contenido	viii
Índice de tablas	x
Índice de anexos	xi
1. ¡Error! Marcador no definido.	
2. 2	
2.1. Abstract	3
3. 4	
4. 6	
4.1. 6	
4.2. 6	
4.3. 7	
4.4. 7	
4.5. 8	
4.5.1. 8	
4.5.2. 8	
4.6. 9	
4.6.1. 10	
4.6.2. 10	
4.6.3. 10	
4.7. 11	
4.7.1. 11	
4.7.2. ¡Error! Marcador no definido.	
5. ¡Error! Marcador no definido.	
5.1. ¡Error! Marcador no definido.	

- 5.2. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.1. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.2. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.2.1. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.2.2. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.3. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.4. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.5. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.6. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.7. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.2.8. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5.3. **¡Error! Marcador no definido.**
- 6. 15
- 7. 17
- 8. 21
- 9. 22
- 10. 23
- 11. 28

Índice de tablas

Tabla 1. Interpretación de resultados de NS% mediante ensayo de ELISA competitivo según el kit DiaPro	12
Tabla 2 Media del NS% según el tipo de vacuna en estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja del 2022	15
Tabla 3. Nivel de significancia de la correlación Rho de Spearman	16

Índice de anexos

Anexo 1. Autorización para el inicio de la fase preanalítica	28
Anexo 2. Encuesta online	29
Anexo 3. Consentimiento Informado	32
Anexo 4. Procedimiento para la toma de muestra sanguínea	33
Anexo 5. Autorización para el procesamiento de muestras en el CDM	35
Anexo 6. Procedimiento para la obtención y conservación de suero sanguíneo	36
Anexo 7. Control de Calidad del Kit para la determinación de Nab	38
Anexo 8. Ensayo de ELISA para la determinación de anticuerpos neutralizantes	41
Anexo 9. Curva de calibración del ensayo de ELISA	44
Anexo 10. Evidencias fotográficas	45
Anexo 11. Oficio de pertinencia y aprobación del tema de investigación	46
Anexo 12. Certificado de traducción del resumen al idioma inglés	47

1. Título

Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en
estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de
Loja.

2. Resumen

La pandemia del COVID-19 ha traído consigo varias consecuencias, afectando a la economía y sobre todo a la salud pública, una de las maneras de combatir la enfermedad fue la inmunización a través de la generación de anticuerpos naturales después de haber sido expuesto al virus o mediante la vacuna. Por lo que el presente estudio tiene como objetivo la determinación de anticuerpos neutralizantes (Nab) como una estrategia de evaluación de la inmunidad post vacunación COVID -19, además se trata un tema de salud pública muy relevante y de interés tanto nacional como mundial. El estudio es de tipo cuantitativo transversal-relacional conformado por 79 estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja que cumplieron con los criterios de inclusión correspondientes. La determinación de los Nab se ejecutó mediante la técnica de ELISA competitivo y para el análisis de los resultados se utilizó como pruebas estadísticas Rho de Spearman y Kruskal-Wallis para relacionar y comparar las variables respectivamente. Los resultados obtenidos muestran una media de NS% (porcentaje de inhibición) mayor para la vacuna de Pfizer (BNT162b2, 98.88%), seguido de AstraZeneca (ChAdOx1, 87.22 %) y Sinovac (CoronaVac, 75.26 %), evidenciando una diferencia significativa ($p < 0.05$). Con respecto al análisis de la correlación entre el nivel de anticuerpos y el contagio previo muestra una diferencia significativa ($p < 0.05$) a diferencia que con el grupo sanguíneo ($p > 0.05$). En conclusión, la respuesta inmunológica inducida por las vacunas varía según el tipo de vacuna y el contagio previo, respecto al grupo sanguíneo no se encontró relación estadística.

Palabras clave: SARS-CoV-2, vacunas, anticuerpos neutralizantes, ELISA, contagio previo

2.1. Abstract

The COVID-19 pandemic has brought several consequences with it, affecting the economy and the public health; one of the ways to fight this disease was the immunization through the generation of natural antibodies after being exposed to the virus or through vaccination. So, the present research has the aim to determine neutralizing antibodies (Nab) as a strategy to evaluate the post COVID -19 vaccination immunity, also, it is about a very significant public health issue and about national and world interest. This is a cross-sectional-relational quantitative study made up of 79 students of the Clinical Laboratory career of the National University of Loja who fulfilled the corresponding inclusion criteria. The determination of the Nab was executed through the competitive ELISA technique and for the analysis of the results, Spearman Rho and Kruskal-Wallis statistical tests were used to relate and compare the variables, respectively. The gotten results show a higher mean NS% (percentage of inhibition) for the Pfizer vaccine (BNT162b2, 98.88%), followed by AstraZeneca (ChAdOx1, 87.22%) and Sinovac (CoronaVac, 75.26%), highlighting a significant difference ($p < 0.05$). Regarding to the analysis of the correlation between the antibodies level and previous infection showed a significant difference ($p < 0.05$) unlike to the blood group ($p > 0.05$). In conclusion, the immune response induced by vaccines varies according to the type of vaccine and the previous infection; regarding to the blood group were not found statistical relationship.

Key words: SARS-CoV-2, vaccines, neutralizing antibodies, ELISA, previous infection.

3. Introducción

El brote epidemiológico de coronavirus SARS-CoV-2 que se originó a fines del año 2019 en Wuhan, China, caracterizada por un alto grado de contagios, razón por la cual en 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró emergencia sanitaria por COVID-19; sin duda esta pandemia es uno de los más grandes retos a los que se ha enfrentado la salud mundial en los últimos años y sus estragos siguen evidenciándose 2 años después.

La falta de un tratamiento estandarizado dejó al personal médico sin armas eficaces para poder combatir este virus, los científicos en cooperación con diferentes farmacéuticas, lograron en tiempo récord la creación de vacunas, las cuales inducen una respuesta inmunológica a través de la generación de anticuerpos neutralizantes que junto con otros factores tienen la capacidad de limitar la infección viral por SARS-CoV-2 (Pareja-Cruz et al, 2021).

El acceso equitativo a vacunas seguras y eficaces fue fundamental para reducir la pandemia de COVID-19, razón por la cual el nivel de inmunidad que se adquiere tras la vacunación es un tema de investigación que aún continúa en proceso de evaluación y seguimiento, ya que cada una de las vacunas desarrolladas para COVID-19 ofrecen distinta protección.

Son más de 100 las vacunas que se encuentran en desarrollo a nivel mundial, en Ecuador se aplican las vacunas de Pfizer/BioNTech, Sinovac, AstraZeneca/Oxford y CanSino, siendo el porcentaje de personas vacunadas de 82,39% a nivel nacional, mientras que en la provincia de Loja es de 84,23% (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2022).

Desde el inicio del programa de inoculación surgieron interrogantes sobre la diferencia que existe entre las distintas vacunas y cuál es el grado de inmunidad que induce cada una de ellas, razón por lo cual surgieron la creación ensayos serológicos que permitan determinar anticuerpos neutralizantes (Nab). Por ello la importancia de la presente investigación de determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes en individuos vacunados lo cual permite monitorear si ha existido una inmunización positiva y confiable así mismo conocer el grado de protección que poseen frente al virus y además realizar este tipo de ensayos sirve de apoyo a las organizaciones sanitarias como el MSP para evaluar la necesidad de aplicar dosis de refuerzos.

Estudios publicados como el de Eliakim-Raz et al. (2021) y Malipiero et al. (2022) han demostrado que la vacuna de Pfizer induce una mejor respuesta inmune en comparación con otras vacunas.

Otras investigaciones como la de Pareja Cruz et al. (2021), ha inferido que el contagio previo está correlacionado con una mayor producción de anticuerpos.

Con lo antes expuesto se planteó la realización del presente estudio, mismo que permitió determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos tras la inoculación y de esta manera se comparó la inmunidad que brindan las vacunas de Pfizer, Astrazeneca y Sinovac, lo que dio como resultado que Pfizer genera mayor inmunidad en la población de estudio, y que el nivel de anticuerpos neutralizantes está relacionado con el contagio previo y no con el grupo sanguíneo.

4. Marco teórico

4.1. Origen de COVID-19

La pandemia de COVID- 19 inicia en la provincia de Wuhan- China a finales de 2019, a causa de SARS-CoV-2, una cepa mutante de coronavirus, que se sospecha encontró un intermediario animal entre el murciélago y el hombre; la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo nombró momentáneamente como nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) para luego ser nombrado como Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), agente etiológico de la Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) (Chang et al., 2020).

Los coronavirus se clasifican en 4 géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gamacoronavirus*; pertenecen a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*; se han reconocido especies de los dos primeros grupos como causantes de enfermedades respiratorias en humanos (Guillermo et al., 2020).

En los últimos 20 años se han experimentado 3 brotes de enfermedades infecciosas a causa de coronavirus: el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y la enfermedad del coronavirus de 2019 (COVID-19), cuyos agentes causales pertenecen al género de los *Betacoronavirus* (Salazar et al., 2020).

4.2. Estructura viral del SARS-CoV-2

Los coronavirus son virus envueltos con viriones, pueden tener una forma esférica o pleomórfica, con diámetro que varía entre 80 y 120 nm, presentan como genoma únicamente ARN monocatenario de polaridad positiva con aproximadamente 32 kilobases, que codifican para 16 proteínas no estructurales; en la membrana viral de SARS-CoV-2 se visualiza proyecciones de la glicoproteína S (espiga o spike) y dímeros de proteínas hemaglutinina-esterasa (HE), también se encuentran la proteína M (en mayor proporción) y la proteína E con carácter hidrofóbico, las dos proteínas se unen con las membranas lipídicas de las células hospedadoras; la nucleoproteína o Proteína N se encuentra en la nucleocápside unida al ARN para evitar la desintegración del genoma (Maguiña Vargas et al., 2020).

4.3. Mecanismo de infección y entrada a las células del organismo

Las evidencias indican grandes similitudes entre SARS-CoV-2 y los anteriores *Betacoronavirus* también patológicos, con MERS-CoV comparte el 59% identidad de secuencia y con SARS-CoV el 79% (aproximadamente), con este último emplean como mecanismo de ingreso a las células del hospedador a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2 o ECA 2), misma que se expresa de manera predominante en los neumocitos tipo II, al igual que en las células epiteliales del tracto respiratorio, y en los enterocitos del intestino delgado (Maguiña Vargas et al., 2020).

SARS-CoV-2 se une a los receptores de ACE2 mediante su proteína S, que además le confiere al virus su morfología en forma de corona al observarlo en el microscopio electrónico; la proteína S tiene 2 subunidades, la Subunidad 1 de la cual depende el rango de hospederos del virus, es un trímero de ectodominio y en cada uno de los vértices de los monómeros de esta subunidad hay un dominio de unión al receptor (RBD) para el ensamble con ACE2 y sirven como biomarcador para el diagnóstico de COVID; la Subunidad 2 en cambio interviene en el proceso de fusión del virus con la membrana celular (Ortiz-Prado, 2021).

El SARS-CoV-2 se une a toda célula que exprese en su superficie ACE2 y TMPRSS2 (proteasa de serina transmembrana tipo 2), una vez que se forman el complejo entre el receptor ACE2 y glicoproteína S, el TMPRSS2 lo procesa proteolíticamente, activando la proteína espiga, favoreciendo la fusión con la membrana de las células del hospedero y por ende la entrada del virus (Marín, 2020).

4.4. Formas de transmisión de SARS-CoV-2.

En base a los datos encontrados durante la pandemia, SARS CoV-2 se transmite entre personas mediante el contacto de gotículas respiratorias (5 a 10 μm de diámetro), sin embargo, la transmisión aérea también es posible a través de núcleos goticulares (diámetro inferior a 5 μm) durante el desarrollo de actividades que generan aerosoles, por ejemplo, ventilación no invasiva con presión positiva, intubación endotraqueal, broncoscopia, aspiración abierta, administración de un fármaco por nebulización, entre otras. El contagio a través de gotículas es posible cuando hay contacto a menos de un metro con una persona que presenta síntomas respiratorios como tos y estornudos, y por el contacto con superficie contaminadas (OMS, 2020).

4.5. Inmunidad frente a SARS-CoV-2

4.5.1. Inmunidad innata

La tos, el estornudo, la integridad del epitelio, el mucus, sustancias microbicidas y el surfactante pulmonar son las barreras primarias que muestran una resistencia natural frente al virus, sin embargo el SARS-CoV-2 tiene mecanismos para evadirlas e ingresar a las células blanco o diana, en consecuencia las células dendríticas van a reconocer a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) virales, y conducir esta información molecular hasta los órganos linfoides secundarios activando la respuesta inmune adaptativa, induciendo así la expresión de interferones (IFN) y otras citoquinas proinflamatorias también conocidas como interleucinas (IL), cuya principal fuente son los macrófagos, estos últimos junto con las células dendríticas cumplen un papel fundamental dentro de la respuesta inmune frente al virus (de León Delgado et al., 2020; Suarez Reyes y Villegas Valverde, 2020).

En la infección por SARS-CoV-2 hay producción de IL-6, IL-12 que actúa sobre linfocitos T y células NK, además de otras citoquinas como IL-1b, IL-6, TNF- α y las quimiocinas, MIP2A, IL-8, IP10, MIP3A; en los casos severos de COVID-19 se han evidenciado neutrofilia, mientras que los monocitos, eosinófilos y basófilos se presentan con niveles bajos, las proteínas del complemento C3 y C4 tienen niveles normales, las células NK están disminuidas como consecuencia de la expansión incontrolada de neutrófilos y macrófagos, además la producción exagerada de IFN tipo I, también contribuye al aumento excesivo de macrófagos que conduce a la tormenta de citosinas asociada con formas severas de la infección.

4.5.2. Inmunidad adquirida

Los anticuerpos y los linfocitos T CD8+ son los principales actores de la respuesta inmune adquirida frente a virus, pero también desempeñan un papel muy importante los T CD4+, pues son determinantes en la activación de los linfocitos T CD8+ y su efecto citotóxico, en los linfocitos B para la maduración de los anticuerpos y en el establecimiento de la respuesta inmune en las células T citotóxicas y en las células secretoras de anticuerpos; en el control de una infección viral es trascendental la activación de linfocitos B junto con la respuesta de anticuerpos, en cuanto a SARS-CoV-2 se ha corroborado su

capacidad de promover seroconversión y la producción de anticuerpos neutralizantes (Nab) (de León Delgado et al., 2020).

En la actualidad se emplea la inmunidad inducida por vacunas como opción terapéutica, razón por la cual se ha iniciado con esquemas de vacunación con dos dosis obligatorias y dosis adicionales de refuerzo, algunas investigaciones indican que tras la vacunación el sistema inmune empieza a inducir la creación de Nab a la primera o segunda semana, no obstante, otros estudios clínicos recientes manifiestan que del total de personas vacunadas sólo el 1 al 5% generan altos títulos de anticuerpos, del 50 al 70% tienen una actividad neutralizante media o baja y el 30% no desarrolla actividad neutralizante detectable, aún se desconoce cuáles son los factores específicos que determinan esta condición (Instituto de Salud Carlos III, 2020). Diversos estudios realizados, entre ellos el de Anderson et al. (2021) infieren que los individuos con contagio previo a la vacunación desarrollan un mayor nivel de Nab.

Los Nab desempeñan un rol esencial en la protección frente a la infección de nuevas por SARS- Cov-2, pues se ha demostrado que se dirigen al RBD, que como se ha mencionado al unirse con ACE2 facilita el ingreso del virus las células humanas, además los altos niveles de Nab se constituyen como una importante barrera frente a la reinfección viral (Pifano et al., 2020; Figueroa Montes, 2021).

4.6. Vacunas contra COVID-19

La vacunación es el método más rápido y eficaz para reducir la incidencia de la enfermedad, las vacunas tienen como propósito estimular la respuesta inmunitaria del hospedador (Carroll et al., 2016). En el caso de virus envueltos como el SARS-CoV-2, los antígenos importantes son las glucoproteínas de superficie, es así que las vacunas que se han desarrollado para Covid-19 tienen como objetivo principal generar una respuesta inmune de memoria frente a la proteína S la cual está estrechamente relacionada con la patogenia de la enfermedad, sin embargo, las inmunizaciones no evitan por completo la infección por SARS-CoV 2, pero se ha evidenciado que reducen en gran medida la morbimortalidad. Los datos preliminares de las vacunas revelan la inducción de fuertes respuestas humorales y celulares, caracterizadas por altos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2021).

En Ecuador hasta la fecha del 5 de Abril del 2022 según datos oficiales del Ministerio de Salud Pública (MSP) el 82.39% de la población se encuentra vacunada con dos dosis de las siguientes vacunas:

4.6.1. Pfizer/BioNTech (BNT162B2)

La vacuna desarrollada por Pfizer en EE.UU. en colaboración con BioNTech (Nuevas Tecnologías Biofarmacéuticas) se basa en una molécula de ARN mensajero que luego de ingresar al citoplasma de la célula huésped enseña a las células inmunitarias a codificar la proteína S del virus, envuelta en nanopartículas lipídicas, con un esquema de vacunación de dos dosis separadas por 21 días, presenta una eficacia del 95% a los 7 días de la segunda dosis, sin embargo, se ha constatado que su efectividad ha variado a medida que han ido surgiendo nuevas cepas del coronavirus, con la aparición de la variante delta la eficacia es del 70%. El almacenamiento se realiza a muy bajas temperaturas y es termosensible una vez descongelada (Ministerio de Sanidad, 2021). Los últimos estudios realizados manifiestan que la inmunidad de la vacuna empieza a decaer pasados los seis meses desde la segunda dosis, por lo que se recomienda la administración de una dosis de refuerzo con el mismo producto (OMS, 2021).

4.6.2. Oxford/AstraZeneca (ChAdOx1)

Desarrollada en conjunto por AstraZeneca y la Universidad de Oxford, es una vacuna de vector viral en donde la glicoproteína S se vehiculiza en el adenovirus ChAdOx1 de chimpancé, cuenta con un esquema de vacunación de dos dosis con un intervalo de 28 días, recomendado preferentemente en personas de 18 a 55 años. Las investigaciones determinaron una eficacia del 76% a los 14 días de la segunda dosis (Ministerio de Sanidad, 2021). La dosis de refuerzo para las personas que recibieron dos dosis de la vacuna AstraZeneca puede realizarse con la misma vacuna o aplicar una dosis de Pfizer, lo cual ha demostrado una generación mayor de anticuerpos (OPS, 2021).

4.6.3. CoronaVac (Sinovac)

Es desarrollada por Sinovac Research and Development Co. Ltd. en China, se trata de una vacuna de virus inactivado, la cual se obtiene tras la incubación de SARS-CoV-2, cepa CN02, en células Vero (células de riñón de mono verde africano), el proceso incluye etapas de cultivo celular, propagación, inactivación química, adición de hidróxido de aluminio como agente adyuvante y purificación (Carestiato da Silva, 2021). Se administra

en una serie de dos dosis con un intervalo de 14 a 28 días, logrando una eficacia del 51%. La dosis de refuerzo está prevista luego de haber transcurrido seis meses desde la segunda dosis, ya que se ha comprobado que los títulos de anticuerpos neutralizantes disminuyen sustancialmente. Los estudios clínicos consideran aplicar la misma vacuna o en combinación con otras vacunas (OPS, 2021).

4.7. Pruebas de laboratorio para la identificación de Nab

La inmunidad que brindan las vacunas se puede evidenciar mediante pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2, entre los métodos para la cuantificación tenemos: inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), inmunoensayo de fluorescencia seca (IFA) e inmunoensayo enzimático de absorción ligado a enzimas (ELISA) (Figueroa Montes, 2021).

El ensayo de ELISA es una técnica de laboratorio que usa anticuerpos ligados a enzimas a fin de detectar y medir la cantidad de una sustancia en una solución, uno de los tipos de ELISA es el de competición en el cual el anticuerpo/antígeno presente en la muestra compite con el anticuerpo/antígeno inmovilizado en la fase sólida, evitando la unión con conjugado anticuerpo/antígeno-enzima, mientras más concentración de antígeno o de anticuerpo esté presente en la muestra menor será la señal emitida. Entre una de sus ventajas más importantes está su alta especificidad y sensibilidad, siendo muy útil para trabajar con muestras complejas (Ochoa Azze, 2012).

De igual manera, se puede determinar el porcentaje de inhibición de la muestra (NS%), es decir, el porcentaje de anticuerpos que son capaces de neutralizar el virus, teniendo como umbral un valor mayor de 20% para confirmar la presencia de Nab, en cambio, un valor menor al umbral es indicativo de ausencia de Nab (DiaPro, 2021).

4.7.1. Determinación del NS% mediante ELISA competitivo

La determinación de la actividad inhibitoria resultante entre la unión de RBD y ACE2 inducida por anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se realiza mediante un ensayo de ELISA competitivo, en el cual las microplacas están recubiertas con RBD específico de SARS-CoV-2, de tal modo que, si en la muestra se encuentran presentes los anticuerpos anti Spike/RBD, se unen a dicho antígeno. Con procesos de lavado y la posterior adición de anticuerpo biotinilado de ACE2 recombinante se determina los Spike/RBD libres.

Finalmente, si hay presencia de anticuerpos RBD en la muestra, bloquearán la unión del ACE2 marcado con biotina generando una inhibición de color al momento de añadir el sustrato, en cambio, si ningún anticuerpo se ha unido a RBD se generará un color, del cual se obtendrá el valor de la densidad óptica (OD) mediante la lectura espectrofotométrica a 450 nm. La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba es del 100%, la cual se realizó bajo los parámetros del primer estándar internacional de la OMS para anti-SARS-CoV-2, código NIBSC 20/136 (DiaPro, 2021).

4.7.2. *Obtención de resultados semicuantitativos del NS%*

Los resultados del ensayo de ELISA son semicuantitativos, es decir, se puede obtener valores porcentuales a partir del valor de la densidad óptica aplicando la siguiente fórmula:

$$NS\% = 100 - \left(\frac{OD \text{ Muestra}}{OD \text{ Control Negativo}} \right) \times 100$$

Los resultados obtenidos se pueden agrupar según el NS% de la siguiente manera como se presenta a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1.

Interpretación de resultados de NS% mediante ensayo de ELISA competitivo según el kit DiaPro

NS%	Actividad neutralizante	Rango de UI/mL de la OMS
< 20%	Bajo o no reactivo (*)	< 10
20% < NS% < 30%	Moderado	10 – 100
30% < NS% < 60%	Bueno	100 – 400
60% < NS% < 100%	Excelente	> 400

Nota: Tomado del Kit de ACE2 RBD Neutralization Assay (2021)

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El estudio tuvo lugar en la ciudad de Loja, en la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, ubicada detrás del Hospital General “Isidro Ayora”, en la calle Manuel Monteros. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del Centro de Diagnóstico Médico (CDM) de la misma institución.

5.2. Procedimientos

5.2.1. Enfoque metodológico

La presente investigación contó con un diseño cuantitativo.

5.2.2. Técnicas:

5.2.2.1. Fase preanalítica.

- Se obtuvo la autorización respectiva del inicio de la fase preanalítica por el decano de la Facultad de la Salud Humana Dr. Amable Bermeo. (Anexo 1)
- Se realizó una encuesta online a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico (Anexo 2)
- Se empleó un consentimiento informado (Anexo 3), la información fue proporcionada voluntariamente por los participantes, respetando todos los criterios de confidencialidad, los nombres se mantendrán de manera anónima y registrados con un código personal, lo que significa que las respuestas no podrán ser conocidas por otras personas ni ser identificadas en la fase de publicación de resultados, los resultados generados serán empleados únicamente con fines académicos y científicos.
- Toma de muestra sanguínea (Anexo 4) a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico que cumplieron con los criterios de inclusión.
- Autorización para el procesamiento de muestras en el CDM (Anexo 5)
- Obtención y conservación de suero sanguíneo (Anexo 6)

5.2.2.2. Fase analítica.

- Control de calidad del Kit de ACE2 RBD Neutralization Assay (Anexo 7)
- Determinación de NS% mediante ensayo de ELISA competitivo (Anexo 8)

5.2.3. Tipo de diseño

El estudio fue de tipo no experimental, de corte transversal relacional.

5.2.4. Unidad de estudio

Estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja que han sido vacunados para COVID-19.

5.2.5. Muestra

Estudiantes vacunados con dos dosis COVID-19 a fecha de agosto-septiembre 2021.

5.2.6. Tipo de muestreo

Se empleó muestreo no probabilístico

5.2.7. Criterios de inclusión

- Estudiantes con matrícula vigente en la Carrera de Laboratorio Clínico.
- Estudiantes que firmaron el consentimiento informado.
- Estudiantes vacunados con dos dosis para COVID -19 a fecha de agosto-septiembre del 2021.

5.2.8. Criterios de exclusión

- Estudiantes que no llenaron la encuesta online.
- Estudiantes que no se presentaron a la toma de muestra.
- Estudiantes que se vacunaron con una vacuna diferente a Pfizer, Sinovac y Astrazeneca.
- Estudiantes que han recibido una tercera dosis de refuerzo

5.3. Procesamiento y análisis de datos

- Realización de la curva de calibración (Anexo 9)
- La recolección de datos se realizó en Excel y posteriormente fueron categorizados en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 25, el análisis de resultados se ejecutó a través de estadística descriptiva e inferencial, en primer lugar se analizó la normalidad de los datos obtenidos ejecutando la prueba de Kolmogórov-Smirnov que arrojó un valor $p < 0.05$, indicando que los datos son no paramétricos, por ende se emplearon las pruebas de Kruskal-Wallis que compara rangos y permite corroborar si existe diferencia significativa a nivel estadístico entre dos o más grupos y la prueba de Correlaciones Rho de Spearman misma que permite medir estadísticamente la relación entre dos variables (Hernández et al., 2014).
- Evidencias fotográficas (Anexo 10)

6. Resultados

El grupo de estudio estuvo conformado por 79 participantes, el 69,62% fueron mujeres (n= 55) y el 30.38% hombres (n= 24), con una edad promedio de 21 años, los cuales fueron evaluados con el propósito de determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes generados por las vacunas de Pfizer (BNT162b2), Astrazeneca (ChAdOx1) y Sinovac (CoronaVac); la tasa de seroconversión fue del 100%, es decir, que todos los sujetos estudiados desarrollaron Nabs post vacunación COVID-19.

Del total de participantes, el 50.63% fueron vacunados con dos dosis de la vacuna de Sinovac, el 31.65% con Astrazeneca y el 17.72% recibieron Pfizer, en la Tabla 2 se observa la media del NS% generado por estas vacunas en el grupo de estudio.

Tabla 2

Media del NS% según el tipo de vacuna en estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja del 2022

Tipo de vacuna	\bar{x} NS%*
Pfizer	98.88 %
Astrazeneca	87.22 %
Sinovac	75.26 %

Nota: *NS%: porcentaje de inhibición de la muestra

Al comparar el nivel de anticuerpos neutralizantes generados por los tres tipos de vacuna estudiados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se obtuvo un valor de $p < 0.05$ lo que indica que existe diferencia estadística significativa.

Para determinar la relación estadística del NS% con el grupo sanguíneo y el contagio previo, se correlacionó con la prueba estadística Rho de Spearman tal como se observa en el Tabla 3; el grupo sanguíneo “O Rh+” fue el más común en la población de estudio con el 82.28% seguido del grupo sanguíneo “A Rh+” con 12.66% y finalmente “B Rh+” con el 5.06%, con respecto a los resultados del análisis estadístico se evidencia que no existe una correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el grupo sanguíneo y el nivel de anticuerpos neutralizantes.

Tabla 3.

Nivel de significancia de la correlación Rho de Spearman

Correlaciones Rho de Spearman			
		Grupo sanguíneo	Contagio previo
Nivel de Nab	Sig. (bilateral)	0,707	0,022

Nota: $p = 0.05$

En cuanto a la relación con el contagio previo, las respuestas que se obtuvieron a través de la encuesta online dieron como resultado que el 78.48% de estudiantes no se contagiaron de COVID-19, mientras que el 21.52% restante indicaron haber cursado la infección viral antes de recibir la vacuna, el valor obtenido en la prueba Rho de Spearman ($p < 0,05$) indica una correlación estadística entre el contagio previo y el nivel de anticuerpos neutralizantes.

7. Discusión

Sin duda la inmunización mediante vacunas ha sido una de las principales armas de prevención frente a enfermedades infecciosas como la hepatitis B, sarampión, neumonía, rubéola, el tétanos, entre otras; uno de los ejemplos más prácticos del papel que desempeñan las vacunas en la salud es la situación actual de pandemia por COVID -19, en la cual la vacunación ha permitido frenar la enfermedad gracias a la generación de anticuerpos neutralizantes, los cuales actúan inhibiendo la unión de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 con el receptor ACE2 de la células huésped (OPS, 2020).

Para medir el nivel de anticuerpos neutralizantes se emplean técnicas analíticas como ELISA, FIA (fluoroimmunoanálisis), IFA (inmunofluorescencia), lo que permite conocer el grado de protección con el que cuenta cada individuo frente a la infección por SARS-CoV-2 y/o la inmunización correspondiente (Figuroa Montes, 2021). Razón que motivó a realizar el presente trabajo de investigación que tuvo como objetivo analizar el nivel de anticuerpos neutralizantes en los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

El porcentaje de inhibición (NS%) inducido por las diferentes vacunas en los 79 participantes (69,62% mujeres; 30,38% hombres) que conformaron el grupo de estudio, mostraron que la vacuna de Pfizer (BNT162b2) generó una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes (Nab) con un promedio NS% de 98.88% a través de la técnica de ELISA.

Lo cual se reafirma con un estudio realizado por Evangelos Terpos et al., (2021) en Grecia, en donde la población de estudio estuvo conformada por 255 individuos, de forma análoga con un mayor porcentaje de mujeres (63,92%), obteniendo como resultado un NS% de 96.62% mediante el kit de detección de NAbS SARS-CoV-2 cPassTM, un ensayo de ELISA de bloqueo. Del mismo modo, analizando otra investigación realizada por Malipiero et al. (2022) en Italia, se evaluó un total de 57 trabajadores de la salud, siendo el mayor porcentaje mujeres (73,68%), aplicando como método diagnóstico el mismo ensayo de ELISA de competición (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes) utilizado en nuestro estudio, obteniendo como resultado 82% NS para la vacuna de Pfizer lo que demuestra una alta actividad neutralizante.

Así mismo, se obtuvo un promedio de NS% de 87.2% para la vacuna de Astrazeneca (ChAdOx1) cuyo porcentaje es ligeramente menor que el obtenido por la

vacuna de Pfizer, lo que coincide con estudios realizados en el Reino Unido por por Hall et al. (2022) y Aldridge et al. (2021) que mediante ensayos cuantitativos con electroquimioluminiscencia demostraron que la protección asociada con dos dosis de la vacuna de Astrazeneca es considerablemente más baja que la asociada con la vacuna de Pfizer.

Para la vacuna de Sinovac (CoronaVac) el NS% obtenido fue de 75.26%, siendo de las tres vacunas estudiadas la que generó menor cantidad de Nabs, tal como se evidencia en el estudio comparativo de Mok et al., (2022) realizado en Hong Kong, China con 726 pacientes de los cuales 366 fueron vacunados con dos dosis de Pfizer y 360 con Sinovac y sus resultados infieren un menor porcentaje de inhibición para Sinovac en comparación con Pfizer obteniendo como resultado un NS% de 52.11% y 93.63% respectivamente, utilizando la prueba de neutralización de virus sustituto que emplea la metodología de ELISA convencional.

De hecho, las diferencias en la producción de Nab puede deberse al mecanismo de acción de cada vacuna, siendo comprobado científicamente que las vacunas que usan ARNm como la de Pfizer, generan una mejor protección en comparación con las que usan el método de vector viral (Astrazeneca) y virus inactivado (Sinovac), siendo esta última la menos efectiva, Aguilar (2022) menciona que la efectividad de las vacunas basadas en ARNm se debe a que la información genética para la codificación de la proteína S del SARS-CoV-2 es empaquetado en nanopartículas lipídicas (LNP) que protegen y estabilizan el ARNm, adicional a esto, también se le incorpora nucleósidos modificados como pseudouridina con la finalidad de que el ARN foráneo no pueda ser detectado por el sistema inmune innato, de esta manera, puede llegar hasta el citoplasma sin ser eliminado en el trayecto. En cambio, las vacunas de vector viral como es el caso de la vacuna de Astrazeneca, son seguras y altamente inmunogénicas, el material genético está cubierto por una resistente cubierta proteica del adenovirus lo que le confiere una mejor protección, sin embargo, la inmunidad preexistente de anticuerpos neutralizantes contra serotipos de adenovirus humanos comunes limita su uso, llegando a provocar una disminución en la inmunogenicidad (Picazo, 2021). Lo mismo sucede en el caso de la vacuna Sinovac, los pasos en serie en células y la inactivación por calor durante los procedimientos de la creación son uno de los factores por los cuales tienden a perder su inmunogenicidad lo que

produce la diferencia de efectividad en comparación con las otras vacunas, entre otra de las causas es que las vacunas inactivadas producen anticuerpos dirigidos a las diferentes proteínas virales (Mok et al., 2022) a diferencia de Pfizer y Astrazeneca que se centran en sintetizar anticuerpos dirigidos a la proteína S inhibiendo la unión con ACE2.

Por otra parte, se determinó la relación entre el grupo sanguíneo de la población estudiada y el nivel de Nabs, determinando que el grupo “O” fue el de mayor prevalencia, seguido del “A” y “B” y con respecto a la correlación estadística se estableció que no hay relación entre la generación de Nabs con el grupo sanguíneo ($p > 0.05$), coincidiendo con los resultados generados por Žiberna et al., (2022) en su investigación realizada en Eslovenia con 370 participantes, cuya frecuencia de grupo fue de forma descendente “A”, “O”, “B” y “AB” respectivamente, determinándose anticuerpos neutralizantes mediante microtitulación de SARS-CoV-2 vivo.

De igual manera en un estudio similar realizado por Vicentini et al., (2022) en Italia cuya población comprendía estudiantes de medicina ($n=85$), se determinó anticuerpos neutralizantes mediante ELISA donde predominaba el grupo sanguíneo “O”, luego el “A”, “B” y el tipo “AB” correspondientemente. Se puede evidenciar que en ambos estudios coincidiendo con el nuestro no hay diferencia significativa en los niveles de Nab según el grupo sanguíneo, concluyendo que el grupo sanguíneo no está relacionado ni influye en la generación de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID-19.

Por último, se estableció que existe relación estadística entre el contagio previo y la generación de Nab ($p < 0,05$), obteniendo un NS% más alto en los participantes con antecedentes de infección previa por COVID-19. Lo cual se reafirma con un estudio realizado en Estados Unidos descrito por Anderson et al. (2021) cuyo resultado que indica que de los 59 participantes, 30 personas indicaron no tener infección previa y 29 haber sido previamente infectados, las muestras fueron procesadas con el kit de Abbott ARCHITECT i 2000SR, un ensayo quimioluminiscente, obteniendo como resultado niveles más altos de Nab en sujetos vacunados que han sufrido infección por SARS-CoV-2 en comparación con aquellos que no han contraído la enfermedad. Resultados similares se encontraron en el estudio realizado por Tretyn et al. (2021) en Polonia, de los cuales 203 pacientes no tenían antecedentes de COVID-19, mientras que 124 fueron infectados anteriormente con SARS-CoV-2, los resultados obtenidos mostraron niveles superiores de Nab en individuos con

antecedentes de infección por SARS-CoV-2. Lo que significa que los anticuerpos generados naturalmente en respuesta a la infección, que tienen una duración que oscila de 5 a 12 meses o más, se suman a los que se producen con la inoculación independientemente del tipo de vacuna, generando una mayor protección (Gazit et al., 2021).

8. Conclusiones

- ✓ Se determinó que en la población de estudio existe diferencia significativa entre el nivel de anticuerpos neutralizantes inducido por las diferentes vacunas, obteniendo un mayor porcentaje de inhibición (NS%) en la vacuna de Pfizer (98.88%), seguido de Astrazeneca (87.22%) y Sinovac (75.26%).
- ✓ No existe relación estadísticamente significativa entre el grupo sanguíneo y el nivel de anticuerpos neutralizantes, por el contrario, si se evidencia correlación con el contagio previo.

9. Recomendaciones

- ✓ Se sugiere que la población de estudio complete el esquema de vacunación y posteriormente las dosis de refuerzo en la medida de lo posible con la vacuna de Pfizer en vista del mayor nivel de anticuerpos neutralizantes que genera.
- ✓ Se debe priorizar la vacunación en los participantes que no han contraído la infección viral ya que no cuentan con anticuerpos neutralizantes generados por la inmunidad primaria.
- ✓ Realizar más estudios para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en grupos vulnerables o inmunodeprimidos e inclusive en el resto de la población con la finalidad de garantizar la inmunidad de rebaño frente a COVID-19.

10. Bibliografía

- Aguilar, F. R. (2022). Vacunas de ARN mensajero: la tecnología que revoluciona la inmunización frente a enfermedades infecciosas. *Revista Experiencia En Medicina Del Hospital Regional Lambayeque*, 8(1). <https://doi.org/10.37065/REM.V8I1.601>
- Aldridge, R. W., Yavlinsky, A., Nguyen, V., Eyre, M. T., Shrotri, M., Navaratnam, A. M. D., Beale, S., Braithwaite, I., Byrne, T., Kovar, J., Fragaszy, E., Lam Erica Fong, W., Geismar, C., Patel, P., Rodger, A., Johnson, A. M., y Hayward, A. (2021). Waning of SARS-CoV-2 antibodies targeting the Spike protein in individuals post second dose of ChAdOx1 and BNT162b2 COVID-19 vaccines and risk of breakthrough infections: analysis of the Virus Watch community cohort. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.05.21265968>
- Anderson, M., Stec, M., Rewane, A., Landay, A., Cloherty, G., y Moy, J. (2021). SARS-CoV-2 Antibody Responses in Infection-Naive or Previously Infected Individuals After 1 and 2 Doses of the BNT162b2 Vaccine. *JAMA Network Open*, 4(8), e2119741–e2119741. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.19741>
- Aznar, J., Núñez Roldán, A., Haro Muñoz, T., León, A., Aldana, J., y González Pérez, R. (2019). Manual de Obtención y Manejo de Muestras para el Laboratorio Clínico. *Plan de Laboratorios Clínicos y Bancos Biológicos*, 1–74. https://sampac.es/images/site/documentacion/protocolos/otros/Manual_Obtencion_y_Manejo_Muestras_1.pdf
- Carestiato da Silva, T. (2021). Vacunas basadas en virus inactivado para la prevención de COVID-19. https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/tecnologias-para-covid-19/virus-inativado_espanhol.pdf
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. A., y Miller, S. (2016). *Microbiología Médica* (27th ed.). Mc Graw Hill Education. <https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repository/m/MicrobiologiaMedica.pdf>
- Complejo Hospitalario de Jaén. (2016). Manual de Toma de muestras. *Servicio Andaluz de Salud*, <http://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/chjfiles/pdf/1576500225.pdf>
- Chang, L., Yan, Y., y Wang, L. (2020). Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfusion Medicine Reviews*, 34(2), 75–80. <https://doi.org/10.1016/J.TMRV.2020.02.003>

- Diagnostic Bioprobest (12 de Julio de 2021). ELISA para la determinación de la actividad neutralizante de anticuerpos anti-SARSCoV-2 por inhibición de la unión de ACE2-RBD en suero y plasma humanos. *ACE2-RBD Neutralization Assay*. 1-11.
- Evangelos Terpos, Ioannis P. Trougakos, Filia Apostolakou, Ioanna Charitaki, Aimilia D. Sklirou, Nefeli Mavrianou, ... Meletios A. Dimopoulos. (2021, April 27). Age-dependent and gender-dependent antibody responses against SARS-CoV-2 in health workers and octogenarians after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine. *American Journal of Hematology*. American Medical Association. <https://doi.org/10.1002/ajh.26185>
- Figueroa Montes, L. E. (2021). Anticuerpos neutralizantes, nuevas pruebas de laboratorio contra el SARS-CoV-2. *Acta Médica Peruana*, 38(4), 295–304.
<https://doi.org/10.35663/AMP.2021.384.2191>
- Gazit, S., Shlezinger, R., Perez, G., Lotan, R., Peretz, A., Ben-Tov, A., Cohen, D., Muhsen, K., Chodick, G., y Patalon, T. (2021). Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections. *MedRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2021.08.24.21262415>
- Guillermo, C., Carrillo, Q., Pareja Cruz, A., Ayala, E. V., Pastora Enriquez Valencia, Y., De, J., Delgado, L., y Aguilar Ramirez, P. (2020). Un nuevo coronavirus, una nueva enfermedad: COVID-19. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(2), e1208–e1208.
<https://doi.org/10.24265/HORIZMED.2020.V20N2.11>
- Hall, V., Foulkes, S., Insalata, F., Kirwan, P., Saei, A., Atti, A., Wellington, E., Khawam, J., Munro, K., Cole, M., Tranquillini, C., Taylor-Kerr, A., Hettiarachchi, N., Calbraith, D., Sajedi, N., Milligan, I., Themistocleous, Y., Corrigan, D., Cromey, L., ... Hopkins, S. (2022). Protection against SARS-CoV-2 after Covid-19 Vaccination and Previous Infection. *New England Journal of Medicine*, 386(13), 1207–1220.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2118691>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., y Baptista Lucio, M. del P. (2014). *Metodología de la investigación* (S. Méndez Valencia y C. P. Mendoza Torres, Eds.; 6ta ed.). Mc Graw Hill.
- Instituto de Salud Carlos III. (2020). *Anticuerpos neutralizantes frente a SARS CoV-2*.
<https://www.conprueba.es/sites/default/files/informes/2020->

07/ANTICUERPOS%20NEUTRALIZANTES%20FRENTE%20A%20SARS%20CoV-2.pdf

Maguiña Vargas, C., Gastelo Acosta, R., y Tequen Bernilla, A. (2020). El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid-19. *Revista Medica Herediana*, 31(2), 125–131.

<https://doi.org/10.20453/RMH.V31I2.3776>

Malipiero, G., D'Agaro, P., Segat, L., Moratto, A., y Villalta, D. (2022). Long-term decay of anti-RBD IgG titers after BNT162b2 vaccination is not mirrored by loss of neutralizing bioactivity against SARS-CoV-2. *Clinica Chimica Acta*, 524, 11–17.

<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2021.11.023>

Marín, J. E. O. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, 3(2 (julio-diciembre)), 79–86.

<https://doi.org/10.5377/ALERTA.V3I2.9619>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2022, April 5). *Vacunómetro COVID-19*. Plan de Vacunación.

<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMjg4ODQyZDI0MTZiYi00ZjhmLWI0MzEtYWJlNzAxZDcwNWZlZWZlIiwidCI6IjcwNjIyMGRiLTliMjktNGU5MS1hODI1LTl1NmIwNmQyNjlmMyJ9ypageName=ReportSection5e050ac003d0b042a320>

Ministerio de Sanidad. (2021). Información sobre la inmunidad frente a COVID-19. In *Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias*.

<https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/vacunaCovid19.htm>

Mok, C. K. P., Cohen, C. A., Cheng, S. M. S., Chen, C., Kwok, K. O., Yiu, K., Chan, T. O., Bull, M., Ling, K. C., Dai, Z., Ng, S. S., Lui, G. C. Y., Wu, C., Amarasinghe, G. K., Leung, D. W., Wong, S. Y. S., Valkenburg, S. A., Peiris, M., y Hui, D. S. (2022). Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID-19 vaccines in Hong Kong.

Respirology, 27(4), 301–310. <https://doi.org/10.1111/RESP.14191>

Ochoa Azze, R. F. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos* (1ra ed.). Finlay Ediciones.

www.finlay.sld.cu/ediciones.htm

Organización Mundial de la Salud. (2021). Documento de antecedentes sobre la vacuna de ARNm BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) contra COVID-19: documento de antecedentes de

las recomendaciones provisionales de la OMS para el uso de la vacuna Pfizer-BioNTech COVID-19, BNT162b2, en la lista de uso de emergencia. *Organización Mundial de La Salud*, 1–44. [https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE_recommendation-BNT162b2-](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE_recommendation-BNT162b2)

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). *Vías de transmisión del virus de la COVID-19: repercusiones para las recomendaciones relativas a las precauciones en materia de prevención y control de las infecciones*. <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>

Organización Panamericana de la Salud. (2020). *Inmunización*. <https://www.paho.org/es/temas/inmunizacion>

Organización Panamericana de la Salud. (2021). Preguntas frecuentes sobre las vacunas experimentales contra la COVID-19 y los mecanismos de acceso. In *COVID-19* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057755>

Ortiz-Prado, E. (2021). *La Enfermedad del Coronavirus-2019 (COVID-19) y el Virus del SARS-CoV-2 .Una visión multidisciplinaria de la pandemia, su origen, sus implicaciones médicas, sociales y sanitarias* (Universidad de las Américas, Ed.; 1ra ed.).

Picazo, J. J. (2021). Vacuna frente al COVID-19. *Revista Española de Quimioterapia*, 34(6), 569–598. <https://doi.org/10.37201/REQ/085.2021>

Salazar, D., Uzquiano, M., Rivera, G., y Velasco, E. (2020). Mecanismos de transmisión del SARS-CoV-2. *Acta Nova*, 9(5–6), 773–792. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892020000200008&lng=es&synrm=isoyt&lng=es

Tretyn, A., Szczepanek, J., Skorupa, M., Jarkiewicz-Tretyn, J., Sandomierz, D., Dejewski, J., Ciechanowska, K., Jarkiewicz-Tretyn, A., Koper, W., y Pałgan, K. (2021). Differences in the Concentration of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies Post-COVID-19 Recovery or Post-Vaccination. *Cells*, 10(8), 1952. <https://doi.org/10.3390/cells10081952>

Vicentini, C., Bordino, V., Cornio, A. R., Meddis, D., Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Memoli, G., Bert, F., y Zotti, C. M. (2022). Does ABO blood group influence antibody response to SARS-CoV-2 vaccination? *Vox Sanguinis*, 117(5), 754–755. <https://doi.org/10.1111/VOX.13241>

Žiberna, K., Jež, M., Jazbec, K., Mali, P., Potokar, U. R., y Rožman, P. (2022). ABO blood group does not influence the level of anti-SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma donors. *Transfusion*, 62(3), 556–562. <https://doi.org/10.1111/TRF.16808>

11. Anexos

Anexo 1. Autorización para el inicio de la fase preanalítica



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

Of. No. 2022-017-DFSH-UNL
Loja, 20 de enero de 2022

Señoras

Dra. Tania Cabrera Parra, **DIRECTORA CARRERA DE MEDICINA**
Lcda. Denny Ayora Apolo, **DIRECTORA CARRERA DE ENFERMERIA**
Odt. Esp. Susana González Eras, **DIRECTORA CARRERA DE ODONTOLOGIA**
Dra. Ana Puertas Azanza, **DIRECTORA CARRERA DE PSICOLOGIA CLINICA**
Presente.-

De mi especial consideración:

En virtud a Of. No. 2022-0049-CLC-FSH-UNL de 17 de enero de 2022, suscrito por la Dra. Sandra Freire Cuesta, Directora de la Carrera de Laboratorio Clínico, sírvase brindar las facilidades a las señoritas estudiantes Jarelllys Carolina Eras López y Rebeca de los Ángeles Montero Paccha, a fin de que inicien la fase preanalítica (toma de muestras) del proyecto de titulación denominado: **"CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES (SINOVAC, ASTRAZENECA Y PFIZER) EN ESTUDIANTES VACUNADOS DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA"**.

Aprovecho la oportunidad para reiterar mi sentimiento de consideración y estima personal.

Atentamente,
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA, ESTA
LA GLORIFICACION DE LA VIDA.**



Firma digitalizada por:
**SANTOS AMABLE
BERMEO FLORES**

Dr. Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO FACULTAD DE LA SALUD HUMANA -UNL

Cc: Carrera Laboratorio Clínico, Archivo

ABF/ Yadira Córdova
ANALISTA DE DESPACHO DE AUTORIDAD ACADEMICA

Anexo 2. Encuesta online

Encuesta COVID

Estimados compañer@s les agradecemos de ante mano el tiempo destinado para completar este formulario, mismo que será utilizado para el elaborar nuestro ante-proyecto de titulación, denominado "Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunacion COVID-19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja"

Se ha registrado el correo del encuestado (null) al enviar este formulario.

***Obligatorio**

1. Correo *

2. Nombres y apellidos *

3. Ciclo *

4. Número de celular o teléfono *

5. Edad *

6. Sexo *

Marca solo un óvalo.

Hombre

Mujer

7. Grupo sanguíneo *

Marca solo un óvalo.

O Rh -

O Rh +

A Rh -

A Rh +

B Rh -

B Rh +

AB Rh -

AB Rh +

Desconoce

8. ¿Recibió usted la vacuna contra COVID 19?. Si la respuesta es No, envíe el formulario sin responder las preguntas posteriores *

Marca solo un óvalo.

Si

No

9. ¿Qué vacuna recibió?

Marca solo un óvalo.

- Sinovac
- Astrazeneca
- Pfizer
- Otra

10. ¿Cuándo le administraron la segunda dosis?

Selecciona todos los que correspondan.

- Enero-Febrero-Marzo
- Abril-Mayo - Junio
- Julio- Agosto-Septiembre
- Octubre-Noviembre-Diciembre

11. ¿Recibió usted la tercera dosis?

Selecciona todos los que correspondan.

- Si
- No

12. ¿Se contagió usted de Covid?

Marca solo un óvalo.

- No
- Antes de la primera dosis
- Después de la primera dosis
- Se contagió más de una vez

Anexo 3. Consentimiento Informado

Consentimiento Informado para el Proyecto de Titulación:

“Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja”


Yo, _____ con C.I. _____ declaro que he sido informado e invitado a participar en una investigación denominada “Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja”, éste es un proyecto de investigación científica que cuenta con el respaldo y financiamiento de la Universidad Nacional de Loja. Entiendo que este estudio busca conocer el nivel de anticuerpos generados después de la vacuna contra Covid-19 y sé que mi participación se llevará a cabo en el laboratorio C.D.M. (Centro de Diagnóstico Médico) de la Facultad de la Salud Humana de la UNL, y consistirá en una extracción sanguínea que demorará alrededor de 15 minutos. Me han explicado que la información registrada será confidencial, y que los nombres de los participantes serán asociados a un número de serie, esto significa que las respuestas no podrán ser conocidas por otras personas ni tampoco ser identificadas en la fase de publicación de resultados. Estoy en conocimiento que los datos no me serán entregados y que no habrá retribución por la participación en este estudio, sí que esta información podrá beneficiar de manera indirecta y por lo tanto tiene un beneficio para la sociedad dada la investigación que se está llevando a cabo. Asimismo, sé que puedo negar la participación o retirarme en cualquier etapa de la investigación, sin expresión de causa ni consecuencias negativas para mí.

Sí. Acepto voluntariamente participar en este estudio y he recibido una copia del presente documento.

Firma participante: _____

Fecha: _____

Anexo 4. Procedimiento para la toma de muestra sanguínea

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR	TOMA DE MUESTRAS: SANGRE	CODIGO:
			Versión: 1
	ÁREA: TOMA DE MUESTRAS		Nº páginas: 2

TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

Objetivo: Describir el procedimiento para obtener una muestra de sangre venosa de la cual se obtendrá el suero sanguíneo para la determinación de anticuerpos neutralizantes.

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable para instruir tanto al flebotomista como al paciente sobre una correcta toma de la muestra de sangre.

Definiciones: La sangre es un tejido compuesto de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y otras sustancias suspendidas en un líquido que se llama plasma. La sangre lleva oxígeno y nutrientes a los tejidos y elimina los desechos. Es el espécimen más usado habitualmente para los estudios analíticos por la riqueza de datos que puede aportar.

Responsable:

Encargado del área de toma de muestras.

Descripción del procedimiento:

Recursos materiales:

- Torniquete
- Tubo tapa roja sin aditivos
- Jeringuilla de 5 o 10 ml
- Alcohol antiséptico al 70%
- Torundas de algodón
- Curitas

Indicaciones previas a la toma de la muestra de sangre:

- No se requiere de ayuno previo

Información al paciente: Explicar al paciente en términos fáciles de entender el procedimiento que se le realizará para la toma de la muestra.

Procedimiento para la toma de la muestra de sangre:

1. Preparar el material necesario (torniquete, aguja, tubos, alcohol, algodón).
2. Etiquetar el tubo y posicionar al paciente de una manera cómoda.

3. Estirar el brazo del paciente para revisar y seleccionar una vena.
4. Colocar el torniquete a 7 cm del lugar de extracción y se le puede pedir al paciente hacer puño con fuerza para resaltar la vena.
5. Desinfectar el lugar de la flebotomía con algodón y alcohol al 70%
6. Introducir la aguja con el bisel hacia arriba, con un ángulo de 15° respecto al brazo
7. Tirar suavemente del émbolo de la jeringa y una vez que la sangre fluye se debe retirar el torniquete.
8. Retirar la aguja y aplicar una ligera presión en el lugar de la punción.
9. Descargar la sangre en el tubo previamente etiquetado.
10. Desechar los materiales utilizados en el recipiente adecuado, la aguja colocarla en el recipiente de cortopunzantes, el algodón en desechos infecciosos y el empaque de la jeringa en desechos comunes.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Aznar, J., Núñez Roldán, A., Haro Muñoz, T., León, A., Aldana, J., y González Pérez, R. (2019). Manual de Obtención y Manejo de Muestras para el Laboratorio Clínico. *Plan de Laboratorios Clínicos y Bancos Biológicos*, 1–74.
https://sampac.es/images/site/documentacion/protocolos/otros/Manual_Obtencion_y_Manejo_Muestras_1.pdf
2. Complejo Hospitalario de Jaén. (2016). Manual de Toma de muestras. *Servicio Andaluz de Salud*, 1–30.
<http://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/chjfiles/pdf/1576500225.pdf>

ELABORADO POR:	Jarellys Eras Rebeca Montero	Fecha: 20/01/2022
Aprobado por:	Bq. Luisa Celi, Mg. Sc.	Fecha: 20/01/2022

f).....
COORDINADO

f).....
RESPONSABLE DEL SISTEMA

Anexo 5. Autorización para el procesamiento de muestras en el CDM



unl Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

Of. Nro. 2022-0139-DFSH-UNL
Loja, 09 de marzo de 2022

Señoritas

Jarellys Carolina Eras López
Rebeca de los Ángeles Montero Paccha
ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
Presente.-

De mi especial consideración:

En atención a Of. No. 2022-00213-CLC-FSH-UNL de 02 de marzo de 2022, suscrito por la Dra. Sandra Freire Cuesta, Directora de la Carrera de Laboratorio Clínico, en mi calidad de Autoridad Académica de esta Facultad, en el marco del proyecto de tesis denominado: **"MONITOREO DE ANTICUERPOS NEURALIZANTES POST VACUNACIÓN COVID-19 EN ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA"**; autorizo el proceso de análisis de muestras en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico Médico.

De la misma manera, solicito a la Lcda. Diana Ramón Montaña, brinde el apoyo técnico a las referidas estudiantes.

Aprovecho la oportunidad para reiterar mi sentimiento de consideración y estima.

Atentamente,
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA,
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA.**




FORMADO DIGITALMENTE POR
**SANTOS AMABLE
BERMEO FLORES**

Dr. Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO FACULTAD DE LA SALUD HUMANA UNL.

Cc: Dirección Carrera Laboratorio Clínico, Archivo

ABF/ Yadira Córdova.
ANALISTA DE DESPACHO DE AUTORIDAD ACADÉMICA

Anexo 6. Procedimiento para la obtención y conservación de suero sanguíneo

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR 1859	OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN	CODIGO:
		Versión: 1
		Nº páginas: 2
ÁREA: CONSERVACIÓN DE MUESTRAS		

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SUERO SANGUÍNEO

Objetivo: Describir el procedimiento para obtener el suero sanguíneo y la forma correcta de conservarlo para su posterior análisis.

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable para instruir a la comunidad científica sobre la correcta obtención y conservación del suero sanguíneo.

Definiciones: El suero proviene de la sangre que se obtiene de una punción arterial o venosa en un tubo sin anticoagulante. La sangre se deja coagular y la fibrina, células sanguíneas y las plaquetas se separan del suero por medio de centrifugación. El *suero* debe ser almacenado en viales Eppendorf, debidamente identificados. Su *conservación* debe ser en congelación entre -20°C y -30°, hasta su uso.

Responsable:

Encargado del área de toma de muestras.

Descripción del procedimiento:

Recursos materiales:

- Muestra sanguínea recolectada en tubo tapa roja sin aditivos
- Gradillas
- Centrifuga
- Pipeta de 1000 ul
- Puntas azules
- Tubos Eppendorf
- Rotulador
- Congelador

Procedimiento:

1. Centrifugar la muestra sanguínea a 3500 rpm durante 5 minutos
2. Pipetear 1ml del suero obtenido a los tubos Eppendorf
3. Congelar a -20°C

BIBLIOGRAFÍA:

1. Aznar, J., Núñez Roldán, A., Haro Muñoz, T., León, A., Aldana, J., y González Pérez, R. (2019). Manual de Obtención y Manejo de Muestras para el Laboratorio Clínico. *Plan de Laboratorios Clínicos y Bancos Biológicos*, 1–74.
https://sampac.es/images/site/documentacion/protocolos/otros/Manual_Obtencion_y_Manejo_Muestras_1.pdf
2. Complejo Hospitalario de Jaén. (2016). Manual de Toma de muestras. *Servicio Andaluz de Salud*, 1–30.
<http://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/chjfiles/pdf/1576500225.pdf>

ELABORADO POR:	Jarellys Eras y Rebeca Montero	Fecha: 20/01/2022
Aprobado por:	Bq. Luisa Celi, Mg. Sc.	Fecha: 20/01/2022

f).....


COORDINADO

f).....

RESPONSABLE DEL SISTEMA

Anexo 7. Control de Calidad del Kit para la determinación de Nab

	CONTROL DE CALIDAD	CODIGO:
--	---------------------------	----------------

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR	Versión: 1
	ÁREA: ANALÍTICA	Nº páginas: 2

CONTROL DE CALIDAD DEL KIT PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MEDIANTE ELISA

Objetivo: Describir el procedimiento para la realización respectiva del control de calidad del kit para la determinación de Ac neutralizantes mediante el método de ELISA.

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable para instruir al operador sobre el procedimiento que se lleva a cabo cada vez que se usa el kit y la correcta verificación de los controles de calidad.

Definiciones: El control de calidad es el conjunto de los mecanismos, acciones y herramientas realizadas para detectar la presencia de errores. La función principal es asegurar que los productos o servicios cumplan con los requisitos mínimos de calidad.

Responsable:

Encargado del laboratorio

Descripción del procedimiento:

Recursos materiales:

- Pipetas de 10-100 ul
- Pipetas de 100-1000 ul
- Puntas de pipetas desechables para 100 y 1000 ul
- Agua destilada
- Temporizador
- Incubadora
- Lector de ELISA de 450 nm
- Kit del Ensayo de ELISA (microplaca, control negativo, control positivo, conjugado 1 (ACE2), conjugado 2 (estreptavidina), diluyente, cromógeno, solución de lavado, ácido sulfúrico, sellador adhesivo)

Operaciones y controles previos al ensayo:

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit.

2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista.
3. Comprobar que el cromógeno/substrato sea incoloro o azul pálido.
4. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
5. Diluir la solución de lavado concentrada 20x.
6. Esperar que los componentes alcancen la temperatura ambiente.
7. Ajustar la incubadora a 37 °C
8. Encender el lector ELISA al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.

Procedimiento:

1. Disolver el conjugado 1 ACE2-Biot liofilizado con 4 ml del conjugado 2
2. Dispensar 25 ul del control negativo en los pocillos B1
3. Dispensar 25 ul del control positivo en los pocillos C1
4. Dispensar 75 ul de diluyente de ensayo en los pocillos B1 + C1 y mezclar
5. Dispensar 100 ul del control negativo
6. Cubrir la microplaca con el sellador y agitar suavemente durante 10-15 segundos
7. Incubar durante 60 min a 37 ° C.
8. Lavar 3 veces con 350 ul de solución de lavado
9. Mezclar suavemente el complejo ACE2-RBD y luego dispensar 100 ul
10. Recuperar la microplaca con el sellador e incubar durante 45 min a 37 ° C.
11. Lavar 3 veces con 350 ul de solución de lavado
12. Dispensar 100 ul de TMB en los pocillos
13. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad
14. Pipetear 100 µl de ácido sulfúrico en los
15. Leer las densidades ópticas (DO) a 450 nm
16. Calcular el porcentaje de neutralización (%NS) para el control positivo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% NS = 100 - \frac{OD\ 450\ nm\ Muestra}{media\ de\ OD\ 450\ nm\ del\ control\ negativo} \times 100$$

17. Verificar si los valores de DO 450 nm / 620 nm de los controles positivo y negativo son los esperados según lo siguiente:

- **Control negativo:** $1500 < OD\ 450\ nm < 3000$
- **Control positivo:** NS% >60%


BIBLIOGRAFÍA:

1. Diagnostic Bioprobest (12 de Julio de 2021). ELISA para la determinación de la actividad neutralizante de anticuerpos anti-SARSCoV-2 por inhibición de la unión de ACE2-RBD en suero y plasma humanos. *ACE2-RBD Neutralization Assay*. 1-11.

ELABORADO POR:	Jarellys Eras Rebeca Montero	Fecha: 20/01/2022
Aprobado por:	Bq. Luisa Celi, Mg. Sc.	Fecha: 20/01/2022

f).....
COORDINADO

f).....
RESPONSABLE DEL SISTEMA

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana <i>Carrera de Laboratorio Clínico</i> LOJA - ECUADOR	ENSAYO ELISA: DETERMINACIÓN ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES	CODIGO:
			Versión: 1
			N° páginas: 2
ÁREA: INMUNOLOGÍA			

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-SARS-COV-2 MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA

Objetivo: Describir el procedimiento del inmunoensayo enzimático para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero sanguíneo.

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable para la correcta determinación analítica.

Definiciones: Los anticuerpos neutralizantes Anti- SARS-CoV-2 son los encargados de bloquear la entrada del virus a las células humanas, impidiendo así la replicación viral. Se generan luego de que una persona se ha recuperado de la infección por Covid-19 o luego de 14 días de la vacunación.

Responsable:

Encargado del área de toma de muestras.

Descripción del procedimiento:

Recursos materiales:

- Muestra de sangre
- Centrífuga
- Pipetas de 10-100 ul
- Pipetas de 100-1000 ul
- Puntas de pipetas desechables para 100 y 1000 ul
- Agua destilada
- Temporizador
- Incubadora
- Lector de ELISA de 450 nm
- Kit del Ensayo de ELISA (microplaca, control negativo, control positivo, conjugado 1 (ACE2), conjugado 2 (estreptavidina), diluyente, cromógeno, solución de lavado, ácido sulfúrico, sellador adhesivo)

Operaciones y controles previos al ensayo:

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista.
3. Comprobar que el cromógeno/substrato sea incoloro o azul pálido.
4. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
5. Diluir la solución de lavado concentrada 20x.
6. Esperar que los componentes alcancen la temperatura ambiente.
7. Ajustar la incubadora a 37 °C
8. Encender el lector ELISA al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.

Procedimiento del ensayo:

1. Disolver el conjugado 1 ACE2-Biot liofilizado con 4 ml del conjugado 2
2. Dispensar 75 ul de diluyente de ensayo en todos los pocillos, excepto en el A1.
3. Dispensar 25 ul del control negativo en los pocillos B1 + C1 y luego mezclar.
4. Dispensar 10 ul del control positivo en los pocillos D1 + E1 + F1 y mezclar.
5. Dispensar 25 ul del control positivo en los pocillos G1 + H1 y mezclar.
6. Dispensar 25 ul de muestra en los otros pocillos de A2 en adelante y mezclar.
7. Dispensar 100 ul del control negativo en todos los pocillos, excepto el A1.
8. Cubrir la microplaca con el sellador y agitar suavemente durante 10-15 segundos
9. Incubar durante 60 min a 37 ° C.
10. Lavar 3 veces con 350 ul de solución de lavado
11. Mezclar suavemente el complejo ACE2-RBD y luego dispensar 100 ul en todos los pocillos, excepto en A1.
12. Recuperar la microplaca con el sellador e incubar durante 45 min a 37 ° C.
13. Lavar 3 veces con 350 ul de solución de lavado
14. Dispensar 100 ul de TMB en todos los pocillos, incluido el A1.
15. Incube la placa a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad
16. Pipetear 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos utilizando la misma secuencia de pipeteo que en el paso 10 para detener la reacción enzimática.

17. Leer las densidades ópticas a 450 nm / 620-630 nm en blanco en el pocillo A1.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Diagnostic Bioprobest (12 de Julio de 2021). ELISA para la determinación de la actividad neutralizante de anticuerpos anti-SARSCoV-2 por inhibición de la unión de ACE2-RBD en suero y plasma humanos. *ACE2-RBD Neutralization Assay*, 9 (1), pp. 1-11

ELABORADO POR:	Jarellys Eras Rebeca Montero	Fecha: 20/01/2022
Aprobado por:	Bq. Luisa Celi, Mg. Sc.	Fecha: 20/01/2022

f).....

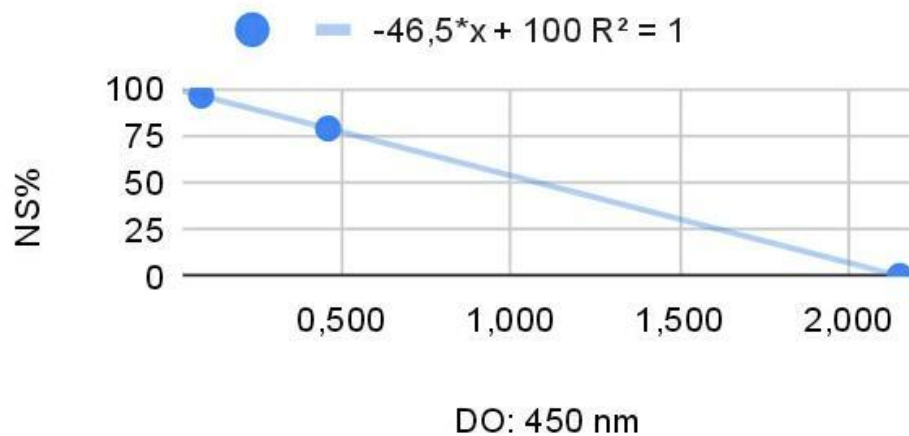
COORDINADO

f).....

RESPONSABLE DEL SISTEMA

Anexo 9. Curva de calibración del ensayo de ELISA

NS% frente a DO: 450 nm



Anexo 10. Evidencias fotográficas



Anexo 11. Oficio de pertinencia y aprobación del tema de investigación



unl

Universidad
Nacional
de Loja

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Facultad
de la Salud
Humana

Of. Nro. 2022-00161-CLC-FSH-UNL
Loja, 09 de febrero de 2022

Señoritas:

Jarellys Carolina Eras López

Rebeca de los Ángeles Montero Paccha

ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA-UNL.

Ciudad. –

De mi consideración:

Por medio del presente, me permito correr traslado el Oficio emitido por la Bq. Luisa Ivonne Celi Carrión, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico, con respeto a la estructura, coherencia y pertinencia del tema de investigación: **"MONITOREO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES POST VACUNACIÓN COVID - 19 EN ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA"**, de su autoría, con la finalidad de que se siga el proceso, quedando aprobado el mismo por parte de esta dependencia; y, se continúe con el proceso correspondiente de conformidad a los Art. 225, 226, 227, 228, 229 y 230 del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja.

Particular que me permito comunica para fines legales pertinentes.

Atentamente,

 Fijando electrónicamente por:
SANDRA
ELIZABETH
FREIRE CUESTA

Dra. Esp. Sandra Freire Cuesta,
**DIRECTORA DE LA CARRERA DE
LABORATORIO CLÍNICO-FSH. UNL.**

c.c. Archivo
María del C. Salazar L.

Anexo 12. Certificado de traducción del resumen al idioma inglés

Loja, 25 de julio de 2022.

Mediante el presente documento,

Yo, Yuzela Michelle López Jiménez, Licenciado en Ciencias de la Educación Mención Inglés, con Registro Senescyt 1031-2016-1669756.

CERTIFICO

Que en la presente fecha he realizado la traducción, desde el idioma español al idioma extranjero inglés, del resumen correspondiente al trabajo de investigación denominado "Monitoreo de anticuerpos neutralizantes post vacunación COVID - 19 en estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja" de las autoras Jarellys Carolina Eras López con cédula 0703607453 y Rebeca de los Ángeles Montero Paccha con cédula 1105703415, previo a obtener el título de Licenciada en Laboratorio Clínico en la Universidad Nacional de Loja, bajo la dirección de la Bq. Luisa Ivonne Celi Román, Mg. Sc. en la ciudad de Loja-Ecuador.

Por tanto, otorgo el presente certificado en honor a la verdad y el consentimiento a Jarellys Carolina Eras López y Rebeca de los Ángeles Montero Paccha para que puedan dar el uso que estimen conveniente.

Atentamente,



Lic. Michelle López Jiménez

1900839182