



Impacto de la diversificación de variantes del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19 en Colombia frente al escape de anticuerpos neutralizantes generados por inmunidad natural y vacunal

DIEGO ALEJANDRO ÁLVAREZ-DÍAZ

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Bogotá D.C.
2023



Impacto de la diversificación de variantes del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19 en Colombia frente al escape de anticuerpos neutralizantes generados por inmunidad natural y vacunal

DIEGO ALEJANDRO ÁLVAREZ-DÍAZ

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias – Biología

Director:

Orlando Torres-Fernández MSc, PhD
Coordinador, Grupo de Morfología Celular
Dirección de Investigación en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Co-Director:

Jaime E. Castellanos MSc, PhD,
Profesor Titular, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.
Director, Instituto de Virología, Universidad El Bosque.

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Bogotá D.C. Colombia

2023

Dedicatoria:

A mi madre, por inculcarme amorosamente el ejemplo de la tenacidad para alcanzar las metas.

A mi esposa, la científica más talentosa que conozco, la persona que más amo y la evidencia de que los tiempos de crisis pueden traer consigo bendiciones inimaginables cuando tienes la madurez para recibirlas.

A las personas que fallecieron a causa de la infección por el SARS-CoV-2.

A la universidad pública, de quien también soy hijo, transformadora de vidas, gestora de ideas, de amig@s y oportunidades para concebir sueños y hacerlos realidad.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Diego Alejandro Álvarez Díaz

Fecha 31/01/2023

Agradecimientos

A todas las personas que amable y desinteresadamente donaron sus muestras para el desarrollo de este estudio. A Marcela Mercado quien dirigió con verdadera convicción de líder la Dirección de Investigación en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS) – Colombia y tuvo la visión temprana de enfocarme en este estudio antes de que llegara el SARS-CoV-2 al país. A la Doctora Ana Luisa Muñoz de la Fundación Banco Nacional de Sangre Hemolife, quien compartió sus conocimientos y experiencia, fundamentales desde el primer experimento de estandarización y desarrollo de ensayos de neutralización del SARS-CoV-2, hasta la publicación de los resultados más relevantes de este estudio. A María Teresa Herrera, del INS, quien se unió a este estudio para apoyar los ensayos de neutralización y evaluación de anticuerpos contra antígenos del SARS-CoV-2 mediante Luminex con la mejor actitud y dedicación, además de brindarme su valiosa amistad. A Katherine Laiton y Carlos Franco, amigos y colegas del INS con quienes, desde el inicio de la pandemia, en oficinas, laboratorios e insumos prestados, pero armados de talento, pasión por la ciencia y habilidades antes desconocidas en el oficio de coteros, entre otros; la realidad superó las expectativas cuando gestamos la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en el Colombia, los Laboratorios de Ciencias Ómicas y el Laboratorio BSL-3 del INS. Al Doctor Orlando Torres, mi director de Tesis Doctoral y su grupo de Morfología Celular del INS por sus valiosas observaciones a esta investigación y brindarme el escenario científico perfecto para desarrollar este trabajo. Al Doctor Jaime Castellanos, mi codirector de Tesis Doctoral por la confianza y dedicación depositada en este estudio. A todos mis compañeros del grupo Genómica de Microorganismos Emergentes que nació de nuestro esfuerzo para responder con investigación a la toma de decisiones en salud pública para controlar la pandemia de COVID-19, y ahora está proyectado a responder a la emergencia y reemergencia de futuros brotes por microorganismos en el País.

RESUMEN

Impacto de la diversificación de variantes del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19 en Colombia frente al escape de anticuerpos neutralizantes generados por inmunidad natural y vacunal

La vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia permitió identificar la importación y emergencia autóctona de variantes de preocupación (VOC) o de interés (VOI) del SARS-CoV-2 con mutaciones asociadas al escape inmunológico o resistencia a la acción de los anticuerpos neutralizantes (nAbs) generados por infección natural o vacunación. Las vacunas contra el COVID-19 autorizadas en Colombia fueron diseñadas antes de la emergencia de las VOC/VOI, por lo que este estudio se enfocó en evaluar la capacidad de las variantes locales para escapar a los nAbs inducidos por la vacunación. Se realizaron aislamientos de linajes del SARS-CoV-2 que circularon durante los años 2020-2022 en Colombia. Se evaluaron las respuestas de los nAbs en individuos convalecientes, individuos no expuestos al SARS-CoV-2 (naïve) con esquemas primarios de CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1 o Ad26.COV2.S, en individuos con refuerzo homólogo, heterólogo e individuos con inmunidad híbrida-heteróloga. Las respuestas de los nAbs se evaluaron mediante ensayos de neutralización y el título medio de neutralización (MN50) se calculó por el método de Reed-Muench. Finalmente, se evaluaron anticuerpos totales IgM/IgG contra los antígenos S1, S2, RBD y contra la proteína N del SARS-CoV-2, en individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga mediante paneles Luminex. El linaje B.1 con la mutación E484K demostró capacidad moderada de escape a nAbs de sueros convalecientes, mientras que los niveles de nAbs fueron entre 3,3 a 55 veces menores contra Mu, Delta y Ómicron, comparado con B.1.111 y Gamma en individuos naïve con vacunación primaria. Además, las respuestas de los nAbs contra Mu y Ómicron fueron significativamente mayores tras el refuerzo heterólogo comparado con el esquema primario u homólogo. Finalmente, no se observaron diferencias en los niveles de nAbs contra Ómicron y anticuerpos IgG contra la subunidad S1 y el RBD entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga. Los resultados

sugieren que el refuerzo heterólogo rescata las respuestas neutralizantes contra VOI/VOCs a niveles comparables con individuos que presentan inmunidad híbrida.

PALABRAS CLAVE:

COVID-19, SARS-CoV-2, Variantes de interés, Variantes de preocupación, Anticuerpos neutralizantes, Vacunas, Vigilancia genómica.

ABSTRACT

Impact of the diversification of SARS-CoV-2 variants during the COVID-19 pandemic in Colombia against the escape of neutralizing antibodies generated by natural and vaccine immunity

Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in Colombia allowed us to identify the importation and autochthonous emergence of variants of concern (VOC) or of interest" (VOI) of SARS-CoV-2 with mutations associated with the escape of neutralizing antibodies (nAbs) generated by natural infection or vaccination. Vaccines against COVID-19 authorized in Colombia were designed before the emergence of VOCs/VOIs, so this study sought to assess the ability of local variants to escape vaccination-induced nAbs. Isolations of SARS-CoV-2 lineages circulating in Colombia were performed between 2020 and 2022. The nAbs responses were evaluated in convalescent individuals, individuals with no history of previous SARS-CoV-2 infection (naïve), individuals with primary schemes of CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1, or Ad26.COV2.S, individuals with homologous, heterologous boost, and individuals with hybrid-heterologous immunity. nAbs responses were assessed by neutralization assays and the mean neutralization titer (MN50) was calculated by the Reed-Muench method. Finally, total IgM/IgG antibodies against the S1, S2, RBD, and N antigens of SARS-CoV-2 were evaluated in individuals with heterologous and hybrid-heterologous immunity using Luminex panels. The B.1 lineage with the E484K mutation demonstrated moderate escape capacity to nAbs from convalescent sera, while nAbs levels were 3.3 to 55-fold lower against Mu, Delta, and Omicron, compared to B.1.111 and Gamma in naïve

individuals with primary vaccination. In addition, nAb responses against Mu and Omicron were significantly higher after heterologous boost compared to the primary or homologous regimen. Finally, no differences were observed in the levels of nAbs against Omicron and IgG antibodies against the S1 and the RBD antigens between individuals with heterologous and hybrid-heterologous immunity. The results suggest that heterologous boosting rescues neutralizing responses against VOI/VOCs at levels comparable to individuals with hybrid immunity.

Keywords:

COVID-19, SARS-CoV-2, Variant of interest, Variant of Concern, neutralizing antibodies, vaccines, genomic surveillance

CONTENIDO

Pág.

Lista de figuras.....	XI
------------------------------	-----------

Lista de tablas	XII
------------------------------	------------

INTRODUCCION.....	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
2. HIPÓTESIS	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. ESTADO DEL ARTE.....	21
4.1 La pandemia de COVID-19	21
4.2 Establecimiento de la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia	22
4.3 Identificación de variantes de interés y de preocupación del SARS-CoV-2	23
4.4 Vacunación contra el SARS-CoV-2 en Colombia	24
4.5 Impacto socioeconómico del COVID-19 en Colombia	25
4.6 Impacto en la Salud.....	26
5. OBJETIVOS	28
6. METODOLOGÍA.....	29
6.1. Población de estudio	29
6.2. Selección de muestras.....	29
6.3. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 1	31
6.3.1. Aislamiento viral y preparación de lotes virales.....	31
6.3.2. Secuenciación del genoma completo de los aislamientos virales	33
6.3.3. Ensamblaje de secuencias genómicas y análisis filogenéticos	33
6.3.4. Análisis molecular de primeros protocolos de rRT-PCR para la detección del SARS-CoV-2 disponibles en el sitio web de OMS	34
6.3.5. Evaluación del impacto en la salud de las primeras VOI y VOC que dominaron picos epidémicos de COVID-19 en Colombia.....	35
6.3.6. Titulación de virus mediante la determinación de dosis infecciosa media de cultivo de tejidos (TCID ₅₀)	35
6.4. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 2	36
6.4.1. Neutralización del SARS-CoV-2 con suero de individuos vacunados contra el 36	
6.4.2. Evaluación de anticuerpos totales IgM/IgG contra las proteínas espícula (S) y nucleocápside (N) del SARS-CoV-2.....	36
6.5. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 3	37
6.5.1. Identificación de anticuerpos IgM e IgG contra antígenos del SARS-CoV-2 ..	37
6.5.2. Análisis estadísticos	38
7. RESULTADOS	39
7.1. Genomas del SARS-CoV-2 en Colombia mostraron variabilidad genética en algunas regiones blanco para el diagnóstico de COVID-19.	39
7.2. Variantes que dominan picos epidémicos tienen alto impacto en la morbilidad por COVID-19 a pesar de su clasificación VOC o VOI.....	40
7.3. Aislamiento y titulación exitosa de linajes del SARS-CoV-2 en células Vero E6. 44	

7.2	Los títulos de nAbs en sueros de convalecientes son menores contra B.1+L249S+E484K relativo a variantes sin la mutación E484K	49
7.3	Los títulos de anticuerpos IgG anti-S inducidos por las vacunas contra el SARS-CoV-2 se correlacionan con los títulos de anticuerpos neutralizantes.....	50
7.4	Respuestas reducidas de nAbs contra variantes emergentes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COV2.S.....	51
7.5	Las respuestas de nAbs contra las variantes Mu y Ómicron incrementan dependiendo del esquema primario y la dosis refuerzo	54
7.6	Individuos con esquemas BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+mRNA-1273 presentan mejor desempeño de respuestas de nAbs contra Ómicron.....	57
7.7	Las respuestas de nAbs contra Ómicron no difieren entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga	60
7.8	Niveles comparables de anticuerpos IgG contra las subunidades S1, S2 y el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 entre individuos con inmunidad híbrida y heteróloga	61
7.9	Baja correlación entre títulos de nAbs contra Ómicron, frente a anticuerpos IgG anti-S1, S2, N y RBD en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga	63
7.10	Bajas respuestas de anticuerpos IgM contra antígenos del SARS-CoV-2 en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga.	63
8.	DISCUSIÓN.....	69
9.	CONCLUSIONES	79
10.	COMUNICACIÓN Y APROPIACIÓN PÚBLICA DE LOS RESULTADOS	80
10.1	Artículos publicados en el marco del presente estudio.....	80
10.2	Presentaciones en congresos y otros eventos científicos	81
10.3	Premios y distinciones	82
11.	CONSIDERACIONES AMBIENTALES.....	83
12.	CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD	83
13.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	84
14.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	86

Lista de figuras

Pág.

- Figura 1** Gráfico de desplegamiento multidimensional para desenlaces y condiciones de salud de COVID-19 y linajes de SARS-CoV-2. Las variables más cercanas entre sí sugieren una mayor asociación. Los diamantes grises delineados en rojo representan resultados clínicos (asintomáticos, sintomáticos, graves y fallecidos), los círculos representan linajes de SARS-CoV-2, síntomas, sexo, grupos de edad y comorbilidades. 42
- Figura 2.** a) y c) Imágenes representativas del efecto citopático en células Vero E6 causado por el SARS-CoV-2 en al día 3 post inoculación con una muestra de hisopado nasofaríngeo con diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por RT-PCR (protocolo de Berlín) con un valor C_T para el gen RdRp inferior a 25. b) y d) Control celular negativo de infección (Mock). Las imágenes a y b fueron tomadas en magnificación 10X, mientras que c y d en magnificación 4x en un microscopio invertido (Carl Zeiss™, Primovert) con cámara digital de 8 megapíxeles (ZEISS AxioCam 208 Color). 47
- Figura 3.** Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en individuos convalecientes no vacunados contra el SARS-CoV-2. a) Títulos neutralizantes de sueros convalecientes contra los linajes SARS-CoV-2 A.1, B.1.420, B.1.111 y B.1+L249S+E484K. b) Diferencias entre los títulos de anticuerpos neutralizantes relativo a B.1+L249S+E484K. *suero negativo histórico. 49
- Figura 4.** Comparación de las medias geométricas de los títulos de anticuerpos IgG anti-S. BAU: unidades de anticuerpo de unión. ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: Límite de detección 51
- Figura 5.** Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en individuos con esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COV2.S por variantes de SARS-CoV-2. **(a)** Comparación de GMT entre vacunas contra cada variante del SARS-CoV-2. **(b)** Comparación de GMT entre variantes de SARS-CoV-2 para cada vacuna. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección (<10). 53
- Figura 6** Comparación de respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios (dos dosis) vs. individuos con esquema primario más una dosis refuerzo. ChAdOx1-s+ChAdOx1-s, CoronaVac+BNT162b2, BNT162b2+ChAdOx1-s o BNT162b2+mRNA-1273. **(a)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario ChAdOx1-s vs. individuos con esquema ChAdOx1-s + ChAdOx1-s, **(b)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario CoronaVac vs individuos con esquema CoronaVac + BNT162b2, **(c)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario BNT162b2 vs. individuos con esquema BNT162b2 + ChAdOx1-s, **(d)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario BNT162b2 vs individuos con esquema BNT162b2 + mRNA-1273. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección. 56
- Figura 7.** Respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos inmunizados con esquemas primarios (dos dosis) más una dosis refuerzo de ChAdOx1-s + ChAdOx1-s, CoronaVac + BNT162b2, BNT162b2 + ChAdOx1-s o BNT162b2 + mRNA-1273. **(a)** Comparación de GMTs entre esquemas dosis-refuerzo por variante y **(b)** comparación de GMTs entre variantes de SARS-CoV-2 esquema. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección. 59
- Figura 8.** Comparación de respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga. La inmunidad heteróloga fue inducida por esquemas primarios (dos dosis) más refuerzo (una dosis) de BNT162b2+ChAdOx1-s o BNT162b2+ mRNA-1273, y la inmunidad híbrida-heteróloga fue inducida por los mismos esquemas de vacunación además de la confirmación de infección por SARS-CoV-

2 en algún momento del seguimiento. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección.	61
Figura 9. Ensayos de unión de anticuerpos basado en microesferas multiplex para medir la respuesta de anticuerpos IgG (a) e IgM (b) , contra 4 antígenos del SARS-CoV-2 (S1, S2, RBD y NP) en individuos con inmunidad heteróloga inducida por esquemas primarios (dos dosis) más refuerzo (una dosis) de BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+ mRNA-1273. Las líneas punteadas (rojas para esquemas BNT162b2+ChAd0x1-s con y sin inmunidad híbrida) y azules (esquemas BNT162b2+mRNA-1273 con y sin inmunidad híbrida) indican el umbral de positividad determinado mediante curvas ROC. MFI: Intensidad de fluorescencia media determinada usando la sustracción del pozo de fondo para eliminar las señales no específicas. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo.	66

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Grupos de individuos con diferentes esquemas de vacunación contra el SARS-CoV-2 e historial de infección	31
Tabla 2. Regiones blanco y conflictos de diseño de los cebadores y sondas analizados según la diversidad genética de las cepas colombianas de SARS-CoV-2.	40
Tabla 3 Resumen de datos de pacientes con COVID-19.....	43
Tabla 4. Banco de aislamientos virales del SARS-CoV-2.....	48
Tabla 5. Comparación de los títulos de anticuerpos IgG anti-S y neutralizantes en individuos con esquemas primarios de vacunas contra el SARS-CoV-2.	50
Tabla 6. Resumen de las respuestas de anticuerpos contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios de vacunación contra el SARS-CoV-2	54
Tabla 7. Resumen de las respuestas de anticuerpos contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos inmunizados con una dosis de refuerzo.	57
Tabla 8. Umbral de positividad, sensibilidad y especificidad de los ensayos Milliplex de anticuerpos contra antígenos del SARS-CoV-2.....	67
Tabla 9. Comparación de los títulos de anticuerpos IgG anti-S1, S2, N y RBD contra anticuerpos neutralizantes en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga contra el SARS-CoV-2.	68

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2, del inglés: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019
TCID50	Dosis infecciosa media del cultivo de tejidos (Median tissue culture infectious dose)
nAbs	Anticuerpos neutralizantes
MN50	Dilución que neutraliza el efecto citopático en el 50% de los pozos
GMT	Media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes
S	Proteína de la espícula del SARS-CoV-2 (del inglés Spike)
RBD	Dominio de unión al receptor
S1	Subunidad 1 de la proteína S del SARS-CoV-2
S2	Subunidad 2 de la proteína S del SARS-CoV-2
N	Proteína de la nucleocápside
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
VOI	Variante de interés (del inglés variant of interest)
VOC	Variante de preocupación (del inglés variant of concern)
MFI	Intensidad de fluorescencia media (del inglés median fluorescence intensity)
OMS	Organización Mundial de la Salud
INS	Instituto Nacional de Salud

INTRODUCCION

El SARS-CoV-2 es el agente etiológico de la enfermedad conocida como COVID-19. Es un virus con genoma de RNA cadena sencilla en sentido positivo perteneciente a la familia *Coronaviridae* y genero *Betacoronavirus*. Es un virus con envoltura o cubierta exterior y la partícula viral tiene alrededor de 120 nm de diámetro. En su interior, el ARN asociado a la nucleoproteína forma la nucleocápside que a su vez está envuelta en una bicapa fosfolipídica, donde se encuentran insertadas las proteínas estructurales Membrana (M), Envoltura (E) y espícula (S del inglés Spike). Esta última sobresale de la partícula viral dando la apariencia de una corona cuando se observa en el microscopio electrónico. El genoma de unas 30 mil bases codifica para las proteínas no estructurales en el gen ORF1ab y las proteínas estructurales que forman la partícula viral [1]. El virus fue descubierto a finales de diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan en China a partir de un brote de casos de enfermedad respiratoria con etiología desconocida. En los meses siguientes, el virus se dispersó por todo el mundo y se reportó el primer caso en Colombia el 6 de marzo del 2020 [2]. Desde entonces y hasta finales de mayo del 2023, en el país se han confirmado millones de casos por laboratorio y cerca de 143 mil muertes por COVID-19 [3], mientras que en el mundo la cifra asciende a cerca de 680 millones de casos y 7 millones de muertes por esta infección viral [4].

La vigilancia genómica del virus implementada a nivel global rápidamente permitió identificar las variaciones que se acumularon en el genoma del virus, a medida que este se transmitió entre individuos, con la consecuente clasificación en clados y linajes, inicialmente característicos de regiones particulares y posteriormente dispersadas por todo el mundo. Tras el primer año de pandemia, gracias a las estrategias de vigilancia genómica en el mundo, se reportaron unas variantes asociadas con aumentos inusitados en el número de casos, además de tener un perfil de mutaciones en el dominio de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés) de la proteína S, potencialmente asociadas con el aumento de la transmisión y reducción en la eficacia de tratamientos con anticuerpos y vacunas que estaban en fase de ensayo clínico. Posteriormente, este fenómeno fue reportado en

diferentes regiones en todo el mundo incluida Colombia, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló un sistema de asignación de letras del alfabeto griego y las subclasificó en variantes de preocupación (VOC por sus siglas en inglés) para aquellas que representan mayor riesgo para la salud porque hay evidencia directa de su asociación con el aumento de la transmisión, reducción en la eficacia de tratamientos y vacunas o mayor virulencia; y variantes de interés (VOI por sus siglas en inglés), para aquellas asociadas a brotes en múltiples regiones y tener marcadores moleculares potencialmente asociados a fenotipos observados en las VOC [5].

Tras la exposición inicial al SARS-CoV-2, la generación de anticuerpos contra la proteína S es determinante en la inmunidad contra el virus. Aquí, la respuesta inmune innata juega un papel importante en el reconocimiento del virus y será la base para la diferenciación de linfocitos T y B [6]; entre ellos, los linfocitos B plasmáticos. Estos son de especial importancia en este estudio, porque liberan una clase particular de anticuerpos, entre ellos, los anticuerpos neutralizantes (nAbs por sus siglas en inglés), capaces de bloquear la entrada del virus en la célula, al inhibir la interacción de la proteína S con el receptor celular conocido como enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2 por sus siglas en inglés) [7]. Por este motivo, la mayoría de las plataformas vacunales contra el SARS-CoV-2 buscan estimular la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína S [8].

Se conoce que los anticuerpos neutralizantes más potentes están dirigidos contra el RBD y contribuyen con el 90% de la neutralización de los sueros convalecientes, aunque una parte también está dirigida contra la región amino terminal [9]. Sin embargo, las mutaciones más frecuentes en las VOI/VOC tienden a acumularse precisamente en el RBD, donde generan cambios conformacionales que disminuyen la afinidad de unión a anticuerpos neutralizantes generados por inmunizaciones previas, a la vez que aumentan la afinidad por el receptor celular [10].

La vacunación masiva contra el SARS-CoV-2 fue una estrategia para controlar la dispersión del virus y las complicaciones asociadas a la infección; en Colombia se

inició en febrero del 2021 [11]. Sin embargo, debido a que las plataformas de vacuna fueron diseñadas con base en la cepa de Wuhan, la emergencia por las nuevas variantes constituyó un reto para la eficacia de dichas vacunas, reportada durante la fase de ensayos clínicos, ya que fueron diseñadas antes de la detección de estas variantes. De esta manera, en el país se aprobaron 5 plataformas de vacunas que consistieron en 2 vacunas de RNA de las compañías Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Moderna (mRNA-1273), dos vacunas de vectores adenovirales incompetentes para la replicación de las compañías Oxford–AstraZeneca (ChAdOx1) y Janssen – Johnson & Johnson (Ad26.COVS.2.S) [11]. Y finalmente la vacuna de virus inactivado de Sinovac (Coronovac). Para estas 5 plataformas, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, se estableció que el esquema primario debía ser de 2 dosis de la misma vacuna para el caso de las vacunas de RNA, Oxford–AstraZeneca y Sinovac, 1 una sola dosis para la de Janssen [8]. Varios estudios alrededor del mundo demostraron una caída de los títulos de anticuerpos neutralizantes, especialmente marcado contra diferentes VOI y VOC. No obstante, estas reducciones varían desde un escape inmunológico mínimo hasta total, dependiendo de la variante del SARS-CoV-2 y la población evaluada [12-14]. Por esta razón, a finales de octubre del 2021, la OMS realizó recomendaciones para la aplicación de una dosis refuerzo posterior al esquema primario, aclarando que la implementación de la dosis de refuerzo debe guiarse por la evidencia sobre la disminución de la efectividad de las vacunas, frente a factores como la circulación de variantes VOI y VOC [15]. En este escenario, es importante distinguir que cuando se administra un refuerzo con una vacuna igual al administrado en el esquema primario, se considera un refuerzo homólogo, mientras que el refuerzo con una vacuna diferente al esquema primario es un refuerzo heterólogo [16]. Adicionalmente, cuando un individuo es inmunizado por vacunación y además se infecta en cualquier momento (antes, durante o después de la vacunación) con el SARS-CoV-2, adquiere una condición denominada inmunización híbrida [17].

Por esta razón, frente a la implementación de múltiples vacunas contra el SARS-CoV-2 y la continua importación y emergencia por VOI y VOC en el país, este estudio buscó determinar el perfil de anticuerpos neutralizantes inducidos en

diferentes escenarios de inmunización, contra las variantes de alto impacto en Colombia, con el fin de generar información para identificar variantes de escape y orientar los programas de vacunación y el diseño de nuevas vacunas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia liderada por el Instituto Nacional de Salud (INS) desde la detección de los primeros casos en marzo del 2020, permitió caracterizar en tiempo real el historial de circulación de linajes del virus a partir de la secuenciación del genoma completo [18] y el muestreo basado en criterios de representatividad, siguiendo la guía de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para la selección de muestras del SARS-CoV-2 [19]. Esto reveló que los primeros dos picos epidémicos de COVID-19 en Colombia, entre junio y septiembre del 2020 y el de diciembre de 2020 a enero de 2021, respectivamente, estuvieron dominados por linajes B.1 (B.1.111, B.1.420 y B.1) que carecen de mutaciones asociadas al escape de anticuerpos neutralizantes (nAbs por sus siglas en inglés) [3]. El fin del segundo pico epidémico coincidió con la detección de las primeras variantes de preocupación (VOC) en el país, entre ellas, Alpha y Gamma, así como la emergencia de variantes autóctonas tales como B.1+L249S+E484K y B.1.621, ésta última reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la variante de interés (VOI) Mu [19,20].

Aunque se detectó tempranamente la co-circulación de variantes del SARS-CoV-2 con las mutaciones E484K y/o N501Y en la proteína de la espícula (S), las variantes Mu y Gamma reportadas en regiones opuestas del país (Caribe y Amazonas respectivamente), dominaron el tercer pico epidémico entre abril y agosto del 2021, hasta que fueron desplazadas gradualmente por una nueva VOC conocida como Delta (principalmente el sublinaje AY.25), de julio a diciembre de 2021, aunque dicha variante no estuvo asociada con un aumento de casos de COVID-19. Poco después, la llegada de la variante Ómicron (principalmente el sublinaje BA.1), se

asoció con un aumento de casos de COVID-19 y generó el cuarto pico epidémico desde finales de diciembre de 2021, resultando en el desplazamiento total de los linajes Delta a finales de enero de 2022 y fue la variante dominante hasta mayo del mismo año [3]. Curiosamente, la mutación E484K está ausente en las variantes Delta y Ómicron, mientras que la mutación N501Y está presente sólo en Ómicron, sin embargo, diferentes estudios sugieren que estas variantes escapan a nAbs generados por vacunas como CoronaVac y BNT162b2 [13,21].

Diferentes estudios clínicos de fase III sobre la eficacia de las vacunas antes de la aparición de las VOI/VOC sugieren, respectivamente, una eficacia contra la COVID-19 sintomática y grave del 82 %-100 % y del 75 %-95 % para BNT162b2 (Pfizer), 98 %-100 % para mRNA-1273 (Moderna), 66%-81% y 100% para ChAdOx1 (AstraZeneca), 72%-74% y 85% para Ad26.COVS (Janssen) y 50%-83% y 100% para CoronaVac (Sinovac) [12]. Sin embargo, el surgimiento de las VOI/VOC en diferentes regiones del planeta desde finales del 2020, desafió dichas estimaciones. Varios estudios en todo el mundo evidenciaron una disminución sustancial del título de anticuerpos neutralizantes contra diferentes VOC/VOI, respecto a linajes ancestrales del SARS-CoV-2, en individuos con regímenes completos de las vacunas contra el SARS-CoV-2 aprobadas en el año 2021 [12].

La evidencia de la co-circulación de VOI y VOC del SARS-CoV-2 en el país señala la importancia de caracterizar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por vacunas o infección natural frente a estas variantes, con el fin de estimar su potencial capacidad de escape a la inmunidad generada por las vacunas aprobadas en el país, información que será de gran utilidad para el rediseño de vacunas y estrategias de vacunación.

Por esta razón, este estudio se enfocó en responder a la pregunta ¿Las variantes del SARS-CoV-2 de alto impacto en Colombia presentan capacidad de escape a anticuerpos inducidos por vacunas o infección natural?

2. HIPÓTESIS

H0. Las variantes del SARS-CoV-2 con mutaciones asociadas a la resistencia a anticuerpos neutralizantes, incluidas las VOC y VOI que circularon durante los 2 primeros años de la pandemia en Colombia, no presentan la habilidad de escapar a nAbs inducidos por la infección natural o la vacunación.

H1. Las variantes del SARS-CoV-2 con mutaciones asociadas a la resistencia a anticuerpos neutralizantes, incluidas las VOC y VOI que circularon durante los 2 primeros años de la pandemia en Colombia, presentan diferentes grados de escape a anticuerpos inducidos por la infección natural o la vacunación.

3. JUSTIFICACIÓN

El INS – Colombia, entidad que lidera la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en el país desde la detección de los primeros casos en marzo del 2020 [18], reportó a partir de un muestreo probabilístico en las cinco regiones de Colombia, en enero del 2021, la introducción de la VOC Gamma y la emergencia de linajes autóctonos con la presencia de mutaciones en la proteína S, asociadas al aumento de la transmisión del virus y el escape a nAbs [3]. En este contexto, en la región caribe del país se identificó un grupo de secuencias con un perfil característico de mutaciones, incluidas L249S y E484K en la proteína S, a partir del cual se propuso la asignación de un nuevo linaje denominado B.1+L249S+E484K [20]. Esta última mutación conocida por surgir en diferentes VOI y VOC en todo el mundo de forma independiente, probablemente por convergencia evolutiva al favorecer el escape de anticuerpos neutralizantes [22], se considera suficiente para calificar a una variante del SARS-CoV-2 como VOI [23]. Simultáneamente y en la misma región del país, se reportó la emergencia del linaje B.1.621 caracterizado por un perfil de 8 mutaciones en la proteína S, tres de ellas (R346K, E484K y N501Y) ubicadas en el dominio de unión al receptor celular de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) con

el potencial de conferirle propiedades de escape a anticuerpos neutralizantes [19]. Para el 30 de agosto del 2021, éste linaje fue reconocido como una variante de interés por la OMS y se le asignó la letra griega Mu (μ) de acuerdo con la nomenclatura propuesta por esta organización [5]. Meses antes de esta alarma, las variantes Mu y Gamma se habían dispersado por todo el territorio nacional y dominaron el tercer pico epidemiológico del COVID-19 entre abril y junio del 2021, asociándose con cerca del 53% y 23% de los casos respectivamente [3]; además, se habían reportado más de 4500 secuencias de la variante Mu en 39 países [24]. Tras finalizar el tercer pico epidémico a mediados de septiembre del 2021, la variante Mu se asoció con el 76% de los casos, mientras que los casos asociados con Gamma se redujeron al 6%, y una nueva VOC conocida como Delta, ingresó al país a mediados de junio del 2021 y desplazó gradualmente a las variantes Mu y Gamma hasta alcanzar un 80% de prevalencia a finales de octubre del 2021. Posteriormente, la identificación de los primeros casos de la VOC Ómicron a mediados de diciembre del 2021 marcaría el inicio del cuarto pico epidémico, en el cual ésta variante desplazó a Delta en pocas semanas hasta asociarse al 100% de los casos a finales de enero del 2022 [3].

Estudios independientes alrededor del mundo han evidenciado reducciones significativas en la respuesta de anticuerpos neutralizantes en individuos vacunados frente a las variantes Gamma, Delta, Mu y Ómicron, no obstante, estas reducciones varían desde un escape mínimo hasta total dependiendo de la variante del SARS-CoV-2 y la población evaluada [12-14]. Esto resalta la necesidad de caracterizar el perfil de anticuerpos neutralizantes en el contexto de las variantes del SARS-CoV-2 que circulan en cada país con el fin de contribuir en la estimación global de la efectividad de la inmunidad inducida por la infección natural y las vacunas contra el SARS-CoV-2.

Al inicio de la pandemia de COVID-19 la infraestructura de laboratorios de investigación en el país para la manipulación de microorganismos infecciosos clasificados en el grupo 3 de riesgo biológico, era limitada, razón por la cual, durante el año 2020 e inicios del 2021, el INS estableció los protocolos para la

implementación de un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) que permitió el desarrollo de ensayos de aislamientos del SARS-CoV-2 desde muestras de pacientes infectados. Con lo cual, se abrió la posibilidad de generar biobancos de aislamientos virales con los linajes más representativos que circularon en el país. Adicionalmente, el INS cuenta con un biobanco de sueros de pacientes con historial de infección por SARS-CoV-2 y de vacunados con esquemas primarios de las vacunas CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1 y Ad26.COV2.S. Esto permitió establecer el insumo base para desarrollar estudios sobre la capacidad de escape a anticuerpos neutralizantes frente a variantes genéticas del SARS-CoV-2 con alto impacto en Colombia, así como las bases para desarrollar otras investigaciones dirigidas a comprender la patogénesis del SARS-CoV-2 y otros agentes del mismo grupo de riesgo.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 La pandemia de COVID-19

A finales de diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, ubicada en la provincia de Hubei, China, un brote de neumonía de etiología desconocida desencadenó una pandemia de proporciones no registradas en los últimos 100 años [1,25]. El agente etiológico conocido inicialmente como 2019-nCoV, un virus perteneciente a la familia Coronaviridae, género *Betacoronavirus*, fue reconocido como un nuevo clado dentro de la especie SARSr-CoV con base en análisis filogenéticos que evidenciaron una identidad de secuencia en los dominios replicasa conservados (ORF 1ab) superior al 90% entre el 2019-nCoV y el SARS-CoV [26]. Posteriormente, el virus fue denominado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) [27].

En los meses siguientes a los primeros reportes de Wuhan, la enfermedad por el SARS-CoV-2 se dispersó por todo el mundo, razón por la cual, el 11 de marzo del

2020, la Organización Mundial de Salud (OMS) declaró al COVID-19 como una pandemia [28]. En Colombia, los primeros casos de COVID-19 se identificaron desde el 6 de marzo de 2020 en viajeros procedentes de Europa. Pocas semanas después, frente al aumento de casos asociados a transmisión comunitaria extensa, el gobierno declaró el cierre de fronteras y el inicio de las cuarentenas que marcaron la fase de mitigación del COVID-19 [29]

4.2 Establecimiento de la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia

A partir de los primeros acercamientos a la vigilancia genómica de agentes causantes de enfermedades de alto impacto en el país como los virus del Dengue, Chikungunya, Zika y vectores de la malaria [30-33], los investigadores del INS en cooperación con otras entidades nacionales, rápidamente tomaron acciones para implementar la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en el país por su utilidad en la identificación de cambios en el genoma del virus desde su origen en China y su aplicación en el implementación o refinamiento de métodos de diagnóstico, vacunas y tratamientos [18]. En consecuencia, las primeras secuencias del SARS-CoV-2 obtenidas en Colombia permitieron identificar la presencia de mutaciones en diferentes posiciones genómicas de los primeros virus introducidos en el país, con el potencial de afectar negativamente el desempeño de las pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS al inicio de la pandemia [34,35].

Posteriormente, el análisis de los genomas del SARS-CoV-2 desde muestras representativas de regiones del territorio nacional permitió reconstruir la epidemiología genómica del SARS-CoV-2 en el país al describir varias introducciones independientes del virus y la documentación de 12 linajes como punto de inicio de la dispersión del SARS-CoV-2 en Colombia [29]. Esto permitió establecer las bases en el país para la identificación de linajes emergentes del SARS-CoV-2 descendientes del linaje B.1 Europeo caracterizado por la mutación D614G en la proteína S. Adicionalmente, los datos tempranos de la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia complementaron la información para

Suramérica y evidenciaron el desplazamiento del linaje ancestral A.1 con la posición conservada D614, por linajes B.1 entre marzo y abril del 2020 en todo el continente [35]. Esta mutación, aunque no impactó la efectividad de los anticuerpos neutralizantes, fue la primera en ser asociada con incrementos en la tasa de transmisión y replicación en modelos celulares y animales [36,37].

4.3 Identificación de variantes de interés y de preocupación del SARS-CoV-2

Lo primeros reportes de linajes del SARS-CoV-2 con mutaciones asociadas al escape de anticuerpos neutralizantes (nAbs) surgieron de la vigilancia genómica de variantes que emergieron por circulación autóctona en Europa, África y Suramérica entre octubre y diciembre del 2020 [38]. Dichos linajes, nombrados de acuerdo con la nomenclatura sugerida por la OMS como Alpha, Beta y Gamma, respectivamente, fueron los primeros en ser categorizados como variantes de preocupación (VOC por sus siglas en inglés) después de que múltiples estudios epidemiológicos y de laboratorio evidenciaron aumentos en la transmisión asociados a estas variantes y una menor sensibilidad a nAbs generados por vacunas o infección natural [38]. Adicionalmente, la categoría de variante de interés (VOI) se le asignó a linajes emergentes del SARS-CoV-2 con la presencia de mutaciones asociadas con aumentos en la transmisión, evasión del sistema inmune y evidencia epidemiológica que sugiera un riesgo emergente para la salud pública mundial [5].

Inicialmente, estudios de comparación de secuencias evidenciaron que las mutaciones como E484K y/o N501Y en el dominio de unión al receptor (RBD) celular ACE2 de la proteína de la espícula (S), emergieron de forma independiente en diferentes VOI/VOC del SARS-CoV-2 en todo el mundo [23]. Posteriormente, la evidencia funcional de estas mutaciones surgió de estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Estudios *in silico* e *in vitro* de interacción proteína-proteína sugirieron que la mutación N501Y incrementa la afinidad por el receptor celular ACE2 [39], reflejada en aumentos en la replicación en modelos de tracto respiratorio *in vivo* e *in vitro*,

por lo cual, se considera que ésta mutación es un determinante importante del aumento de la transmisión de variantes como Alpha [40]. Adicionalmente, se evidenció que las variantes con la mutación doble E484K/N501Y presentan mayor afinidad que aquellas con sólo la mutación N501Y o triples mutantes N501Y/E484K/K417N [39,41]. En contraste, la mutación E484K sola aumenta ligeramente la afinidad por el receptor ACE2, pero estudios con pseudovirus recombinantes y VOC como Beta y Gamma evidenciaron la asociación de esta mutación con la evasión de la respuesta inmune humoral al disminuir la unión de nAbs monoclonales, de plasma convaleciente y post-vacunales [23,42,43].

4.4 Vacunación contra el SARS-CoV-2 en Colombia

En Colombia se aprobaron 5 vacunas contra el SARS-CoV-2 y el programa nacional de vacunación contra el virus inició el 17 de febrero del 2021. Para la primera semana de junio del 2022 se habían administrado cerca de 84 millones de dosis de vacunas. La vacuna de virus completo inactivado CoronaVac (Sinovac Life Sciences, Beijing, China) y la BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), una vacuna basada en ARNm que codifica el gen completo de la proteína S del SARS-CoV-2, son las dos principales vacunas administradas en el país representando el 31,5% y el 30,3% de las dosis, respectivamente. Además, las vacunas ChAdOx1 (Oxford-AstraZeneca) y Ad26.COV2.S – Janssen (Johnson & Johnson) que se basan en vectores adenovirales incompetentes para la replicación, que expresan una variante de la proteína S del SARS-CoV-2 representan el 15,5% y 8,5% de las dosis administradas, respectivamente. Finalmente, la vacuna mRNA-1273 (Moderna), otra vacuna de ARNm que codifica el gen S del SARS-CoV-2, representa el 14,2% de las dosis administradas en el país. Sin embargo, alrededor de 36 millones de personas han recibido el esquema primario de vacunación de dos dosis de CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1 o Moderna, y una dosis de Ad26.COV2.S, mientras que aproximadamente 13 millones han recibido una dosis de refuerzo con la misma vacuna (homóloga) o una diferente al esquema primario (heteróloga) [11,12].

Por otro lado, se ha evidenciado que los títulos de anticuerpos totales contra el SARS-CoV-2 son significativamente más altos en individuos con historia previa de COVID-19 y posteriormente vacunados con CoronaVac o BNT162b2, [44,45]. La inmunidad humoral conferida por la combinación de infección previa y vacunación se conoce como inmunidad híbrida [46]. En Colombia, estudios de seroprevalencia antes y al inicio del programa de vacunación, evidenciaron seropositividades contra el virus entre el 26 al 68% [47,48], por lo cual, se espera un porcentaje importante de individuos con inmunidad híbrida en la medida en que avance el programa nacional de vacunación contra el COVID-19, no obstante, se desconoce la capacidad de escape a este tipo de inmunidad de las variantes que circulan en el país.

4.5 Impacto socioeconómico del COVID-19 en Colombia

La pandemia de COVID-19 además del evidente impacto en la salud humana, también ha tenido un fuerte impacto socioeconómico. La combinación de medidas estrictas de distanciamiento social y confinamientos adoptados por los gobiernos mundiales al inicio de la pandemia durante la fase de contención, resultaron efectivas en aspectos como la reducción la transmisión de la enfermedad, prevenir el colapso de los servicios de salud y reducir la mortalidad [49]. Sin embargo como anunció tempranamente la OMS, en America Latina y el Caribe, estas medidas tuvieron un fuerte impacto negativo en el sector de servicios donde la población mayoritaria esta compuesta por trabajadores informales con capacidad de ahorro limitada y ausencia seguros de desempleo [50]. En Colombia se estimó que de los 13.3 millones de trabajadores confinados, el 70% eran informales, aunque se registraron diferencias regionales en pérdidas económicas por las medidas de aislamiento que oscilaron entre el 5.4% del producto interno bruto (PIB) en la región del Amazonas, hasta el 6.3% del PIB en el eje cafetero y Antioquia, cifras equivalentes a más de 48 y 65 trillones de pesos colombianos [51].

Respecto al gasto en salud durante la pandemia por COVID-19 un estudio de la Asociación Nacional de Empresarios -ANDI- y la Universidad de Antioquia con base

en datos del Fondo Monetario Internacional, estimó que desde marzo del 2020 a marzo del 2021, Colombia destinó recursos del Fondo de Mitigación de Emergencias (FOME) con los que incrementó el gasto fiscal en un 1.4% (\$15,89 billones de pesos) del PIB para el sector salud buscando afrontar la emergencia mediante la implementación de medidas como la ampliación de la oferta de servicios de salud incluidas y unidades de cuidados intensivos (UCI), compra de equipos biomedicos e insumos de laboratorio para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica, así como la adquisición de vacunas contra el SARS-CoV-2 entre otros [52].

Cerca del 30% de los recursos del FOME, unos 4.7 billones de pesos, fueron destinados a la adquisición de vacunas contra el SARS-CoV-2 [52]. Dicha inversión, según estudios del Observatorio Nacional de Salud del INS resultó altamente costo-efectiva en términos de años de vida saludable perdidos (AVISA), al estimar que desde el inicio de la pandemia hasta principios de agosto de 2021, la carga de la enfermedad por COVID-19 disminuyó desde 2,4 millones de AVISA, a menos de 2,15 millones de AVISA si no se hubiera vacunado la población [53]. Adicionalmente, el estudio estimó que los gastos directos de la pandemia (representados en el manejo pacientes sintomáticos, hospitalizados, UCI y muertes por COVID-19), se redujeron desde \$18.680 millones por día en un escenario sin inmunización, a \$14.535 millones en el escenario de vacunación para el tercer pico de la pandemia, donde se presentó el mayor número de casos de COVID-19 en el país [54] con una cobertura de vacunación del 28.6% de la población [11]. No obstante, para el cuarto pico entre diciembre de 2021 y febrero de 2022, donde se esperaba una cobertura de vacunación del 70%, el estudio estimó un gasto diario de \$2.640 millones, en contraste con los \$35.203 millones en el escenario sin vacunación [53].

4.6 Impacto en la Salud

Aunque el conjunto de las medidas de distanciamiento social, farmacológicas y no farmacológicas, tuvo un impacto positivo en la mitigación del impacto de la pandemia en la salud de la población colombiana, para el 14 de diciembre de 2022

se habían confirmado por laboratorio 6.317.010 casos de infectados y 141.881 fallecidos a causa del COVID-19 en el país [3]. Además, de acuerdo con los reportes de la situación del COVID-19 en Colombia por la OPS [55], para el periodo del 22 al 29 de Junio del 2021, durante el tercer pico epidémico, se presentó el mayor número de casos de COVID-19 en la historia de la pandemia del país [3], el porcentaje de hospitalización fue del 0,5%, el cual para el 2022 descendió progresivamente al 0,1% durante el cuarto pico entre el 18 de enero al 3 de febrero, hasta el 0,01% durante el quinto pico epidémico con el histórico del menor registro de casos de COVID-19 en el país entre el 30 de junio y el 7 de Julio. Respecto a los casos que requirieron hospitalización en UCI, los porcentajes fueron del 0,1% para el tercer y cuarto pico, y del 0.01% para el quinto pico [55]. Curiosamente, las proporciones de hospitalizaciones durante los periodos del valle epidémico previo a cada pico fueron relativamente iguales al pico posterior y siguieron la misma tendencia de disminución en función del tiempo [55].

La disminución de los porcentajes de hospitalización e internación en UCI por COVID-19 en función del tiempo coincidió con el programa de vacunación masiva en Colombia que inició a mediados de febrero del 2021 [11]. Esto se observó también a escala global y demostró la efectividad de las vacunas genéticas y de virus inactivados para proteger contra la severidad y letalidad por COVID-19 [56,57]. No obstante, desde el inicio de la pandemia se identificó que los individuos mayores de 60 años de edad constituyen la mayoría de los casos severos y fallecimientos por COVID-19 [58], en los cuales, la presencia de comorbilidades como enfermedades renales, cardiovasculares, diabetes y la obesidad aumentan las posibilidades de un desenlace severo o fatal [53,58,59].

La hipertensión arterial fue una de las comorbilidades más frecuentes entre los pacientes con COVID-19 severo en el mundo al inicio de la pandemia, no obstante, la implementación de medidas de salud pública, como la priorización de los pacientes con hipertensión en los servicios de salud y el plan nacional de vacunación, contribuyeron a disminuir la asociación entre hipertensión arterial y severidad del COVID-19 en el segundo año de la pandemia [60]. Lo anterior demuestra la

efectividad de las medidas de salud pública basadas en la vacunación y seguimiento de casos de COVID-19 en el control de la mortalidad asociada, sin embargo, se deben aplicar más esfuerzos para controlar la dispersión de variantes con predominio local así como monitorear las respuestas de nAbs a variantes emergentes de SARS-CoV-2 en la población vacunada con el fin de mejorar las estrategias de vacunación.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad de escape de las variantes de SARS-CoV-2 representativas del periodo 2021-2022 en Colombia frente a anticuerpos de individuos con inmunidad humoral híbrida y heteróloga.

Específicos

1. Establecer un repositorio de aislamientos del SARS-CoV-2 con linajes de alto impacto durante la pandemia de COVID-19 en Colombia de utilidad en el desarrollo de pruebas de neutralización de anticuerpos.
2. Determinar el efecto de la inmunidad humoral híbrida y heteróloga sobre la capacidad neutralizante contra variantes del SARS-CoV-2 con mutaciones asociadas al escape de anticuerpos neutralizantes.
3. Describir el patrón de isotipos de inmunoglobulinas para SARS-CoV-2 en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga.

6. METODOLOGÍA

6.1. Población de estudio

Para el aislamiento de las variantes del SARS-CoV-2 de alto impacto en Colombia, se consultaron las variantes con mayor porcentaje de prevalencia durante el periodo marzo 2020 a enero del 2022 que se reportaron en el micrositio de datos de genomas del SARS-CoV-2 del INS (www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-genoma.aspx). Posteriormente, se seleccionaron muestras de hisopados nasofaríngeos de individuos captados durante el programa nacional de vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Colombia [54], con RT-PCR positiva para el SARS-CoV-2 con C_T menor 25 como criterio de inclusión, secuenciación del genoma completo y asignación de linajes PANGOLIN (v.3.1.20).

Para la determinación de las respuestas de nAbs contra las variantes del SARS-CoV-2, se evaluaron muestras de individuos sin historial de COVID-19 inmunizados con un esquema primario de las vacunas BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 o Ad26.COV2.S. Adicionalmente, se evaluaron las respuestas de nAbs en individuos con y sin historial de COVID-19 que recibieron una dosis de refuerzo adicional al esquema primario de vacunación. Se evaluaron muestras de por lo menos 20 individuos con esquemas primarios, 20 individuos con refuerzo 20 individuos vacunados con historial de infección por SARS-CoV-2.

6.2. Selección de muestras

Las muestras de hisopados nasofaríngeos empleadas para el aislamiento viral fueron recolectadas entre marzo de 2020 y febrero de 2022 en el marco del programa nacional de vigilancia genómica del SARS-CoV-2 y el proyecto CORHUCO aprobado por el Comité de Ética del INS (CEMIN)-10-2020. Las muestras de sueros fueron recolectadas en la ciudad de Bogotá, de individuos con consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética INS (CEMIN)-

10-2020, (CEMIN)-04-2021 y (CEMIN)-019-2021. Se recolectó una muestra de sangre (7 ml) de cada participante mediante venopunción. Las muestras de sangre fueron centrifugadas, luego se almacenaron 2 mL de suero en viales y se congelaron a -70 °C hasta su procesamiento. Las muestras de suero se recolectaron entre marzo de 2020 y mayo de 2022.

Para la estandarización de los ensayos de microneutralización se emplearon cinco muestras de suero de individuos convalecientes no vacunados (n = 5; todos hombres, rango de edad de 26 a 46 años), con diagnóstico de COVID-19 confirmado por RT-PCR en tiempo real. Posteriormente se evaluaron sueros de cuatro cohortes de individuos (mujeres y hombres entre 18 y 81 años) inmunológicamente naïve (no expuestos previamente) al SARS-CoV-2, que recibieron esquemas primarios de las vacunas de 1) BNT162b2 (Pfizer), 2) ChAdOx1 (AstraZeneca), 3) CoronaVac (Sinovac) o 4) Ad26.COV2.S (Janssen), las cuales consistieron en una o dos dosis de acuerdo con las recomendaciones establecidas por cada fabricante [8]. Las tres primeras cohortes recibieron un esquema de inmunización de dos dosis con intervalos de cuatro semanas. La cuarta cohorte solo recibió una dosis como esquema primario. Para las primeras 3 cohortes (Pfizer, AstraZeneca y Sinovac), se incluyeron muestras de suero recolectadas 13 semanas después de recibir la primera dosis (que corresponde a 9 semanas después de la segunda dosis) de BNT162b2, CoronaVac y ChAdOx1. Mientras que las muestras de pacientes vacunados con Ad26.COV2.S se recolectaron 20 semanas después de recibir una dosis de esta vacuna (**Tabla 1**). Adicionalmente, se evaluaron muestras de individuos inmunológicamente naïve al SARS-CoV-2, a los 30 días de recibir una dosis de refuerzo homólogo o heterólogo posterior al esquema primario de vacunación (**Tabla 1**). Se excluyeron personas con infección previa o en curso por SARS-CoV-2 durante el seguimiento clínico, o con presencia de anticuerpos totales contra el SARS-CoV-2 en el momento de la administración de la primera dosis de la vacuna.

Finalmente, se evaluaron muestras de individuos con historial de infección en cualquier momento del esquema de vacunación que recibieron esquemas primarios

de la vacuna BNT162b2 y una dosis de refuerzo heterólogo con la vacuna ChAdOx1 o Ad26.COVS.2 (Tabla 1).

Para los individuos inmunizados con las vacunas BNT162b2, ChAdOx1 y Ad26.COVS.2 que codifican el gen completo de la proteína S del SARS-CoV-2, el historial de infección se verificó por la presencia de anticuerpos contra la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2 ya que estos son detectables tras la infección o vacunación con CoronaVac. La inmunidad híbrida en vacunados con CoronaVac se confirmó en individuos que reportaron infección por el virus tras recibir la vacuna y con diagnóstico confirmado por RT-qPCR. Para todos los individuos vacunados, se evaluó la presencia de anticuerpos anti-S antes de la vacunación con el fin de confirmar infecciones previas.

Tabla 1. Grupos de individuos con diferentes esquemas de vacunación contra el SARS-CoV-2 e historial de infección

Esquema	Esquema primario (EP) (naïve)		Inmunidad homóloga o heteróloga (naïve)			Inmunidad híbrida (con historial de infección)		
	N (M/H)*	Rango edad (años)	EP + refuerzo	N (M/H)*	Rango edad (años)	EP + refuerzo	N (M/H)*	Rango edad (años)
BNT162b2	31 (3/28)	23 – 62	BNT162b2 + ChAdOx1-s	20 (15/5)	26 – 63	BNT162b2 + ChAdOx1-s	40 (30/10)	25 – 63
CoronaVac	30 (9/21)	18 – 58	BNT162b2 + mRNA-1273	20 (14/6)	24 – 65	BNT162b2 + mRNA-1273	30 (24/6)	30 – 64
ChAdOx1-s	31 (14/17)	50 – 81	ChAdOx1-s +ChAdOx1-s	19 (13/6)	66 – 73	-	-	-
Ad26.COVS.2	26 (10/16)	21 – 61	CoronaVac + BNT162b2	15 (8/7)	60 – 85	-	-	-

*M: mujeres H: hombres

6.3. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 1

6.3.1. Aislamiento viral y preparación de lotes virales

Se emplearon muestras de hisopado orofaríngeo positivas por RT-PCR para SARS-CoV-2 con un C_T inferior a 25 y con asignación de linaje del SARS-CoV-2 según descripción previa [29]. Cada espécimen se filtró con una membrana de 0,22 µm y

se inoculó por duplicado. Se sembraron células Vero (riñón de mono verde africano) E6 (ATCC CRL-1586™) en 5 mL de medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 2% de SFB inactivado, 1 µg/mL de penicilina/estreptomicina y glutamina al 1%, a una densidad de 5×10^5 células por frasco de cultivo T-25 e incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, durante 1-2 días, hasta alcanzar la confluencia para la inoculación. La inoculación de las células se realizó según lo descrito por To, Ka y colaboradores [61], cada frasco se inoculó con 0,25 ml de la muestra (dilución 1:2 en MEM) durante 60 minutos a 37°C, luego se añadieron 4 mL de MEM.

El efecto citopático (EC) inducido por el virus se examinó diariamente hasta observar EC durante 7 días. Posteriormente, los sobrenadantes de cultivo con las partículas virales se recolectaron en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 400g por 5 minutos a 4°C para precipitar detritos celulares. Seguidamente la fracción líquida se filtró con una membrana de 0.2 µm. El filtrado se distribuyó en alícuotas de 500 µL en tubos de 1.5 mL cada una, y se almacenaron a -70°C para su uso posterior. Todos los ensayos con virus SARS-CoV-2 infeccioso se realizaron en el laboratorio de biocontención nivel 3 del INS.

Los lotes de aislamiento viral se identificaron con un código de 9 caracteres así: el prefijo LVSC2 (acrónimo de lote viral de SARS-CoV-2) seguido de 9 dígitos alfanuméricos (p.ej. COV-VG-0001), que corresponden con el código del biobanco previamente asignado a dichas muestras. El lote resultante de la propagación se marcó con el sufijo P2, indicativo del número de pase. La información sobre la identificación de los lotes y cantidad de viales producidos se registró en el formato magnético “Base de datos de agentes de riesgo laboratorio BSL-3” FOR-R03.3103-002 del sistema integrado de gestión (SIG) del INS. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada lote viral para la secuenciación del genoma completo con el fin verificar la correspondencia con el linaje asignado originalmente a la muestra desde donde se obtuvo el aislamiento y descartar la presencia de nuevas mutaciones asociadas al pasaje por cultivo celular.

6.3.2. Secuenciación del genoma completo de los aislamientos virales

El ARN viral se obtuvo utilizando el estuche ExiPrep™ Viral RNA en el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos ExiPrep™48 Dx (Bioneer Corp, Yuseong-gu, Republic of Korea) y la detección de ARN del SARS-CoV-2 se realizó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el estuche SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU), siguiendo el protocolo Charité-Berlín [62] para la amplificación de los genes E (ensayo de detección de betacoronavirus) y RdRp (SARS-CoV-2 ensayos confirmatorios). Las muestras de ARN positivas para el SARS-CoV-2 se procesaron para la secuenciación del genoma viral completo [29] siguiendo el método de ensayo MEN-R03.3103-006 disponible en el SIG del INS. Para esto, se usó el protocolo de secuenciación en la plataforma Oxford Nanopore de la red ARTIC (LoCost - ver3) a partir de amplicones generados con una ADN polimerasa de alta fidelidad Q5® (New England Biolabs Inc., UK), para evitar la introducción de mutaciones artificiales. Los amplicones fueron empleados en la preparación de librerías de secuencia utilizando el estuche de ligación de ADN genómico (SQK-LSK109; Oxford Nanopore Technologies), y la secuenciación se realizó utilizando una celda de flujo FLOMIN106D (R9.5) en un equipo GridION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK).

6.3.3. Ensamblaje de secuencias genómicas y análisis filogenéticos

La asignación de bases a las lecturas de secuencias (*Basecalling*) se realizó mediante el software Guppy versión 3.2.2 (Oxford Nanopore Technologies), posteriormente las lecturas de cada aislamiento se “desmultiplexaron” y se recortaron los extremos de baja calidad usando Porechop versión 0.3.2_pre. Las lecturas procesadas se alinearon contra el genoma de referencia de SARS-CoV-2 (GenBank NC_045512.2) mediante el uso de la alineación Smith-Waterman de Burrows-Wheeler Aligner [63]. El llamado de variantes nucleotídicas se realizó cuando se encontraron profundidades superiores o iguales a 200X para el polimorfismo y luego se generó la secuencia consenso utilizando Nanopolish versión 0.13.2 cómo se describió [29].

Para el análisis filogenético de las secuencias consenso de los aislamientos virales se usaron 1856 secuencias de infecciones por SARS-CoV-2 en Colombia de la base de datos GISAID (del inglés Global Initiative on Sharing All Influenza Data) reportadas en el marco de la vigilancia genómica en el país. El conjunto de datos de secuencia se alineó con el software MAFFT v7 [64]. La alineación se curó manualmente para eliminar los UTR y corregir posibles desalineaciones. Se eliminaron las secuencias con una cobertura del genoma inferior al 90%, así como las secuencias idénticas redundantes. El conjunto de datos alineado contuvo secuencias con representantes de cada linaje circulando en Colombia hasta febrero del 2022 en cada región. Se realizó una reconstrucción del árbol de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+F+I+G4 usando IQTREE. El modelo de sustitución se seleccionó de acuerdo con el puntaje BIC más bajo utilizando el buscador de modelos IQTREE [64]. El soporte de rama se estimó con 1000 réplicas de una prueba de relación de verosimilitud aproximada similar a Sh (sH-aLRT) y 1000 réplicas de arranque ultrarrápidas.

Finalmente, se contrastaron los linajes obtenidos contra las secuencias y linajes reportados en la plataforma GISAID para verificar que correspondieran con el linaje asignado originalmente a la muestra desde donde se obtuvo el aislamiento.

6.3.4. Análisis molecular de primeros protocolos de rRT-PCR para la detección del SARS-CoV-2 disponibles en el sitio web de OMS

Un total de 39 secuencias de cebadores y sondas de 13 protocolos internos de rRT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 publicados en el sitio web de la OMS [65], se alinearon con la secuencia de referencia derivada del primer caso confirmado en Wuhan, provincia de Hubei, China, y denominada cepa Wuhan-1 (Número de acceso de GenBank: NC_045512.2). Los protocolos se dirigieron a 13 regiones del genoma diferentes dentro de los genes Orf1ab (Nsp9, Nsp10, Nsp11, RdRp, ExoN), E (Envoltura) y N (Nucleocápside), entre los cuales, el 61,5% (8 de 13) de los ensayos fueron dirigidos al gen N. Posteriormente, se alinearon las secuencias de los primeros 30 genomas del SARS-CoV-2 obtenidas en Colombia con los oligonucleótidos de los protocolos OMS usando la herramienta Muscle [66],

integrada en el software MEGA X [67]. Se generaron matrices de sustitución de los genomas colombianos respecto del genoma de referencia (NC_045512) a nivel de nucleótidos y aminoácidos para los 13 protocolos de rRT-PCR publicados en el sitio web de la OMS, aportados por varias instituciones alrededor del mundo.

6.3.5. Evaluación del impacto en la salud de las primeras VOI y VOC que dominaron picos epidémicos de COVID-19 en Colombia

Se incluyeron datos clínicos de 535 casos de COVID-19 con asignación de linaje del SARS-CoV-2, procedentes de 27 departamentos colombianos que representan el 80% del territorio. Entre el total de casos, 303 correspondieron a pacientes que sobrevivieron y muestreados entre junio de 2020 a agosto de 2021, mientras que 232 correspondieron a casos fatales muestreados principalmente durante el tercer pico epidémico entre abril y julio de 2021. Los datos clínicos (síntomas, comorbilidades, edad, sexo y antecedentes de tabaquismo) de los pacientes con COVID-19 se obtuvieron de la base de datos oficial del sistema de vigilancia en salud pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud - Colombia. Los resultados clínicos de COVID-19 se clasificaron en asintomáticos, sintomáticos, graves (cuando el paciente estaba hospitalizado) y fallecidos según el espectro de casos de COVID-19 descrito anteriormente [68]. Las asociaciones entre los resultados clínicos con las condiciones de salud y los linajes del SARS-CoV-2 se analizaron mediante despegamiento multidimensional (MDU) usando la herramienta Prefscal (IBM SPSS Statistics), donde los síntomas, las comorbilidades, el sexo, la edad, el historial de tabaquismo y el linaje del SARS-CoV-2 se calificaron como atributos de los resultados clínicos de COVID-19 según los datos recopilados de cada paciente.

6.3.6. Titulación de virus mediante la determinación de dosis infecciosa media de cultivo de tejidos (TCID50)

Los títulos de virus se determinaron mediante el método de punto final de dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID50). Se sembraron $7,5 \times 10^3$ células Vero E6 en 100 μ L en placas de 96 pocillos de 16 a 24 h antes de la infección. Luego, se realizaron diluciones seriadas del virus desde 10^{-1} a 10^{-10} , y se agregaron 100 μ L

de cada dilución al pozo respectivo (se realizaron ocho repeticiones para cada dilución) y se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5% durante 5 días. Posteriormente, el título viral se estimó mediante el método de Reed y Muench [69]. Todos los ensayos con virus SARS-CoV-2 infecciosos se realizaron en el laboratorio de biocontención nivel 3 del INS.

6.4. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 2

6.4.1. Neutralización del SARS-CoV-2 con suero de individuos vacunados contra el COVID-19

El título de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 en individuos convalecientes y vacunados se determinó mediante ensayos de microneutralización (MN). La dilución que neutralizó el efecto citopático en el 50% de los pozos (MN50) se calculó por el método de Reed y Muench [69]. Para esto, se adaptó la metodología publicada por Algaissi y Hashem [70]. Brevemente, la presencia de anticuerpos neutralizantes se evaluó por medio de diluciones seriadas 1:2 de muestras de suero en las que previamente se inactivó el complemento mediante calentamiento a 56°C por 30 minutos. Las diluciones fueron incubadas con 120 TCID₅₀ de cada variante del virus en MEM suplementado con FBS al 2% durante una hora a 37 °C. Posteriormente, la suspensión se transfirió a una monocapa de 7,5 x 10³ células Vero E6 y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 5 días.

Cada muestra se evaluó en pozos por triplicado. Como control negativo se utilizó una muestra con reactividad negativa para antígenos N y S del SARS-CoV-2 del banco de suero del 2020 previo al programa de vacunación y al brote de COVID-19 en el país.

6.4.2. Evaluación de anticuerpos totales IgM/IgG contra las proteínas espícula (S) y nucleocápside (N) del SARS-CoV-2

La presencia de anticuerpos anti-S totales (IgG/IgM) antes de la vacunación se verificó mediante el ensayo SARS-CoV-2 Total (COV2T, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Nueva York, NY, EE. UU.) (**Tabla complementaria S1**). La

presencia de anticuerpos IgG anti-nucleoproteína durante el seguimiento clínico de individuos vacunados con BNT162b2, ChAdOx1, Ad26.COVS.2 se verificó mediante el ELISA cualitativo ID Screen SARS-CoV-2-N IgG Indirect (ID Vet, Montpellier, France), siguiendo las instrucciones del fabricante (**Tabla complementaria S1**). Posteriormente, la concentración de anticuerpos IgG anti-S se analizó mediante el ensayo SARS-CoV-2 IgG (sCOVG, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Nueva York, NY, EE. UU.) en la plataforma ADVIA Centaur XPT (Siemens) (**Tabla complementaria S1**). El valor índice de corte se definió como reactivo $\geq 1,0$ U/mL. Los valores índice se expresaron en unidades de anticuerpos de unión por mililitro (BAU/mL) utilizando el factor de conversión estándar de la OMS de 21,8, según lo determinado para los ensayos de Siemens [71].

6.5. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 3

6.5.1. Identificación de anticuerpos IgM e IgG contra antígenos del SARS-CoV-2

Se emplearon dos paneles MILLIPLEX® SARS-CoV-2 Antigen (Millipore Sigma), para detectar la presencia de anticuerpos IgG (ref: HC19SERG1-85K) e IgM (ref: HC19SERM1-85K) contra las subunidades S1, S2 y RBD de la proteína S, y contra la proteína N de del SARS-CoV-2. El ensayo consiste en microesferas marcadas con un “código” de fluorescencia y conjugadas con los antígenos del SARS-CoV-2. Brevemente, 25 μ L de muestras de suero diluidas (1:100) fueron incubadas con las microesferas conjugadas con los antígenos S1, S2, RBD o N. Los complejos fueron lavados e incubados con un anticuerpo de detección (anti-IgG o IgM) conjugado con ficoeritrina. La fluorescencia emitida por los complejos fue leída en el equipo Luminex® TM 200 (Luminex Corp). Los paneles incluyen 4 perlas control que consisten en 1 control de ensayo negativo y tres microesferas de control de fluorescencia baja, media y alta; son combinadas las perlas conjugadas con los antígenos S1, S2, RBD o N. Debido a que la prueba arroja datos en bruto medidos como Intensidad de Fluorescencia Media (MFI), se utilizaron muestras con reactividad negativa para antígenos del SARS-CoV-2 del banco de suero del 2020 previo al programa de vacunación y al brote de COVID-19 en el país para definir el

umbral de detección para la presencia de los anticuerpos de interés en las diferentes muestras como se describió [72].

6.5.2. Análisis estadísticos

Las diferencias entre las medias geométricas de los títulos de neutralización (GMT) para BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COVS frente a cada variante del SARS-CoV-2 se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn para comparaciones múltiples donde el valor de p de $<0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se asignó un valor arbitrario de 5 a las muestras con $MN_{50} < 10$. El análisis estadístico se realizó con GraphPad PRISM 6.0.1 (GraphPad Software, San Diego CA, EE. UU).

Se emplearon curvas ROC para establecer los umbrales putativos en los ensayos MILLIPLEX® de antígenos del SARS-CoV-2 para discriminar muestras con reactividad positiva y negativa. Se emplearon 4 muestras con reactividad negativa para antígenos N y S (determinadas como se explicó en el numeral 6.4.2) para establecer los puntos de corte experimentales.

Las diferencias estadísticas de las concentraciones medias de isotipos de anticuerpos entre los grupos de pacientes según las vacunas recibidas se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn empleando el software GraphPad PRISM 6.0.1 (GraphPad Software, San Diego CA, EE. UU).

7. RESULTADOS

7.1. Genomas del SARS-CoV-2 en Colombia mostraron variabilidad genética en algunas regiones blanco para el diagnóstico de COVID-19.

El alineamiento de las primeras 30 secuencias del virus en Colombia con los 39 oligonucleótidos publicados por la OMS, realizado durante la fase de contención de la pandemia, evidenció desapareamientos con al menos una secuencia colombiana (**Tabla 2**). Los sitios conflictivos en las secuencias primer/sonda se debieron a 1) desapareamiento entre el oligonucleótido y las secuencias colombianas y de referencia o 2) desapareamiento entre el oligonucleótido y una o más secuencias colombianas.

Además, la posición del codón del último nucleótido en el extremo 3' de cada oligonucleótido analizado se identificó de acuerdo con el marco de lectura abierto correspondiente. El extremo 3' de 11 oligonucleótidos correspondía a la posición del primer codón, otros 11 cebadores tenían extremos 3' ubicados en la posición del segundo codón y el extremo 3' de 4 oligonucleótidos alineados con la posición del tercer codón (**Tabla 1**). Notablemente, el extremo 3' de los oligonucleótidos CDC 2020 (EE. UU.) 2019-nCoV N1-F, CDC 2020 (EE. UU.) 2019-nCoV N3-F, CDC 2020 (EE. UU.) 2019-nCoV N3-R y Hong Kong (2020) HKU-NR se alinearon con la posición del tercer codón de sus ORF correspondientes. Dos de estos cebadores fueron los cebadores sentido y antisentido propuestos para amplificar un blanco específico (CDC 2020 (EE. UU.) 2019-nCoV N3) en el gen N, lo que hace que este protocolo sea muy susceptible a resultados falsos negativos a medida que aumenta la variabilidad genética viral. Los resultados detallados de este análisis fueron publicados en la revista *Infection, Genetics and Evolution* de la editorial Elsevier [73].

Tabla 2. Regiones blanco y conflictos de diseño de los cebadores y sondas analizados según la diversidad genética de las cepas colombianas de SARS-CoV-2.

Gen Blanco	Primer/Sonda ¹	Coordenadas genómicas ²	Posición del codon al extremo 3'	Genomas con desapareamientos
ORF1ab	Pasteur 2020(France)nCoV IP2-12669Fw	12690-12707	1	Ninguno
	Pasteur 2020(France)nCoV IP2-12696bProbe	12717-12737	NA	Ninguno
	Pasteur 2020(France)nCoV IP2-12759Rv	12797-12780	2	Ninguno
	Zhu 2020 CDC-China Set I(ORF1ab) fw	13342-13362	2	Ninguno
	Zhu 2020 CDC-Set I Probe(ORF1ab)	13377-13404	NA	hCoV/Colombia/Antioquia/79253/2020
	Zhu 2020 CDC-China Set I(ORF1ab) Rv	13460-13442	1	Ninguno
	Corman Berlin(2020) RdRP SARSr-F2	15431-15452	2	hCoV/Colombia/Valle del Cauca/79943/2020
	Corman Berlin(2020) RdRP SARSr-P2	14470-15494	NA	Ninguno
	Corman Berlin(2020) RdRP SARSr-R1	15530-15505	1	Todos los 30 genomas colombianos
	Hong Kong(2020) HKU-ORF1b-nsp14F	18778-18797	2	Ninguno
Hong Kong(2020) HKU-ORF1b-nsp141P	18849-18872	NA	Ninguno	
Hong Kong(2020) HKU-ORF1b-nsp14R	18909-18889	1	Ninguno	
Gen E	Corman Berlin(2020) E Sarbeco F1	26269-26294	2	Ninguno
	Corman Berlin(2020) E Sarbeco P1	26362-26357	NA	Ninguno
	Corman Berlin(2020) E Sarbeco R1	26381-26360	2	Ninguno
Gen N	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N1-F	28287-28306	3	Ninguno
	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N1-P	28309-28332	NA	Ninguno
	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N1-R	28356-28335	2	Ninguno
	DMC-MH 2020(Thailand)WH-NIC N-F	28320-28338	2	Ninguno
	DMC-MH 2020(Thailand)WH-NIC N-P	28341-28356	NA	Ninguno
	DMC-MH 2020(Thailand)WH-NIC N-R	28376-28358	1	Ninguno
	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N3-F	28681-28702	3	Ninguno
	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N3-P	28704-28727	NA	Ninguno
	CDC 2020(USA) 2019-nCoV N3-R	28752-28732	3	Ninguno
	Corman Berlin(2020) N Sarbeco F1	28706-28724	1	Ninguno
	Corman Berlin(2020) N Sarbeco P1	28753-28777	NA	Ninguno
	Corman Berlin(2020) N Sarbeco R1	28833-28814	1	Ninguno
	Zhu 2020 CDC-China Set II Fw(N)	28881-28902	2	hCoV/Colombia/Bogota/78390/2020 hCoV/Colombia/Valle del Cauca/81279/2020 hCoV/Colombia/Valle del Cauca/81251/2020 hCov/Colombia/Quindio/79911/2020 hCoV/Colombia/Quindio/80663/2020
	Zhu 2020 CDC-China Set II Probe(N)	28934-28953	NA	Ninguno
	Zhu 2020 CDC-China Set II Rv(N)	28979-28958	1	Ninguno
Nao 2020(Japan)NIID 2019-nCoV N F2	29125-29144	1	Ninguno	
Nao 2020(Japan)NIID 2019-nCoV N P2	29222-29241	NA	Ninguno	
Nao 2020(Japan)NIID 2019-nCoV N R2	29299-29280	2	Ninguno	
Hong Kong(2020) HKU-NF	29145-29166	2	Ninguno	
Hong Kong(2020) HKU-NP	29179-29198	NA	Genoma referencia y los 30 genomas	
Hong Kong(2020) HKU-NR	29254-29236	3	Ninguno	
CDC 2020(USA) 2019-nCoV N2-F	29164-29183	1	Ninguno	
CDC 2020(USA) 2019-nCoV N2-P	29188-29210	NA	Todos los 30 genomas colombianos	
CDC 2020(USA) 2019-nCoV N2-R	29230-29213	1	Ninguno	

¹Los nombres se asignaron tal como se publicaron en línea en el sitio web de la OMS.² Coordenadas estimadas a partir del alineamiento a la secuencia de referencia NC_04512.2

7.2. Variantes que dominan picos epidémicos tienen alto impacto en la morbimortalidad por COVID-19 a pesar de su clasificación VOC o VOI

El análisis de 535 casos de SARS-CoV-2 procedentes de 27 departamentos colombianos sugirió que los hombres tienden a desarrollar COVID-19 más grave, y los resultados graves o fatales fueron típicamente para pacientes mayores de

60 años con comorbilidades que incluyen EPOC, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, obesidad, asma y antecedentes de tabaquismo. Además, aunque se identificaron 39 linajes de SARS-CoV-2 entre los 535 casos, solo 9 linajes representaron el 88,5% de los casos (**Tabla 3**), donde las variantes Mu y Gamma se asociaron con el 69% y el 18% de los casos fatales, respectivamente. El diagrama de MDU agrupó a los fallecidos y las variables estrechamente asociadas, incluido el grupo de edad “>60 años”, seguido de antecedentes de tabaquismo y diabetes, EPOC, asma, cáncer, enfermedades cardíacas y renales. Los linajes B.1.621 (Mu) y P1 (Gamma), también se incluyeron en este grupo, seguidos por C37 (**Figura 1**).

Además, los resultados sintomáticos y graves se agruparon con el grupo de edad “41-60 años”, hipertensión y síntomas comunes de COVID-19. Las variables sexo masculino y obesidad se graficaron juntas a distancias aproximadamente iguales del eje fallecido-grave-sintomático. Finalmente, el resultado asintomático se agrupó con los grupos de edad más jóvenes (0-20 y 21-40 años), los linajes SARS-CoV-2 B.1.420, B.1.1.348, B.1.111, B.1.1. 7, y sexo femenino. Los resultados de este estudio fueron publicados en la revista *International Journal of Infectious Diseases* de la editorial Elsevier [74].

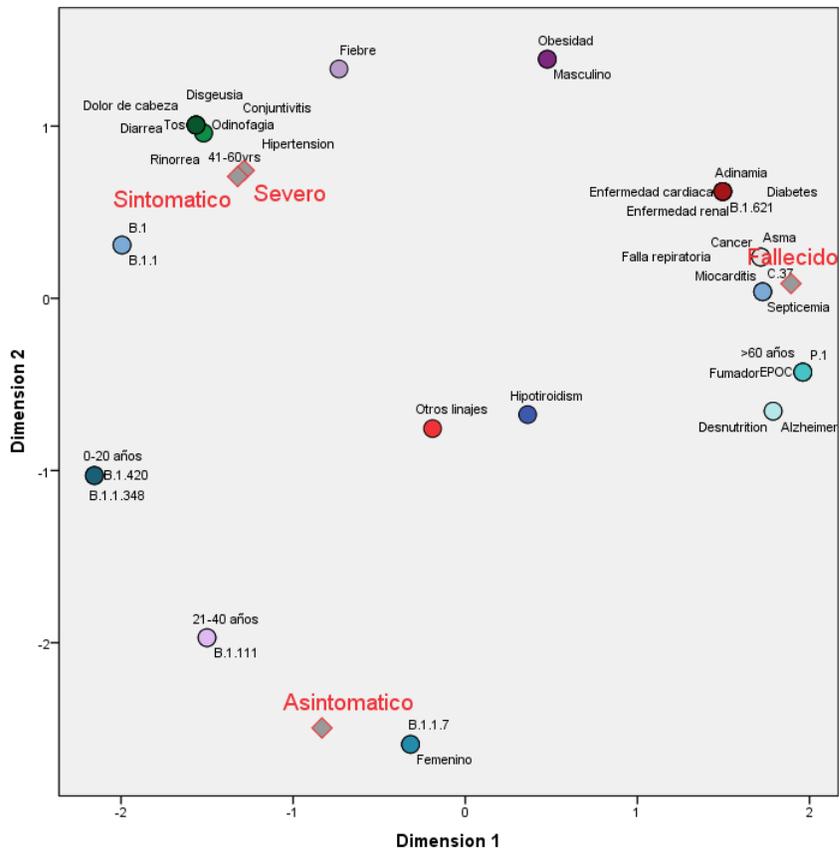


Figura 1 Gráfico de despliegamiento multidimensional para desenlaces y condiciones de salud de COVID-19 y linajes de SARS-CoV-2. Las variables más cercanas entre sí sugieren una mayor asociación. Los diamantes grises delineados en rojo representan resultados clínicos (asintomáticos, sintomáticos, graves y fallecidos), los círculos representan linajes de SARS-CoV-2, síntomas, sexo, grupos de edad y comorbilidades.

Tabla 3 Resumen de datos de pacientes con COVID-19

Characteristics	Desenlace fatal	
	No	Si
Edad, años, n (%)		
0 - 20	31 (10,2)	1 (0,4)
21-40	102 (33,7)	8 (3,4)
41-60	97 (32,0)	19 (8,2)
>61	73 (24,1)	204 (87,9)
Sexo		
Femenino	138 (45,5)	95 (40,9)
Masculino	165 (54,5)	137 (59,1)
Linaje, n (%)		
B.1	61 (20,1)	4 (1,7)
B.1.1	16 (5,3)	0 (0,0)
B.1.1.348	39 (12,9)	1 (0,4)
B.1.1.7	9 (3,0)	2 (0,9)
B.1.111	60 (19,8)	1 (0,4)
B.1.420	31 (10,2)	0 (0,0)
B.1.621	14 (4,6)	160 (69,0)
C.37	0 (0,0)	9 (3,9)
P.1	25 (8,3)	41 (17,7)
Otros linajes	48 (15,8)	14 (6,0)
Síntomas clínicos, n (%)		
Tos	159 (52,5)	147 (63,4)
Fiebre	125 (41,3)	92 (39,7)
Odinofagia	125 (41,3)	92 (39,7)
Adinamia	97 (32,0)	37 (15,9)
Miocarditis	0 (0,0)	1 (0,4)
Septicemia	0 (0,0)	6 (2,6)
Falla respiratoria	2 (0,7)	21 (9,1)
Rinorrea	39 (12,9)	28 (12,1)
Conjuntivitis	5 (1,7)	5 (2,2)
Dolor de Cabeza	92 (30,4)	54 (23,3)
Diarrea	26 (8,6)	22 (9,5)
Disgeusia	30 (11,4)	1 (9,1)
Comorbilidades, n (%)		
Asma	1 (0,3)	6 (2,6)
EPOC	7 (2,3)	39 (16,8)
Diabetes	19 (6,3)	48 (20,7)
Enfermedad cardiaca	9 (3,0)	31 (13,4)
Cancer	1 (0,3)	10 (4,3)
Obesidad	11 (3,6)	20 (8,6)
Enfermedad renal	7 (2,3)	24 (10,3)
Fumador	4 (1,3)	17 (7,3)
Hipertension	33 (10,9)	6 (2,6)
Tuberculosis	0 (0,0)	0 (0,0)
VIH	0 (0,0)	1 (0,4)
Hipotiroidismo	1 (0,3)	8 (3,8)
Alzheimer	1 (0,3)	6 (2,8)

7.3. Aislamiento y titulación exitosa de linajes del SARS-CoV-2 en células Vero E6.

Los ensayos de aislamiento del virus resultaron exitosos en más del 50% de las muestras de hisopado nasofaríngeo y en todos los casos de aislamiento positivo se observó inducción de EC caracterizado por redondeamiento y desprendimiento celular desde el primer pase entre el día 3 y 5 post inoculación (**Figura 2**). Estos ensayos permitieron obtener 9 lotes de aislamientos del SARS-CoV-2 con títulos entre $1,3 \times 10^5$ y $2,6 \times 10^6$ TCID₅₀/mL cuyos linajes coincidieron con los identificados previamente en la muestra de hisopado nasofaríngeo y correspondieron a un linaje A y siete linajes B (**Tabla 4**). Cabe resaltar que la circulación de estos linajes en Colombia, se reportó en el marco de la vigilancia genómica liderada por nuestro grupo de investigación entre marzo del 2020 a enero del 2022 [3].

El aislamiento de la muestra EPI_ISL_498169 clasificado en el linaje A.1, presentó sólo 2 mutaciones en las proteínas NS8 y NSP1 con respecto al genoma referencia de Wuhan y fue el único aislamiento incluido en este estudio que no presenta la mutación característica D614G en la proteína S. El aislamiento de la muestra EPI_ISL_526969 clasificado en el linaje B.1.420 presentó la mutación D614G en la proteína S característica de los linajes B.1 además de un patrón de mutaciones en otras proteínas que incluyeron, N A119T, NSP12 A43S, NSP12 P323L. Los dos aislamientos de las muestras EPI_ISL_526971 (B.1.111 [I]) y EPI_ISL_794659 (B.1.111 [II]), aunque compartieron el patrón de mutación característico del linaje B.1.111 (Spike D614G, NS3 Q57H y NSP12 P323L), también presentaron varias mutaciones divergentes entre las que se destacan la presencia de dos mutaciones adicionales en la proteína S (T859I y W152R) en el aislamiento EPI_ISL_794659.

Cabe destacar que el aislado de la muestra EPI_ISL_1092007 actualmente asignado al linaje B.1 (Pango v.4.1.3 PLEARN-v1.17) fue uno de los primeros linajes con la mutación E484K en la proteína S detectados en el país entre diciembre 26 del 2020 y enero 14 del 2021. Para esa fecha, múltiples estudios sugirieron que la mutación E484K estaba asociada al escape de anticuerpos neutralizantes de individuos con historial de infección por SARS-CoV-2 (pacientes convalecientes),

por lo cual nuestro grupo propuso la reasignación de linaje y evaluación de anticuerpos neutralizantes en sueros de pacientes convalecientes [20]. Los 4 aislamientos restantes correspondieron a linajes designados como VOI o VOC por la OMS, entre los cuales, el aislamiento de la muestra EPI_ISL_1821065 clasificado en el linaje B.1.621 fue detectado en enero de 2021 y propuesto como variante de interés (VOI) por nuestro grupo de investigación [19], lo que repercutió en su designación como variante Mu por la OMS en agosto 30 del 2021 [5]. El aislamiento de la muestra EPI_ISL_2500971, clasificado en el linaje P.1, fue importado a Colombia desde la frontera amazónica con Brasil a finales de enero del 2021 aunque fue detectado por primera vez en la región amazónica del Brasil en noviembre del 2020 y designado como la VOC gamma en enero del 2021 [75]. Esta variante llamó la atención de las autoridades de salud pública brasileñas por poseer un perfil único de 10 mutaciones en la proteína S que definieron el linaje (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, and T1027I), incluida la triada E484K, K417T y N501Y asociada con una mayor unión al receptor humano ACE2 [76].

El aislamiento de la muestra EPI_ISL_7314401 fue clasificado en el linaje B.1.617.2, detectado originalmente en el estado de Maharashtra en la India en octubre del 2020 [75,77] y designado como la VOC Delta en mayo del 2021 [75]. Entre las 8 mutaciones presentes en la proteína S características de este linaje [78], diferentes estudios sugieren que un conjunto único de mutaciones (T478K, P681R y L452R) lo hacen excepcionalmente infeccioso y poco susceptible a los anticuerpos neutralizantes de personas previamente infectadas o vacunadas [79]. No obstante, esta variante se dispersó por todo el mundo y se diversificó en más de 200 sublinajes [80], de los cuales casi 100 fueron detectados en Colombia, aunque cinco de ellos (AY.20, AY.25, AY.26, AY.3, AY.5) con mayor frecuencia [54]. El sublinaje dominante, en el país fue AY.25 por lo cual, en este estudio se buscó obtener un aislamiento perteneciente a este sublinaje.

Finalmente, el aislamiento de la muestra EPI_ISL_9433093 fue clasificado en el linaje B.1.1.529 designado como la variante Ómicron el 26 de noviembre del 2021

[5]. El origen de esta variante, inicialmente considerado africano, actualmente no es claro, ya que aparentemente los primeros casos reportados en África eran viajeros internacionales y una semana antes del anuncio de África se supo que los Países Bajos tenían un paciente positivo de la variante Ómicron [81]. Entre todas las VOC reportadas hasta finales diciembre del 2022, Ómicron es la única variante que circula en el mundo [5], además, la VOC con mayor acumulación de mutaciones, en todo el genoma, incluida la proteína S en la cual, las primeras secuencias reportadas presentaron al menos 20 mutaciones [82] que le confieren mayor transmisibilidad y resistencia parcial a la inmunidad inducida por las vacunas COVID-19 [81]. Para finales de diciembre del 2022 esta variante se diversificó en más de 300 sublinajes y se ha dispersado por 202 países incluido Colombia [80] donde dominó el cuarto pico epidémico a finales de enero del 2022 con la presencia más de 50 sublinajes, entre los cuales, BA.1 fue el más representativo [3] y corresponde al aislamiento obtenido en este estudio. El sublinaje BA.1 se caracteriza por un perfil de 32 mutaciones en la proteína S, incluidas al menos tres deleciones (DEL69/70, DEL143/145 y DEL212) y cinco mutaciones de interés (K417N, S477N, E484A, N501Y y P681H). Curiosamente, la mutación E484K, que se ha considerado un determinante importante del escape de los nAb provocados por la vacuna, está ausente en la variante Delta, mientras que la forma alternativa E484A está presente en el aislamiento de Ómicron incluido en este estudio.

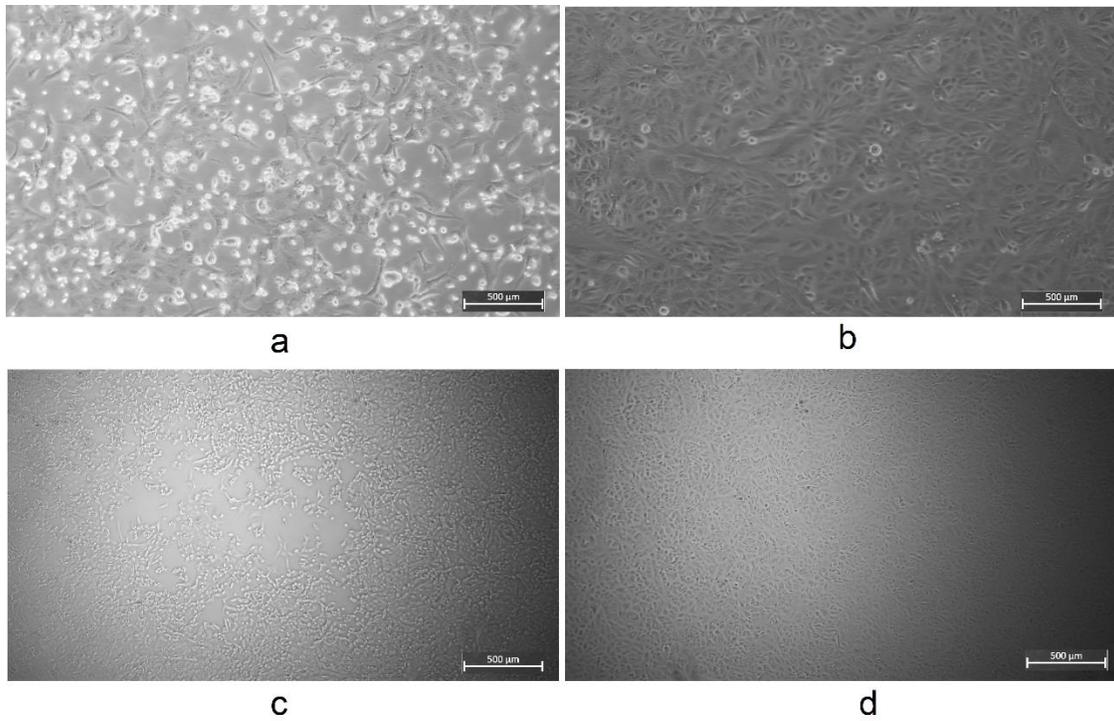


Figura 2. a) y c) Imágenes representativas del efecto citopático en células Vero E6 causado por el SARS-CoV-2 en el día 3 post inoculación con una muestra de hisopado nasofaríngeo con diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por RT-PCR (protocolo de Berlín) con un valor C_T para el gen RdRp inferior a 25. b) y d) Control celular negativo de infección (Mock). Las imágenes a y b fueron tomadas en magnificación 10X, mientras que c y d en magnificación 4x en un microscopio invertido (Carl Zeiss™, Primovert) con cámara digital de 8 megapíxeles (ZEISS Axiocam 208 Color)

Tabla 4. Banco de aislamientos virales del SARS-CoV-2

Linaje Pango* (designación OMS)	GISAID ID (muestra cruda)	GISAID ID (aislado del SARS- CoV-2)	Sustituciones aminoacídicas	Título (TCID50 /mL)
A.1	EPI_ISL_498169	EPI_ISL_16314505	NS8 L84S, NSP1 G105S	3,91 x10 ⁵
B.1.420	EPI_ISL_526969	EPI_ISL_16314501	Spike D614G; N A119T, NSP12 A43S, NSP12 P323L	3,0 x10 ⁵
B.1.111 [I]	EPI_ISL_526971	EPI_ISL_16314507	Spike D614G; N M234I, NS3 Q57H, NSP3 S1285F, NSP12 P323L	4,67 x10 ⁵
B.1.111 [II]	EPI_ISL_794659	EPI_ISL_16314506	Spike D614G, Spike T859I, Spike W152R; N T205I, NS3 Q57H, NS3 T223I, NSP1 I114T, NSP5 K90R, NSP6 A136V, NSP12 P323L	3,2 x10 ⁵
B.1 (B1+L249S+E484K)	EPI_ISL_1092007	EPI_ISL_16314499	Spike D614G, Spike E484K, Spike L249S; N T205I, NS3 Q57H, NS6 I18V, NS7a L17F, NS7b A15S, NSP5 V157L, NSP12 P323L, NSP13 L325F, NSP13 T153I, NSP15 V314F, NSP16 G213N	4,53x10 ⁵
P.1 (Gamma)	EPI_ISL_2500971	EPI_ISL_16314500	Spike D138Y, Spike D614G, Spike E484K, Spike H655Y, Spike K417T, Spike L18F, Spike N501Y, Spike P26S, Spike R190S, Spike T20N, Spike T1027I, Spike V1176F; N D415G, N G204R, N P80R, N R203K, NS3 S253P, NS8 E92K, NSP1 P80L, NSP3 K977Q, NSP3 S370L, NSP3 T1303I, NSP3 V1253F, NSP6 F108del, NSP6 G107del, NSP6 S106del, NSP13 E341D	2,6 x10 ⁶
B.1.621 (Mu)	EPI_ISL_1821065	EPI_ISL_16314504	Spike D614G, Spike D950N, Spike E484K, Spike ins145N, Spike N501Y, Spike P681H, Spike R346K, Spike T95I, Spike Y144T, Spike Y145S; N T205I, NS3 Q57H, NS3 V256I, NS8 P38S, NS8 Q72R, NS8 S67F, NS8 T11K, NSP3 A562T, NSP3 T237A, NSP3 T720I, NSP4 T492I, NSP6 Q160R, NSP12 P323L, NSP13 P419S	2,57x10 ⁶
AY.25.1 (Delta)	EPI_ISL_7314401	EPI_ISL_16314502	Spike D614G, Spike D950N, Spike L452R, Spike P681R, Spike T19R, Spike T478K, Spike V1065L; M I82T, N D63G, N D377Y, N G215C, N R203M, NS3 E239Q, NS3 S26L, NS7a T120I, NS7a V82A, NS7b T40I, NSP3 A488S, NSP3 D410G, NSP3 P1228L, NSP3 P1469S, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 C197F, NSP6 T77A, NSP12 G671S, NSP12 P323L, NSP13 P77L, NSP13 P172S, NSP14 A394V	3,5 x10 ⁵
BA.1 (Omicron)	EPI_ISL_9433093	EPI_ISL_16314503	Spike A67V, Spike D614G, Spike D796Y, Spike E484A, Spike G142D, Spike G446S, Spike G496S, Spike H69del, Spike H655Y, Spike L981F, Spike N440K, Spike N501Y, Spike N679K, Spike N764K, Spike N856K, Spike N969K, Spike P681H, Spike Q493R, Spike Q498R, Spike Q954H, Spike S477N, Spike T95I, Spike T478K, Spike T547K, Spike V70del, Spike V143del, Spike Y144del, Spike Y145del, Spike Y505H, E T9I, M A63T, M D3V, M Q19E, N E31del, N G204R, N P13L, N R32del, N R203K, N S33del, NSP3 A1892T, NSP3 K38R, NSP3 L1266I, NSP3 S1265del, NSP4 T492I, NSP5 P132H, NSP6 G107del, NSP6 I189V, NSP6 L105del, NSP6 S106del, NSP12 P323L, NSP14 I42V	1,3 x10 ⁵

*Pango v.3.1.20 2022-02-02

7.2 Los títulos de nAbs en sueros de convalecientes son menores contra B.1+L249S+E484K relativo a variantes sin la mutación E484K

Los resultados de tres ensayos independientes evidenciaron que los sueros de individuos convalecientes del COVID-19 neutralizan diferentes aislamientos del SARS-CoV-2 (**Figura 3a**). Los títulos neutralizantes contra los aislamientos de los linajes B.1+L249S+E484K fueron 1,5, 1,9, 2,1 y 1,3 veces menores que frente a A.1, B.1.420, B.1.111-I y B.1.111-II, respectivamente (**Figura 3b**). Además, los títulos neutralizantes para la variante B.1.111-II fueron 1,6 veces menores en relación con la variante B.1.111.I ($P < 0,0001$) (**Figura 3B**). Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos neutralizantes entre los linajes A1 y B sin la mutación E484K (**Figura 3B**). Estos resultados fueron publicados en la revista *Virus Research* de la editorial Elsevier [83].

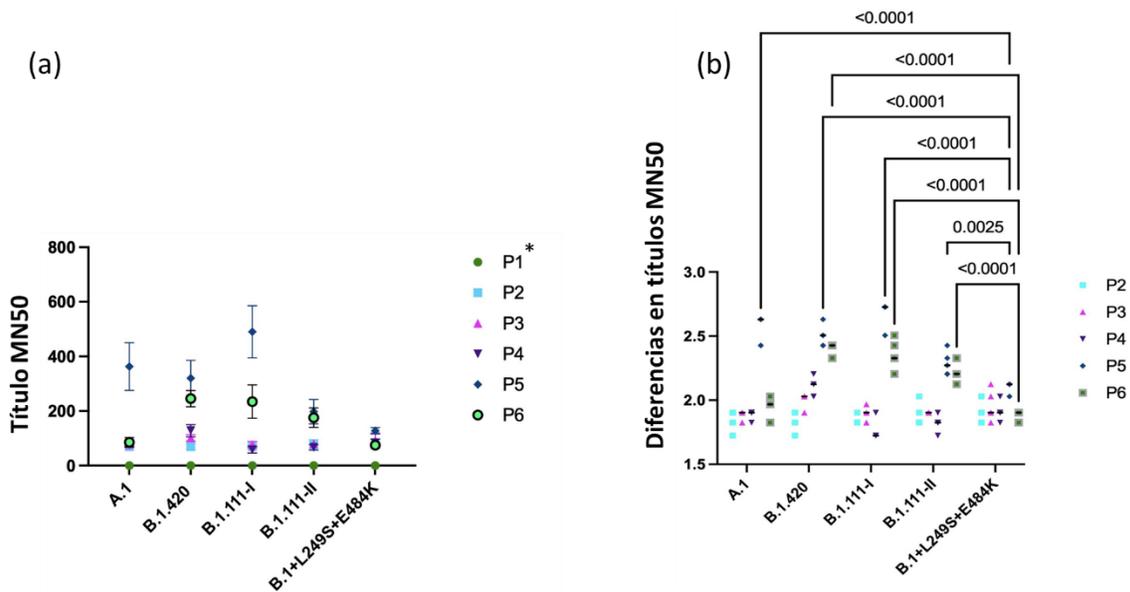


Figura 3. Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en individuos convalecientes no vacunados contra el SARS-CoV-2. a) Títulos neutralizantes de sueros convalecientes contra los linajes SARS-CoV-2 A.1, B.1.420, B.1.111 y B.1+L249S+E484K. b) Diferencias entre los títulos de anticuerpos neutralizantes relativo a B.1+L249S+E484K. *suero negativo histórico.

7.3 Los títulos de anticuerpos IgG anti-S inducidos por las vacunas contra el SARS-CoV-2 se correlacionan con los títulos de anticuerpos neutralizantes

No se observaron diferencias significativas entre los títulos de IgG anti-S de unión provocados por Ad26.COVS2, ChAdOx1 y CoronaVac. Sin embargo, los títulos inducidos por BNT162b2 fueron significativamente más altos que los de las otras tres vacunas (**Figura 4**). Notablemente, 14 de los 31 individuos vacunados con BNT162b2 tenían títulos de anticuerpos por encima de la linealidad del método (>2180 BAU/mL). Por lo tanto, debido a que se asignó un valor arbitrario de 3270 BAU/mL a esas muestras, es probable que se hayan subestimado los títulos de anticuerpos IgG anti-S. Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COVS2 contra B.1.111, Mu y P.1 se correlacionaron con los títulos de anticuerpos IgG anti-S. Sin embargo, los nAb provocados por BNT162b2 y Ad26.COVS2 contra la variante de Ómicron no mostraron correlación con los títulos de anticuerpos IgG anti-S. Tampoco se observó correlación entre anticuerpos IgG anti-S y nAbs inducidos por BNT162b2 contra la variante Delta (**Tabla 5**).

Tabla 5. Comparación de los títulos de anticuerpos IgG anti-S y neutralizantes en individuos con esquemas primarios de vacunas contra el SARS-CoV-2.

Vacuna	MGTA (BAU/mL)/(95% CI)	Comparaciones	Spearman r*	Valor p
BNT16b2	1353 (959,9 – 1907)	MN50 B.1.111	0,674	< 0,0001
		MN50 Gamma (P.1)	0,533	0,002
		MN50 Mu (B.1.621)	0,511	< 0,003
		MN50 Delta (AY.25)	0,258	0,161
		MN50 Omicron (BA.1)	-0,089	0,6302
CoronaVac	111,3 (76,31 – 162,4)	MN50 B.1.111	0,709	< 0,0001
		MN50 Gamma (P.1)	0,453	0,0118
		MN50 Mu (B.1.621)	0,627	< 0,0002
		MN50 Delta (AY.25)	0,58	0,0008
		MN50 Omicron (BA.1)	0,478	0,0075
ChAd0x1-s	198 (113,8 – 345)	MN50 B.1.111	0,656	< 0,0001
		MN50 Gamma (P.1)	0,773	< 0,0001
		MN50 Mu (B.1.621)	0,723	< 0,0001
		MN50 Delta (AY.25)	0,8	< 0,0001
		MN50 Omicron (BA.1)	0,575	0,0013
Ad26.COVS2	78.36 (53,2 – 115,4)	MN50 B.1.111	0,625	0,0008
		MN50 Gamma (P.1)	0,725	< 0,0001
		MN50 Mu (B.1.621)	0,597	0,0016
		MN50 Delta (AY.25)	0,779	< 0,0001
		MN50 Omicron (BA.1)	0,389	0,054

MGTA: media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG anti-S del SARS-CoV-2. MN50: título medio de neutralización. *Dos colas

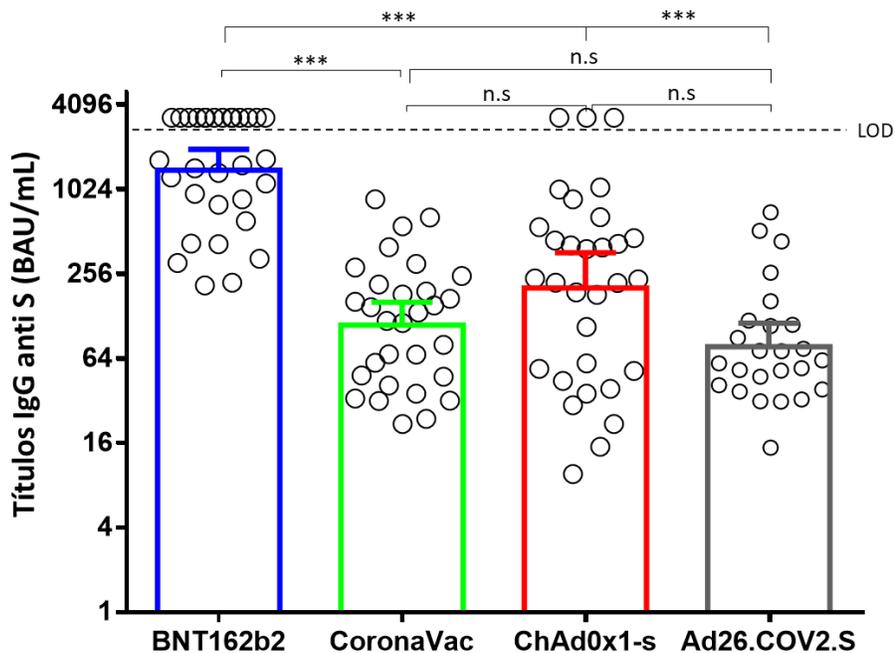
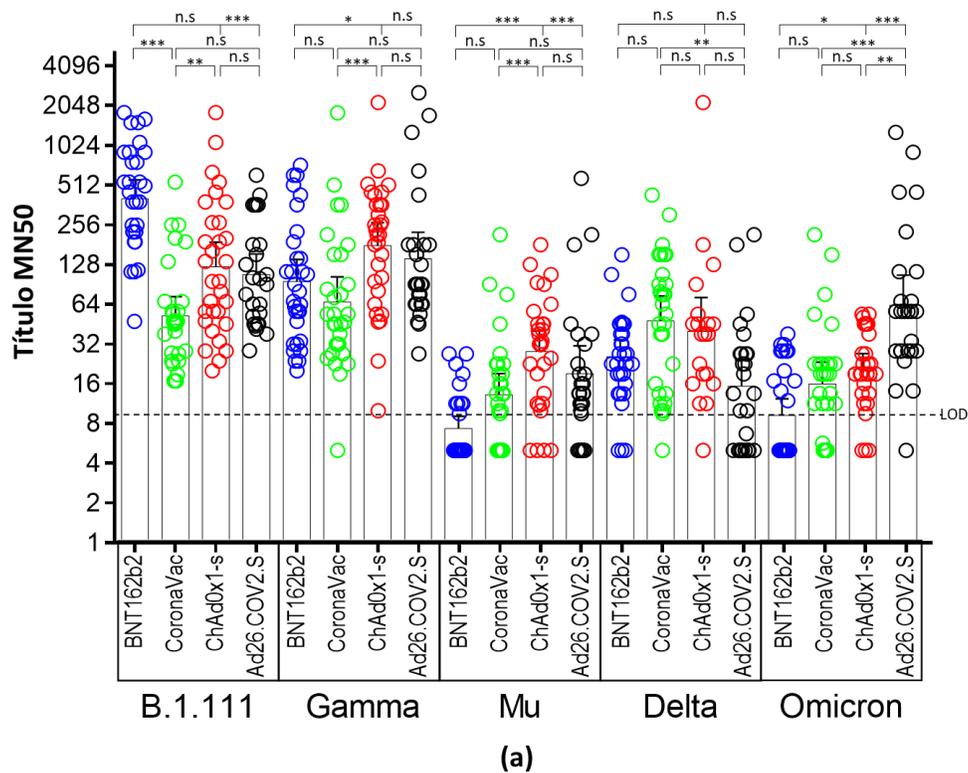


Figura 4. Comparación de las medias geométricas de los títulos de anticuerpos IgG anti-S. BAU: unidades de anticuerpo de unión. ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: Límite de detección

7.4 Respuestas reducidas de nAbs contra variantes emergentes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COVS.2.S

Los ensayos de microneutralización con sueros de individuos vacunados con BNT162b2, ChAdOx1 y Ad26.COVS.2.S revelaron una reducción general de las GMTs contra B.1.621 (Mu), AY.25.1 (Delta) y BA.1 (Ómicron), en relación con B.1.111 y P.1 (Gamma) (**Figura 5a**). Por el contrario, las GMTs para CoronaVac fueron significativamente más bajas para Mu y Ómicron únicamente (**Figura 5b**). Por lo tanto, mientras que las GMTs calculadas para las cuatro vacunas contra B.1.111 y Gamma oscilaron entre 51,7 y 401,3 y 65 y 139 respectivamente, para Mu, Delta y Ómicron oscilaron entre 7,2 y 27, 15,8 y 47 y 15,6 y 62, respectivamente (**Tabla 6**). Estas reducciones fueron notables contra Mu y Ómicron en individuos vacunados con BNT162b2 y CoronaVac, seguidas por las respuestas de nAbs contra Delta en individuos vacunados con ChAd0x1-s y Ad26.COVS.2.S, ya que las

GMTs y las tasas de seropositividad para estas dos variantes fueron las más bajas entre todas las vacunas y variantes probadas (**Tabla 6**). Los títulos de anticuerpos neutralizantes de todas las vacunas evaluadas se distribuyeron uniformemente contra AY.25.1 (Delta) debido a que solo se observaron ligeras diferencias significativas en los GMT entre CoronaVac y Ad26.COV2.S (**Figura 4a**). Además, la respuesta de nAb más alta fue inducida por BNT162b2 contra B.1.111 (**Figura 5b**), seguida de ChAdOx1 y Ad26.COV2.S contra Gamma (**Figura 5b**). Finalmente, la vacuna ChAdOx1 mostró el mejor desempeño contra Mu, ya que la GMT y la tasa de seropositividad contra esta variante fueron más altas en contraste con las otras vacunas (**Figuras 5a y 5b**). Estos resultados fueron publicados en dos artículos, en la revista *Vaccines* de la editorial MDPI [84,85].



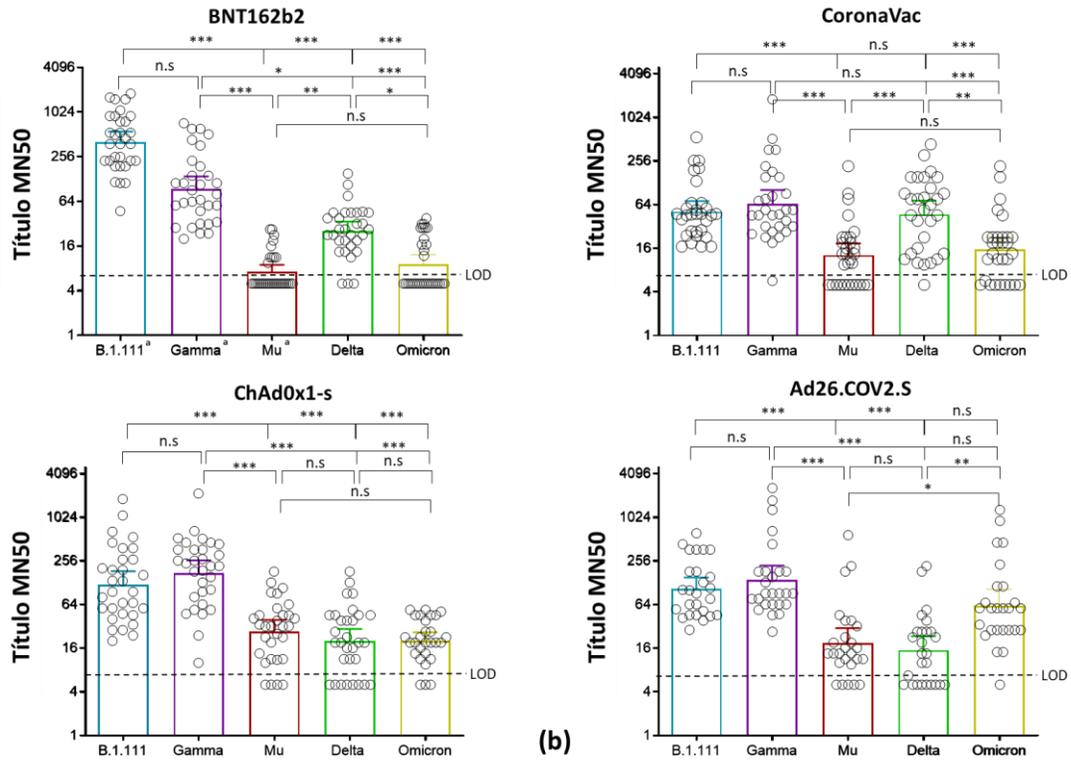


Figura 5. Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en individuos con esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 y Ad26.COV2.S por variantes de SARS-CoV-2. **(a)** Comparación de GMT entre vacunas contra cada variante del SARS-CoV-2. **(b)** Comparación de GMT entre variantes de SARS-CoV-2 para cada vacuna. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección (< 10).

Tabla 6. Resumen de las respuestas de anticuerpos contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios de vacunación contra el SARS-CoV-2

	Vacuna	B.1.111 (virus ancestral)	P.1 (Gamma)	B.1.621 (Mu)	B.1.617.2 (Delta AY.25)	B.1.1.529 (Ómicron BA.1)
Tasa de seropositividad* % (no. positivo/total)	BNT162b2	100% (31/31)	100% (31/31)	32,2% (10/31)	90,3% (28/31)	41,2% (13/31)
	CoronaVac	100% (30/30)	100% (30/30)	63,3% (19/30)	96,6% (29/30)	73,3% (22/30)
	ChAd0x1-s	100% (31/31)	100% (31/31)	87% (27/31)	74,2% (23/31)	89,3% (25/28)
	Ad26.COVS.2.S	100% (26/26)	100% (26/26)	80,7% (21/26)	65,4% (17/26)	96,2% (25/26)
GMT (95% CI)		401,3 (288,0 – 559,2)	94,02 (63,61 – 139)	7,2 (5,8 – 8,9)	25,3 (19 – 34)	9 (18,9 – 33,9)
	BNT162b2					
	CoronaVac	51,7 (42,6 – 124,5)	65,7 (42,2 – 102,1)	12,9 (8,9 – 18,7)	47,1 (30,4 – 72,9)	15,6 (10,7 – 22,9)
	ChAd0x1-s	121,6 (79,2 – 186,8)	176,7 (118 – 264,6)	27,6 (19,2 – 39,5)	39,2 (21,6 – 71,4)	20,3 (15,4 – 26,7)
	Ad26.COVS.2.S	106,1 (73,9 – 152,2)	139,8 (87,4 – 223,6)	18,8 (11,6 – 30,5)	15,8 (9,6 – 23,6)	62,1 (36,7 – 101,1)
Disminución de GMT relativo a B.1.111	BNT162b2	-	4,26	55,71	15,8	15,8
	CoronaVac	-	0,78	4	1,1	3,3
	ChAd0x1-s	-	0,91	4,4	3,1	5,9
	Ad26.COVS.2.S	-	0,75	5,6	6,7	1,7

*Título MN50 ≥10

7.5 Las respuestas de nAbs contra las variantes Mu y Ómicron incrementan dependiendo del esquema primario y la dosis refuerzo

Los ensayos de neutralización con sueros de individuos que fueron inmunizados con una dosis de refuerzo revelaron diferentes aumentos en los títulos de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Mu y Ómicron (**Figura 6**). Los individuos con esquema primario ChAd0x1-s que recibieron una dosis de refuerzo con la misma vacuna ChAd0x1-s, no presentaron aumentos significativos en los títulos de nAbs contra las variantes evaluadas, con respecto a los individuos que sólo recibieron el esquema primario de ChAd0x1-s (**Figura 6a**). No obstante, se observó una reducción de la seropositividad contra Ómicron desde el 89% hasta el 52,6% y un ligero incremento de la seropositividad contra la variante Mu con respecto al grupo con esquema primario de ChAd0x1-s (**Tablas 6 y 7**). En contraste, los individuos con inmunidad heteróloga (por recibir dosis de refuerzo con vacunas diferentes al esquema primario), mostraron incrementos significativos en los títulos de nAbs y la seropositividad contra las variantes Mu y Ómicron comparado con los

individuos con esquemas primarios de BNT162b2 o CoronaVac (**Figura 6b-d y Tablas 6-7**). Notablemente, para el grupo con el esquema CoronaVac+BNT162b2, los títulos de nAbs contra B.1.111 aumentaron 18,14 veces respecto al grupo de individuos con esquema primario de CoronaVac. En menor escala, los títulos de nAbs contra Mu y Ómicron en este grupo también incrementaron significativamente comparado con el grupo de individuos con esquema primario de CoronaVac, para Mu incrementaron significativamente hasta 9 veces, mientras que para Ómicron el aumento fue de 3,38 (**Figura 6b y Tabla 7**). Además, se observó un aumento en la seropositividad desde el 63% al 100% contra Mu, mientras que para Ómicron aumentó desde el 73% al 80% (**Tablas 6 y 7**).

Finalmente, los grupos de individuos con esquema primario de BNT162b2 que recibieron una dosis refuerzo de ChAd0x1-s (**Figura 6c**), o mRNA-1273 (**Figura 6d**), no mostraron incrementos significativos de los títulos neutralizantes contra la variante B.1.111 y la seropositividad se mantuvo en el 100% de los individuos (**Tabla 7**). No obstante, los títulos neutralizantes contra las variantes Mu y Ómicron incrementaron significativamente hasta 20 y 50 veces respectivamente, en los individuos con una dosis refuerzo de ChAd0x1-s, mientras que los individuos con una dosis refuerzo de mRNA-1273 incrementaron significativamente los títulos neutralizantes contra Mu y Ómicron hasta 68,5 y 97 veces, respectivamente (**Tabla 7**).

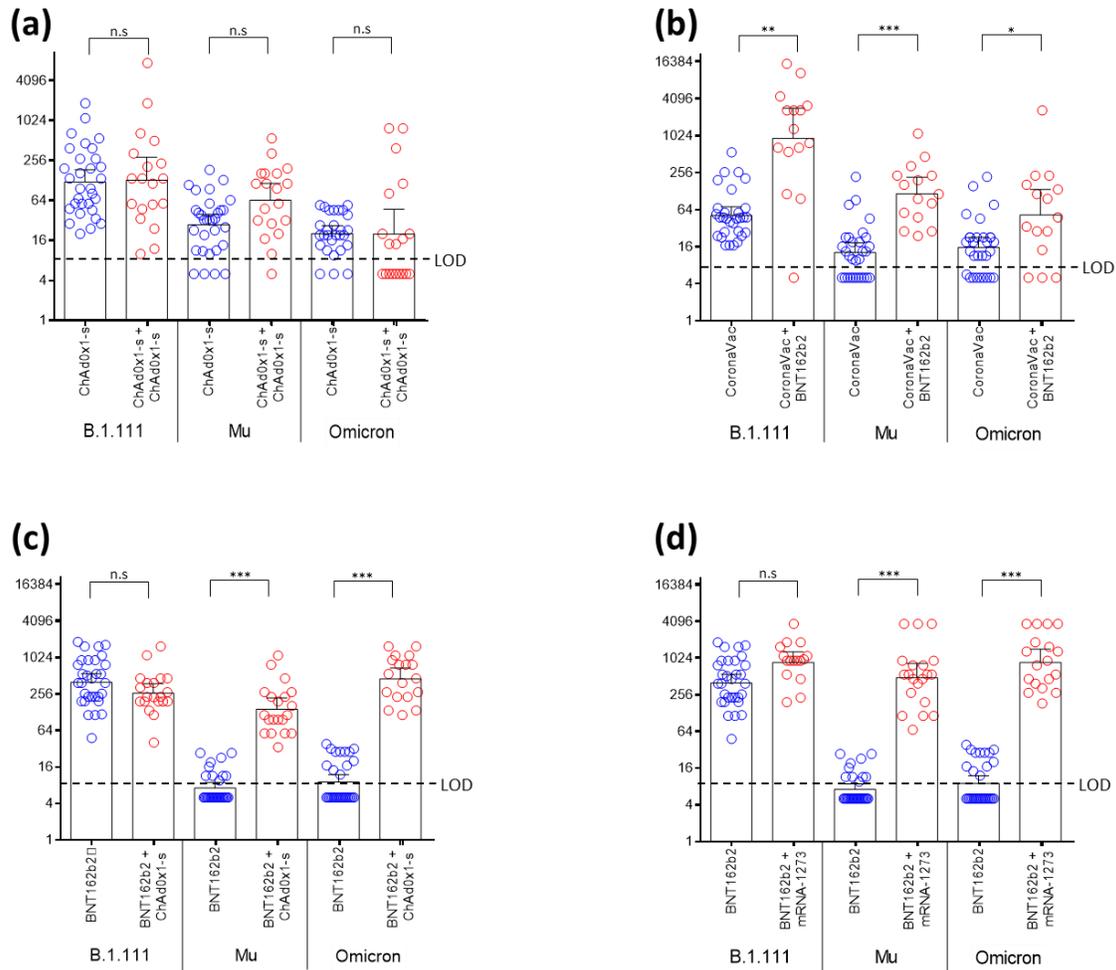


Figura 6 Comparación de respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos con esquemas primarios (dos dosis) vs. individuos con esquema primario más una dosis refuerzo. ChAd0x1-s+ChAd0x1-s, CoronaVac+BNT162b2, BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+mRNA-1273. **(a)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario ChAd0x1-s vs. individuos con esquema ChAd0x1-s + ChAd0x1-s, **(b)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario CoronaVac vs individuos con esquema CoronaVac + BNT162b2, **(c)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario BNT162b2 vs. individuos con esquema BNT162b2 + ChAd0x1-s, **(d)** Comparación de GMTs de individuos con esquema primario BNT162b2 vs individuos con esquema BNT162b2 + mRNA-1273. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo. LOD: límite de detección.

Tabla 7. Resumen de las respuestas de anticuerpos contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos inmunizados con una dosis de refuerzo.

Esquema de vacuna primaria + refuerzo		B.1.111 (virus ancestral)	B.1.621 (Mu)	B.1.1.529 (Ómicron BA.1)
Tasa de seropositividad* % (no. positivo/total)	BNT162b2 + ChAd0x1-s	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)
	BNT162b2 + mRNA-1273	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)
	ChAd0x1-s+ChAd0x1-s	100% (19/19)	94,7% (18/19)	52,6% (10/19)
	CoronaVac + BNT162b2	93,3% (14/15)	100% (15/15)	80% (12/15)
GMT (95% CI)	BNT162b2 + ChAd0x1-s	266,7 (185 - 384, 4)	144,2 (94 - 221)	457,1 (300,2 - 696)
	BNT162b2 + mRNA-1273	879 (591,2 - 1307)	493,4 (288,7 - 843)	876,9 (531 - 1448)
	ChAd0x1-s +ChAd0x1-s	129,2 (58,4 - 286,1)	64,44 (35,79 - 116)	19,98 (8,4 - 47,4)
	CoronaVac + BNT162b2	937,6 (304,4 - 2888)	117,1 (63,5 - 215,9)	52,77 (20,3 - 137,3)
Disminución de GMT relativo a B.1.111	BNT162b2 + ChAd0x1-s	-	1,85	0,58
	BNT162b2 + mRNA-1273	-	1,78	1,00
	ChAd0x1-s +ChAd0x1-s	-	2,00	6,47
	CoronaVac + BNT162b2	-	8,01	17,77
Incremento de GMT relativo a esquema primario	BNT162b2 + ChAd0x1-s	0,66	20,03	50,79
	BNT162b2 + mRNA-1273	2,19	68,53	97,43
	ChAd0x1-s +ChAd0x1-s	1,06	2,33	0,98
	CoronaVac + BNT162b2	18,14	9,08	3,38

*Título MN50 ≥10

7.6 Individuos con esquemas BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+mRNA-1273 presentan mejor desempeño de respuestas de nAbs contra Ómicron

Entre los grupos de individuos que recibieron una dosis refuerzo, se observó que el grupo de vacunados con el esquema no heterólogo ChAd0x1-s+ChAd0x1-s, tendió a presentar los niveles más bajos de nAbs contra B.1.111, Mu y Ómicron, aunque esto no fue significativo en todas las comparaciones (**Figura 7a**). Mientras que las respuestas de nAbs contra Mu fueron comparables entre los grupos ChAd0x1-s+ChAd0x1-s, CoronaVac+BNT162b2 y BNT162b2+ChAd0x1-s, el grupo BNT162b2+mRNA-1273 presentó títulos significativamente más altos contra esta variante (**Figura 7a**). Por otro lado, los dos grupos con esquema primario BNT162b2 que recibieron una dosis refuerzo de ChAd0x1-s o mRNA-1273 presentaron niveles de nAbs comparables contra Ómicron, pero significativamente más altos que los

observados en los grupos ChAd0x1-s+ChAd0x1-s y CoronaVac+BNT162b2 contra esta variante (**Figura 7a**).

Adicionalmente, los grupos de individuos con esquemas ChAd0x1-s+ChAd0x1-s, BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+mRNA-1273 presentaron respuestas de nAbs contra Mu en niveles comparables a los observados contra el linaje control B.1.111 (**Figura 7b**), con excepción del grupo CoronaVac+BNT162b2, en el cual se observaron niveles de nAbs significativamente más altos contra B.1.111 comparado con Mu y Ómicron (**Figura 7b**).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de nAbs contra B.111, Mu y Ómicron en el grupo BNT162b2+mRNA-1273. Este grupo de individuos, seguido por el grupo con el esquema BNT162b2+ ChAd0x1-s, presentó los títulos más altos de nAbs contra Ómicron en niveles comparables a los observados contra el linaje control B.1.111. En contraste los grupos ChAd0x1-s+ChAd0x1-s y CoronaVac+BNT162b2 presentaron niveles significativamente más bajos de nAbs contra Ómicron comparado con B.1.111 (**Figura 7b**).

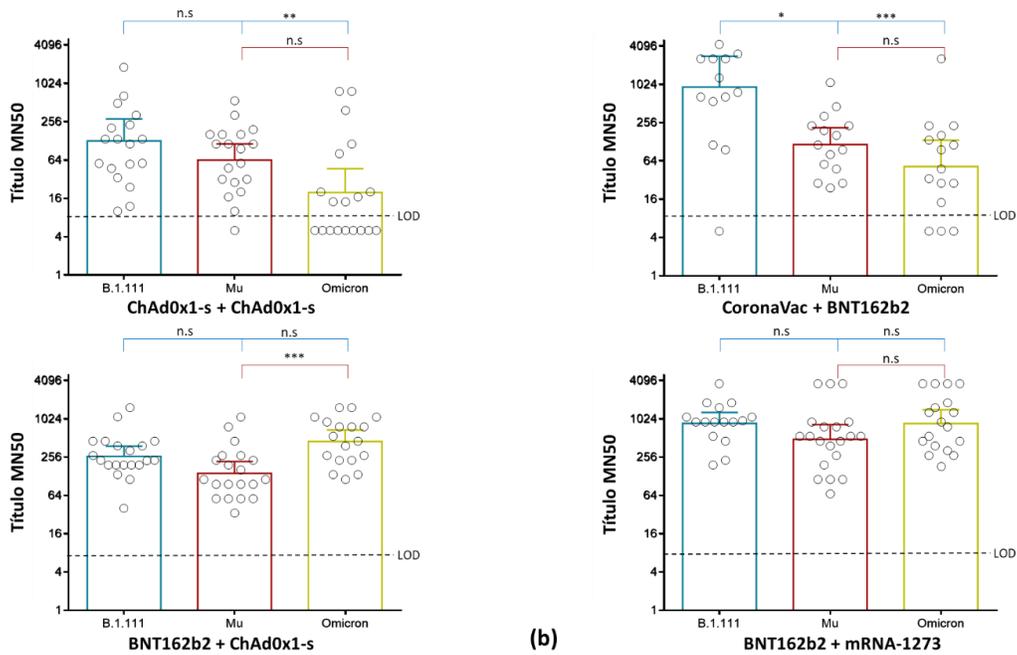
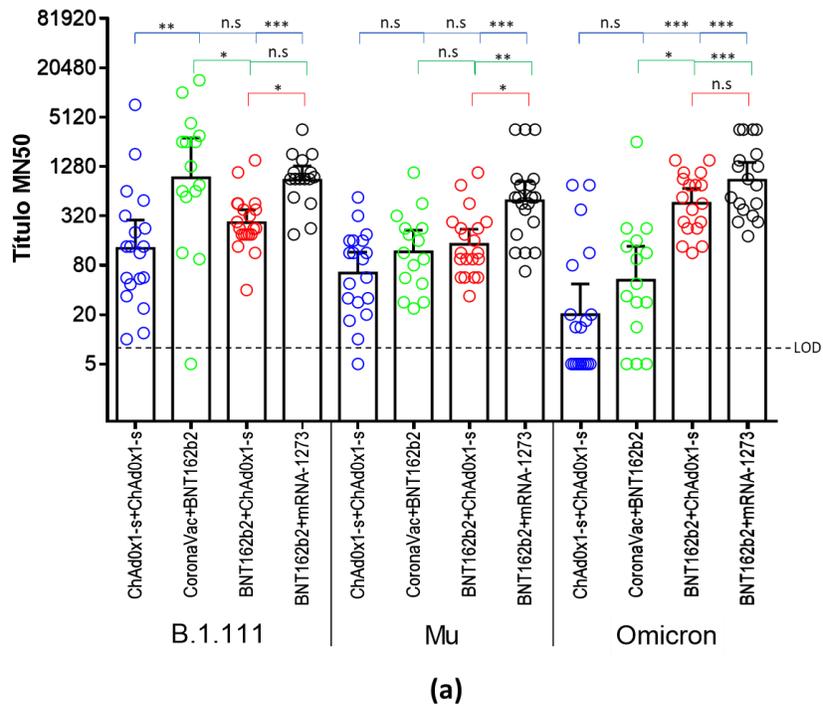


Figura 7. Respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 en individuos inmunizados con esquemas primarios (dos dosis) más una dosis refuerzo de ChAdOx1-s + ChAdOx1-s, CoronaVac + BNT162b2, BNT162b2 + ChAdOx1-s o BNT162b2 + mRNA-1273. **(a)** Comparación de GMTs entre esquemas dosis-refuerzo por variante y **(b)** comparación de GMTs entre variantes de SARS-CoV-2 esquema. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s.: no significativo. LOD: límite de detección.

7.7 Las respuestas de nAbs contra Ómicron no difieren entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga

Debido a la imposibilidad de controlar el tipo de vacuna para la aplicación de la dosis de refuerzo, los estudios de respuestas de nAbs contra B.1.111, Mu y Ómicron en individuos con inmunidad heteróloga e híbrida se realizaron en dos grupos de individuos que recibieron como esquema primario común, dos dosis de la vacuna BNT162b2. El factor diferenciante fue la dosis de refuerzo que consistió en una dosis de ChAd0x1-s para el primer grupo, y una dosis de mRNA-1273 para el segundo grupo. A su vez, cada grupo se diferenció en dos subgrupos con y sin historial de infección por SARS-CoV-2 en algún momento del seguimiento.

Para estas comparaciones, la seropositividad en todos los grupos fue del 100%. Adicionalmente, los individuos del grupo heterólogo BNT162b2+ChAd0x1-s presentaron títulos de nAbs significativamente más bajos contra B.1.111 y Mu comparado con los individuos del mismo grupo con inmunidad híbrida. Igualmente, los títulos de nAbs contra B.1.111 y Mu de este grupo resultaron significativamente más bajos que los observados en los grupos BNT162b2+mRNA-1273 con, y sin inmunidad híbrida. En contraste, no se observaron diferencias significativas en los nAbs contra B.1.111, Mu y Ómicron entre los grupos BNT162b2+ mRNA-1273 con y sin inmunidad híbrida. Notablemente, las respuestas de nAbs contra Ómicron fueron uniformes entre los grupos de inmunizados ya que no se observaron diferencias significativas en los títulos de nAbs contra esta variante entre los grupos BNT162b2+ChAd0x1-s y BNT162b2+mRNA-1273 con y sin inmunidad híbrida (**Figura 8**).

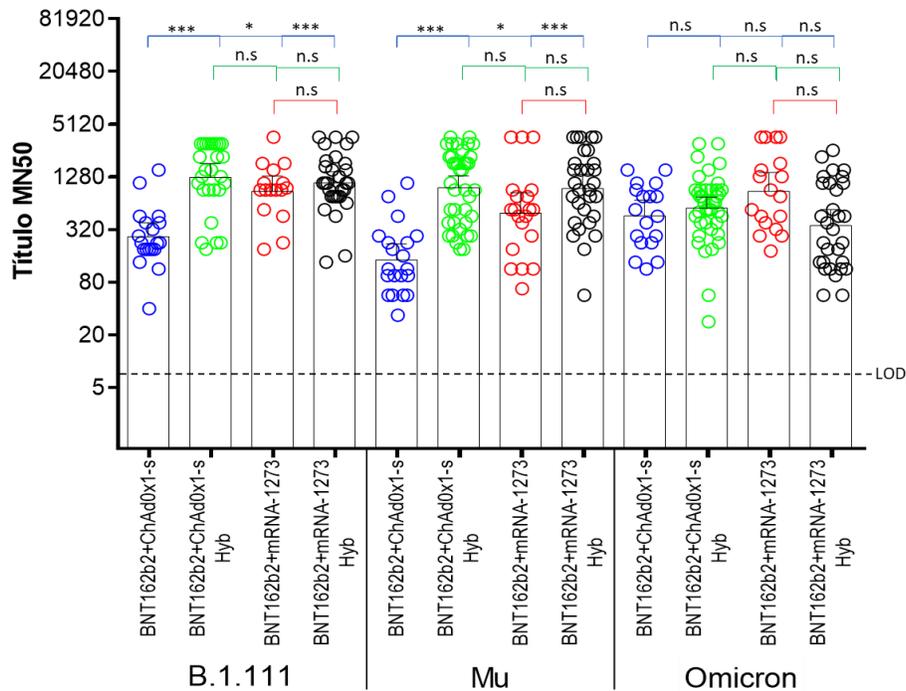


Figura 8. Comparación de respuestas de anticuerpos neutralizantes contra variantes del SARS-CoV-2 entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga. La inmunidad heteróloga fue inducida por esquemas primarios (dos dosis) más refuerzo (una dosis) de BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+ mRNA-1273, y la inmunidad híbrida-heteróloga fue inducida por los mismos esquemas de vacunación además de la confirmación de infección por SARS-CoV-2 en algún momento del seguimiento. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s.: no significativo. LOD: límite de detección.

7.8 Niveles comparables de anticuerpos IgG contra las subunidades S1, S2 y el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 entre individuos con inmunidad híbrida y heteróloga

El estudio de inmunoglobulinas G y M contra la proteína N y las subunidades S1, S2 y el RBD de la proteína S se realizó en los mismos individuos con inmunidad híbrida y heteróloga que recibieron el esquema primario común de dos dosis de la BNT162b2 y una dosis de refuerzo con ChAd0x1-s o mRNA-1273. Inicialmente se evidenció que los grupos de individuos presentaron respuestas de anticuerpos IgG contra las subunidades S1, S2 y el RBD de la proteína S, debido a que las intensidades de fluorescencia medias (MFI) contra estos antígenos estuvieron por encima del umbral de detección (**Figura 9a y Tabla 8**). No se observaron diferencias significativas en las comparaciones de niveles anticuerpos IgG contra S1 entre los grupos de individuos con inmunidad heteróloga (BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+mRNA-1273) contra su respectivo grupo híbrido. Igualmente, no se

observaron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos IgG contra S1 entre los grupos con inmunidad híbrida, así como entre el grupo híbrido BNT162b2+ChAd0x1-s contra el grupo heterólogo BNT162b2+mRNA-1273 (**Figura 9a**). En contraste, los individuos del grupo BNT162b2+ChAd0x1-s, presentaron niveles significativamente más bajos comparado con los grupos BNT162b2+mRNA-1273 híbrido y heterólogo.

Por otro lado, los grupos de individuos con inmunidad heteróloga presentaron niveles de anticuerpos IgG contra S2 significativamente más bajos que los observados en sus respectivos grupos híbridos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la comparación de los niveles de anticuerpos IgG contra S2 entre grupos con inmunidad híbrida, al igual que entre los grupos con inmunidad heteróloga (**Figura 9a**).

Notablemente, las respuestas de anticuerpos IgG contra el RBD de la proteína S fueron uniformes para todas las comparaciones entre los grupos de individuos con inmunidad heteróloga y sus respectivos grupos con inmunidad híbrida, al no observarse diferencias significativas (**Figura 9a**).

Para las comparaciones de anticuerpos IgG contra la proteína N, los grupos de individuos con inmunidad heteróloga mostraron niveles de MFI por debajo del umbral de detección (**Figura 9a**). Este resultado fue consistente con lo esperado para los individuos sin historial de infección por SARS-CoV-2 y corroboró que las repuestas de anticuerpos en estos individuos fueron inducidas por la inmunización contra la proteína S del SARS-CoV-2 que está codificada en las vacunas BNT162b2, ChAd0x1-s y mRNA-1273. Por otro lado, consistente con lo esperado en individuos con historial de infección por SARS-CoV-2 donde se generan anticuerpos contra la proteína N que hace parte de la partícula viral, los grupos de individuos con inmunidad híbrida presentaron valores MFI medios por encima del umbral de detección y además no presentaron diferencias significativas entre sí, para las respuestas de anticuerpos IgG contra la proteína N (**Figura 9a**). En general, las respuestas de anticuerpos IgG contra S1, S2 y RBD para todos los grupos de inmunizados estuvieron por encima de 16384 MFI con excepción del grupo

BNT162b2+ChAd0x1-s heterólogo que presentó valores medios de MFI contra S2 por encima de 8192 (**Figura 9a y Tabla 9**). No obstante, las respuestas de anticuerpos IgG contra la proteína N en los grupos con inmunidad híbrida fueron más bajas al observarse valores medios de MFI entre los 4096 y 8192 (**Figura 9a**).

7.9 Baja correlación entre títulos de nAbs contra Ómicron, frente a anticuerpos IgG anti-S1, S2, N y RBD en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga

En general, no se observó uniformidad de correlaciones entre los niveles de anticuerpos IgG anti-S1, S2, N y RBD frente a nAbs contra B.1.111, Mu y Ómicron en los grupos con inmunidad híbrida y heteróloga (**Tabla 9**).

En las comparaciones de anticuerpos IgG anti-S1 se observó correlación con los nAbs contra B.1.111 y Mu, en los grupos BNT162b2+ChAd0x1-s híbrido y heterólogo (**Tabla 9**). Adicionalmente, en el grupo BNT162b2+mRNA-1273 híbrido, se observó correlación entre los nAbs contra las tres variantes del SARS-CoV-2 y anticuerpos IgG anti-S1, mientras que en el grupo BNT162b2+mRNA-1273 heterólogo, solo se observó correlación entre nAbs contra Mu y anticuerpos IgG anti-S1 (**Tabla 9**).

Para las comparaciones de anticuerpos IgG anti-S2, estos se correlacionaron con los nAbs contra Mu de los grupos BNT162b2+ChAd0x1-s y BNT162b2+mRNA-1273 heterólogos, y con los nAbs contra Ómicron en el grupo BNT162b2+mRNA-1273 híbrido.

Por otro lado, los niveles de anticuerpos IgG anti-N se correlacionaron sólo con los nAbs contra Mu y Ómicron en el grupo BNT162b2+mRNA-1273 híbrido. Finalmente, los anticuerpos IgG anti-RBD sólo se correlacionaron con los nAbs contra Mu en los grupos BNT162b2+ChAd0x1-s y BNT162b2+mRNA-1273 heterólogos.

7.10 Bajas respuestas de anticuerpos IgM contra antígenos del SARS-CoV-2 en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga.

Las respuestas de anticuerpos IgM contra los 4 antígenos evaluados (S1, S2, RBD y N) fueron más bajas que las respuestas de anticuerpos IgG en todos los grupos

de inmunizados, lo cual se evidenció en valores inferiores de MFI y seropositividad para anticuerpos IgM (**Tabla 6**). Por ejemplo, en las respuestas de anticuerpos IgM para la subunidad S1, los valores MFI medios en todos los grupos estuvieron por debajo de 327. Aunque los grupos de individuos con inmunidad híbrida tendieron a presentar valores MFI más altos, solo se observaron diferencias significativas entre el grupo BNT162b2+mRNA-1273 híbrido con el grupo BNT162b2+ChAd0x1-s no híbrido (**Figura 9b**). Curiosamente, entre los 4 antígenos evaluados, la seropositividad para anticuerpos IgM fue mayor contra la proteína S1 y resultó del 100% en los grupos con inmunidad híbrida y del 80 y 90% para los grupos no híbridos BNT162b2+ChAd0x1-s y BNT162b2+mRNA-1273 respectivamente (**Tabla 8**). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos IgM contra S2, RBD y la proteína N, entre los grupos de inmunizados (**Figura 9b**). Aunque los valores MFI medios en los grupos con inmunidad híbrida estuvieron apenas por encima del límite de detección para estos tres antígenos, la seropositividad fue ligeramente superior en los grupos con inmunidad híbrida oscilando entre el 1,6% y 16% comparado con su respectivo grupo sin inmunidad híbrida. Finalmente, se observó que los grupos BNT162b2+ChAd0x1-s y BNT162b2+mRNA-1273 sin inmunidad híbrida presentaron valores MFI medios para anticuerpos IgM por debajo del umbral de detección. Sin embargo, los valores MFI medios de IgM para la proteína N, estuvieron ligeramente por encima del umbral de detección en ambos grupos sin inmunidad híbrida. Debido a que las respuestas de anticuerpos IgG contra la proteína N en los mismos pacientes fueron más consistentes con los perfiles esperados para individuos con y sin historial de infección, estos resultados sugieren que los umbrales de detección de anticuerpos IgM para la proteína N fueron subestimados pese a que fueron estimados a partir de muestras del banco de sueros del 2020, previos al programa de vacunación y al brote de COVID-19 en el país.

Por lo tanto, debido a que los grupos de individuos con y sin inmunidad híbrida no presentaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgM para la proteína N, los resultados sugieren que los individuos con inmunidad híbrida conservan respuestas de anticuerpos IgM muy bajas o nulas contra esta proteína.

Igualmente, los resultados sugieren respuestas de anticuerpos IgM muy bajas o nulas contra el RBD y la subunidad S2 en todos los grupos evaluados, debido a que los valores MFI medios para estos antígenos estuvieron por debajo del umbral de detección en los grupos sin inmunidad híbrida, y a que no se observaron diferencias significativas con sus grupos correspondientes.

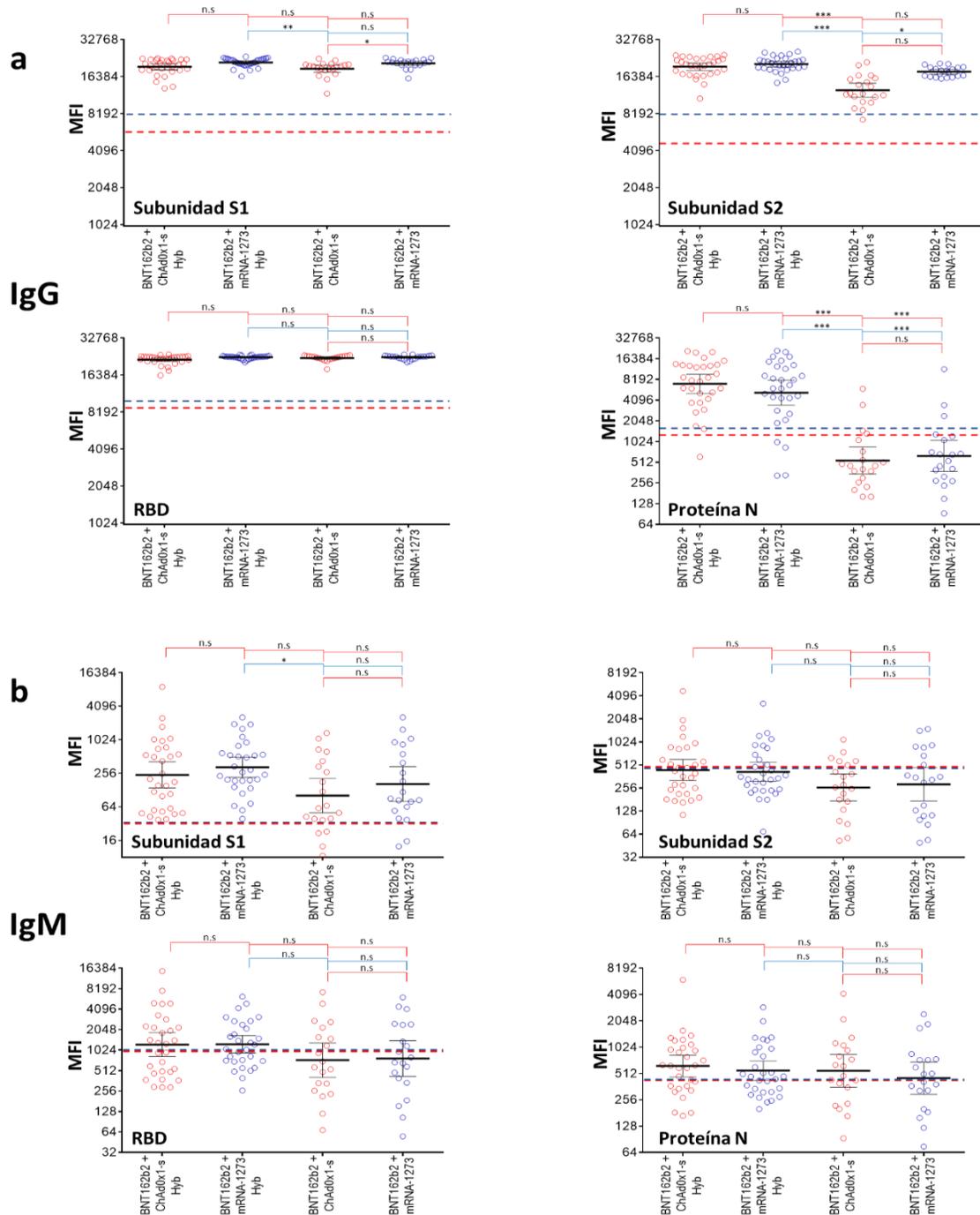


Figura 9. Ensayos de unión de anticuerpos basado en microesferas multiplex para medir la respuesta de anticuerpos IgG **(a)** e IgM **(b)**, contra 4 antígenos del SARS-CoV-2 (S1, S2, RBD y NP) en individuos con inmunidad heteróloga inducida por esquemas primarios (dos dosis) más refuerzo (una dosis) de BNT162b2+ChAd0x1-s o BNT162b2+ mRNA-1273. Las líneas punteadas (rojas para esquemas BNT162b2+ChAd0x1-s con y sin inmunidad híbrida) y azules (esquemas BNT162b2+mRNA-1273 con y sin inmunidad híbrida) indican el umbral de positividad determinado mediante curvas ROC. MFI: Intensidad de fluorescencia media determinada usando la sustracción del pozo de fondo para eliminar las señales no específicas. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$. n.s: no significativo.

Tabla 8. Umbral de positividad, sensibilidad y especificidad de los ensayos Milliplex de anticuerpos contra antígenos del SARS-CoV-2.

Esquema	Anticuerpo	Antígenos	Umbral (MFI)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tipo de inmunidad	Seropositividad (%)	Media Geométrica (MFI)
BNT162b2 + ChAd0x1-s	IgG	S1	> 5977	100	100	híbrida	100	19672
			no-híbrida	100	18998			
		S2	> 4316	100	100	híbrida	100	19731
			no-híbrida	100	12726			
		RBD	> 8363	100	100	híbrida	100	21839
			no-híbrida	100	22512			
		N	> 1412	96,67	100	híbrida	96,6	7060
			no-híbrida	15	542,1			
BNT162b2 + mRNA-1273	IgG	S1	> 7933	100	100	híbrida	100	21360
			no-híbrida	100	21037			
		S2	> 7941	100	100	híbrida	100	20716
			no-híbrida	100	17954			
		RBD	> 10648	101	100	híbrida	100	22837
			no-híbrida	100	22834			
		N	> 1584	86,67	100	híbrida	86,6	5241
			no-híbrida	15	631,5			
BNT162b2 + ChAd0x1-s	IgM	S1	> 38,25	88	75	híbrida	100	240,1
			no-híbrida	80	101,5			
		S2	> 473,8	64	75	híbrida	46,6	439,9
			no-híbrida	30	260,1			
		RBD	> 938,8	50	100	híbrida	53,3	1229
			no-híbrida	40	728,2			
		N	> 426,4	66,67	75	híbrida	66,6	623,5
			no-híbrida	65	548,8			
BNT162b2 + mRNA-1273	IgM	S1	> 39,25	92	75	híbrida	100	327,7
			no-híbrida	90	164,6			
		S2	> 453,8	64	75	híbrida	36,6	415,6
			no-híbrida	35	285,8			
		RBD	> 943,8	54	100	híbrida	56,6	1244
			no-híbrida	40	770			
		N	> 423,1	60	75	híbrida	56,6	552,7
			no-híbrida	50	453			

Tabla 9. Comparación de los títulos de anticuerpos IgG anti-S1, S2, N y RBD contra anticuerpos neutralizantes en individuos con inmunidad híbrida y heteróloga contra el SARS-CoV-2.

Esquema	Comparación	Spearman r*	valor p
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,3918	0,0478
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,4256	0,019
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,2163	0,2597
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,6006	0,0051
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,6568	0,0017
	MN50 Omicron (BA.1)	0,1089	0,6672
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,4053	0,0292
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,8691	< 0,0001
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,8073	< 0,0001
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,3693	0,1592
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,8375	< 0,0001
	MN50 Omicron (BA.1)	0,2878	0,2468
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,365	0,0667
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,2293	0,2228
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	-0,04587	0,8132
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,4108	0,072
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,581	0,0072
	MN50 Omicron (BA.1)	-0,2924	0,239
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,1925	0,3172
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,4174	0,0217
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,3722	0,0428
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,1674	0,5332
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,6078	0,0045
	MN50 Omicron (BA.1)	0,3834	0,1163
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,4534	0,02
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,3502	0,0578
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,3663	0,0507
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	-0,3274	0,1588
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	-0,4348	0,0554
	MN50 Omicron (BA.1)	-0,2142	0,3934
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,1248	0,5187
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,5226	0,0031
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,6473	0,0001
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	-0,05531	0,7912
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,147	0,5362
	MN50 Omicron (BA.1)	-0,07585	0,7649
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,365	0,0667
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,2293	0,2228
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	-0,04587	0,8132
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,4108	0,072
ChAd0x1-s	MN50 Mu (B.1.621)	0,581	0,0072
	MN50 Omicron (BA.1)	-0,2924	0,239
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,1925	0,3172
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,4174	0,0217
Hyb	MN50 Omicron (BA.1)	0,3722	0,0428
BNT162b2 +	MN50 B.1.111	0,1674	0,5332
mRNA-1273	MN50 Mu (B.1.621)	0,6078	0,0045
	MN50 Omicron (BA.1)	0,3834	0,1163

MFI: intensidad de fluorescencia media. MN50: título medio de neutralización *dos colas

8. DISCUSIÓN

En el marco de la vigilancia genómica en Colombia se depositaron secuencias de genomas completos del SARS-CoV-2 desde tan solo tres semanas a partir del primer caso confirmado de COVID-19 en el país [18], lo cual permitió determinar tempranamente la diversidad genética de los linajes del SARS-CoV-2 que circularon en el país [29], así como la emergencia e introducción de nuevos linajes con potencial riesgo para la salud pública mundial [3,19,20].

Para la puesta en marcha de los ensayos de secuenciación era indispensable contar con un método que no se viera afectado por la variabilidad genética del virus, así reduciendo el número de muestras con resultado negativo falso o un C_T por encima del criterio de inclusión. Los resultados del análisis molecular de los primeros protocolos de rRT-PCR demostraron que los primeros casos importados del virus en Colombia ya habían acumulado mutaciones en posiciones nucleotídicas blanco de los protocolos desarrollados por el CDC-China y la universidad de Hong Kong y, en consecuencia, era importante evaluar periódicamente los sitios blanco para el diagnóstico molecular usando la información de las secuencias disponibles para verificar su potencial efecto en el desempeño de las pruebas [73].

Adicionalmente el análisis molecular de los primeros protocolos para el diagnóstico del SARS-CoV-2 disponibles en el sitio web de la OMS fue fundamental en la selección del protocolo de Berlín para la detección de las proteínas RdRp y E [62], como la prueba de tamizaje molecular para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en las muestras para secuenciación del genoma completo y aislamiento viral. Notablemente, el surgimiento de las VOI/VOC no implicó mayores pérdidas de sensibilidad de esta prueba y continuó siendo de utilidad en múltiples estudios en todo el mundo donde el protocolo de Berlín es la prueba referencia para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 [86-88].

Posterior al primer año de pandemia, durante el tercer pico epidémico de COVID-19, entre abril a agosto del 2021, se registró el mayor número de casos y muertes por COVID-19 en toda la historia de la pandemia en el Colombia [3]. Este pico fue dominado por la variante Mu que se asoció a más del 70% de los casos, seguido por la variante Gamma [3]. El análisis de los casos de COVID-19 sugiere una asociación entre mayor edad, sexo, comorbilidades y peor evolución clínica de la COVID-19 [74]. Además, las variantes Mu y Gamma se asociaron con el 69% y el 18% de los fallecidos, respectivamente. Estas cifras fueron comparables con la proporción de linajes circulantes durante el tercer pico epidémico en Colombia [3]. Por lo tanto, los resultados sugieren que la concentración de pacientes fallecidos alrededor de estas dos variantes sea una consecuencia directa de su mayor representatividad durante el tercer pico epidémico. Varios estudios han reportado hallazgos similares con la edad avanzada y comorbilidades, como cáncer, hipertensión, EPOC, diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales, como los factores más asociados con la mortalidad en pacientes con COVID-19 [89]. El predominio de variantes locales y su asociación con alta carga de morbilidad y mortalidad fue descrito en Perú con la VOI Lambda, que alcanzó el 70% de los casos durante el segundo pico epidémico, a pesar de la co-circulación de las VOC Alfa y Gamma [90]. En este contexto, los ejemplos dados por las variantes Lambda y Mu prueban claramente que los linajes dominantes de SARS-CoV-2 tienen gran impacto en la morbimortalidad a pesar de su clasificación VOI.

La vigilancia genómica a nivel global reveló la aparición de variantes con mutaciones en la proteína S, el blanco principal de los nAbs [91]. Los resultados de los ensayos de neutralización del SARS-CoV-2 sugieren que la mutación E484K en B.1+L249S+E484K reduce el título neutralizante de los sueros convalecientes, comparado con los linajes A.1, B.1.420, B.1.111, todos ellos sin la mutación E484K. En línea con otros estudios, la sola presencia de la mutación E484K fue suficiente para reducir la actividad neutralizante de sueros de individuos convalecientes o que recibieron el esquema primario de dos dosis de la vacuna BNT162b2 [92]. Además, la resistencia a nAbs en otros linajes

portadores de esta mutación se ha descrito en las variantes B.1.1.7, B.1.351 y P.1 SARS-Cov-2 [22,93]. También se observó un título de nAbs ligeramente más alto contra B.1.111-I en comparación con B.1.111-II; esto podría explicarse por la presencia de dos mutaciones adicionales (T859I y W152R) en la proteína S de B.1.111-II, debido a que la presencia de mutaciones en las mismas posiciones se ha reportado de forma independiente en la VOI B.1.526 (lota) y B.1.429 [94,95].

Si bien los ensayos de neutralización evidenciaron títulos de anticuerpos de neutralización significativamente más bajos contra B1+L249S+E484K en sueros convalecientes, los datos epidemiológicos moleculares indican que no hay un aumento en la tasa de transmisibilidad asociada con este nuevo linaje [3,83].

En diciembre de 2020 comenzaron las vacunaciones masivas contra el SARS-CoV-2 en todo el mundo, lo que redujo la tasa de hospitalizaciones y muertes relacionadas con la COVID-19 [14,96,97]. Sin embargo, la aparición de VOC y VOI desafió la eficacia de las vacunas COVID-19 disponibles, y la vigilancia de su desempeño se convirtió en una prioridad. Un indicador del efecto protector de las vacunas actuales sobre variantes emergentes es evaluar su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, por lo cual, la vigilancia de laboratorio debe incluir estudios en diferentes poblaciones humanas y variantes del SARS-CoV-2 para estimar la efectividad global de las vacunas contra el SARS-CoV-2 [98].

Este estudio presenta la primera evaluación de las respuestas de nAb contra las variantes del SARS-CoV-2 de mayor prevalencia en Colombia en individuos con esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 Ad26.COVS.2. S, cuatro de las principales vacunas contra el COVID-19 administradas en el país [99].

Estos resultados muestran que las vacunas de virus inactivados y las vacunas genéticas que codifican la proteína S en Adenovirus o ARNm inducen diferentes niveles de nAbs contra las variantes del SARS-CoV-2 con alto impacto epidemiológico, como Mu, Delta y Ómicron. En este estudio, las respuestas de nAbs después de esquemas primarios de BNT162b2, CoronaVac, ChAdOx1 o

Ad26.COVS fueron significativamente más bajas frente a la VOI Mu y las VOC Delta y Ómicron, comparado con B.1.111 y Gamma, lo que podría implicar una eficacia reducida general de estas vacunas contra el COVID-19.

Además, se observaron diferencias entre los títulos de nAbs inducidos por diferentes plataformas de vacunas. En particular, las variantes Gamma, Mu y Ómicron mostraron menos resistencia a los nAbs inducidos por las vacunas ChAdOx1 o Ad26.COVS basadas en vectores adenovirales, mientras que las respuestas de nAbs contra Delta fueron mayores en los vacunados con CoronaVac.

El estado de estabilización de la proteína S del SARS-CoV-2 puede explicar las diferencias en los títulos de anticuerpos neutralizantes provocados por el virus completo inactivado y las vacunas genéticas. Por ejemplo, el proceso de fabricación de la vacuna CoronaVac incluye beta-propiolactona para inactivar las partículas virales y varios pasos de purificación que aumentan la eliminación de S1 del trímero S en los viriones del SARS-CoV-2, lo cual altera la conformación de la proteína S y su presentación al sistema inmune. Estos factores pueden contribuir a las variaciones en las eficacias reportadas para esta vacuna [8,12].

Por otro lado, la vacuna de ARNm BNT162b2, contiene mutaciones estabilizadoras destinadas a prevenir la inestabilidad conformacional de la proteína S y el posterior desprendimiento no deseado de la subunidad S1 [8]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que esta optimización de la secuencia no previene el escape de varias variantes del SARS-CoV-2 de los nAbs provocados por esta vacuna.

Además, la vacuna adenoviral Ad26.COVS contiene mutaciones estabilizadoras de S para mantener su conformación de prefusión, mientras ChAdOx1 carece de mutaciones estabilizadoras de S. No obstante, ambas plataformas usan secuencias de péptido señal en el extremo N-terminal de S. Ad26.COVS utiliza la secuencia de señal de la proteína S del SARS-CoV-2 original, mientras que ChAdOx1, utiliza una forma extendida de la secuencia de

señal del activador del plasminógeno tisular (tPA) corriente arriba de la secuencia señal de la proteína S original [8].

Por lo tanto, mientras que las respuestas más altas de nAbs provocadas por las vacunas genéticas, probablemente dependan de la presentación de una forma estable de la proteína S como antígeno para el sistema inmunitario, el mejor rendimiento de las vacunas de vectores de adenovirus en relación con las vacunas de ARNm podría deberse a diferencias en la estabilidad de la expresión del antígeno en el tiempo [8].

De acuerdo con estos hallazgos, los estudios en individuos vacunados con BNT162b2, ChA-dOx1 y CoronaVac evidenciaron respuestas de nAbs reducidas contra Gamma, Delta y Ómicron, en comparación con una variante ancestral portadora de la mutación D614G, aunque estas reducciones fueron notables para Ómicron [98].

Además, los individuos con dos dosis de la vacuna BNT162b2 mostraron una disminución en los títulos de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Gamma, Alpha, Delta y Mu, luego de un mes de vacunación con una reducción notable en los títulos contra las variantes Delta y Mu [100]. De manera similar, los estudios en pacientes con dos dosis de BNT162b2 o CoronaVac informaron respuestas bajas o indetectables de nAbs contra Ómicron en relación con la variante ancestral [13,101]. Además, varios estudios demostraron que los títulos de nAbs disminuyeron drásticamente después de seis meses para Gamma, Alpha, Delta, Mu y Ómicron [100,101].

Los factores genéticos, epidemiológicos y del huésped pueden contribuir a la notoria capacidad de las variantes para escapar de los nAbs. Aunque se han descrito más de 30 mutaciones en el gen S de Ómicron, se comparte un perfil de mutaciones con Mu (T95I, R346K, N501Y y P681H) y Delta (L452R, T478K y P681H) [102].

Múltiples estudios respaldan el papel de algunas de estas mutaciones en la evasión inmune y una mayor capacidad de transmisión. La mutación T95I

combinada con G142D se asoció con cargas virales más altas y se predijo que reduciría la capacidad de neutralización de los sueros postvacunados al afectar la unión de nAbs a los epítotos 4-8 (7L2E) y 4A48 (7C2L) en el extremo N-terminal dominio (NTD) [103]. La mutación R346K también se asoció con la resistencia a los nAb de clase 2 al reducir la capacidad de unión al RBD [104,105].

Finalmente, las mutaciones L452R, T478K y N501Y se asociaron con la resistencia a los nAbs y una mayor afinidad de unión al receptor ACE2, lo que aumentó la transmisibilidad viral [103,106-108]. Por lo tanto, es posible que las respuestas reducidas de nAbs contra Mu, Delta y Ómicron encontradas en este estudio, puedan explicarse parcialmente por estas mutaciones.

Por otro lado, a pesar de múltiples estudios que muestran respuestas diferenciales de nAbs inducidas por la vacuna contra las variantes del SARS-CoV-2, el impacto del título de nAbs en el resultado clínico no se comprende completamente. Andrews, et al (2022) [109] informaron una disminución significativa de la eficacia de la vacuna con el tiempo contra Delta y Ómicron (las variantes más predominantes últimamente) después de dos dosis de BNT162b2 o ChAdOx1. Este estudio encontró una reducción de la eficacia de BNT162b2 contra la infección con Delta del 90,9 % a las cuatro semanas de la segunda dosis, al 62,7 % a las 25 semanas. Sin embargo, la eficacia contra la infección con Ómicron disminuyó del 65,5 % a las cuatro semanas desde la segunda dosis a solo el 8,8 % a las 25 semanas. Además, la eficacia de ChAdOx1 contra la infección por Delta disminuyó del 82,8 % a las cuatro semanas al 43,5 % a las 25 semanas, mientras que la eficacia contra Ómicron disminuyó del 48,9 % a las cuatro semanas a ningún efecto a las 20 semanas [109], lo cual es consistente con nuestros resultados.

Por otro lado, en los individuos que recibieron dosis de refuerzo se observó un incremento de las respuestas de nAbs contra Mu y Ómicron, las variantes del SARS-CoV-2 que dominaron el tercer y cuarto pico epidémico del COVID-19 (**Tabla 7**). Los incrementos en los títulos de nAbs contra Mu y Ómicron dependieron del esquema de refuerzo heterólogo, y fueron más pronunciados

en los individuos con esquemas BNT162b2+mRNA-1273, seguido de BNT162b2+ChAd0x1-s y CoronaVac+BNT162b2. Notablemente, los individuos con esquema de refuerzo homólogo (ChAd0x1-s + ChAd0x1-s), no presentaron aumentos significativos en los nAbs respecto al esquema primario.

Barros-Martins et al (2021) [110], estudiaron las respuestas de nAbs contra las VOC Alpha, Gamma y Beta en un modelo de neutralización con sustitutos de virus (sVNT), en individuos con esquema primario ChAd0x1-s y refuerzo homólogo (ChAd0x1-s) o heterólogo (BNT162b2). Similar a lo hallado en el presente estudio, Barros-Martins et al (2021), evidenciaron a las tres semanas post-refuerzo, que los individuos con refuerzo homólogo no presentaron incrementos significativos en los títulos de nAbs contra las VOC, en contraste con los individuos con refuerzo heterólogo que incrementaron las respuestas de nAbs contra todas las VOC [110]. Desafortunadamente, para el presente estudio no se disponía de individuos con el esquema ChAd0x1-s+ BNT162b2 para realizar comparaciones.

Atmar et al (2022) [16] realizaron estudios en individuos con esquemas primarios de Ad26.COV2.S, mRNA-1273 o BNT162b2 que recibieron dosis de refuerzo homólogas o heterólogas de estos tres tipos de vacunas, evidenciando al mes post-refuerzo, que los refuerzos homólogos aumentaron los títulos de nAbs entre 4 a 20 veces, mientras que los refuerzos heterólogos aumentaron los títulos entre 6 a 73, comparado con el esquema primario [16]. Si bien, los resultados anteriormente descritos coinciden con la tendencia de mayores títulos de nAbs en individuos con inmunidad heteróloga hallada en el presente estudio, las diferencias observadas posiblemente se atribuyan a 1) El grupo de refuerzo homólogo ChAd0x1-s + ChAd0x1-s no fue incluido en el estudio de Atmar, y 2) el estudio de Atmar se realizó en el modelo de lentivirus pseudotipados con la proteína S del SARS-CoV-2 y 3) las variantes de la proteína S comparadas fueron, un control con la mutación D614G contra versiones de la proteína S con el set de mutaciones de las variantes Delta y B.1.351 (beta) [16]. Adicionalmente, una revisión sistemática y meta-análisis sobre efectividad de las dosis de

refuerzo homólogas o heterólogas contra las variantes Alfa, Beta, Delta y Ómicron, concluyó que los títulos de nAbs para diferentes variantes de SARS-CoV-2 fueron más altos en el grupo de refuerzo heterólogo en comparación con el grupo de refuerzo homólogo. Además, sugirieron que el refuerzo heterólogo fue más efectivo en la prevención de la infección, el COVID-19 sintomático y la hospitalización y muerte por COVID-19 [111].

Los resultados del estudio de comparación entre las respuestas de nAbs en individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga mostraron que para el grupo BNT162b2+mRNA-1273, los títulos de nAbs contra la variante ancestral (B.1.111), Mu y Ómicron (BA.1) no difieren respecto al mismo esquema con inmunidad híbrida, mientras que en el grupo BNT162b2+ChAd0x1-s, esto sólo se cumplió contra la variante Ómicron. Esto sugiere que la potencia de las respuestas neutralizantes tras la exposición natural al SARS-CoV-2 es afectada por el esquema de refuerzo. Poco se sabe de las respuestas de nAbs entre individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga, no obstante, se evidenció que individuos con inmunidad híbrida están más protegidos de la infección con la variante Ómicron que los individuos con dosis refuerzo [112]. Estudios en adultos mayores con esquemas primarios y homólogos de BNT162b2 o CoronaVac, sugieren que los individuos con inmunidad híbrida tienen mayores títulos de nAbs contra Ómicron que aquellos con inmunidad sólo por vacunas [113]. En contraste, Cervantes-Luevano, et al (2022) [114], reportaron que individuos convalecientes del COVID-19 que posteriormente recibieron un esquema primario de Ad5-nCoV (Cansino), presentaron a los 20-40 días pos-refuerzo, niveles de nAbs contra las variantes Alpha, Delta, y Épsilon, comparables con individuos sin historial de infección con esquema heterólogo Ad5-nCoV (Cansino)+Ad2-6.COVS-S. Esto sugiere que el refuerzo con vacunas heterólogas podría inducir inmunidad contra el SARS-CoV-2 equivalente a la inmunidad híbrida [114], un escenario que también podría deducirse de los resultados del presente estudio.

Curiosamente, en el presente estudio no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 y RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 en los dos grupos de individuos con inmunidad heteróloga e híbrida-heteróloga. Estos resultados concuerdan con las respuestas de nAbs contra B.1.111, Mu y Ómicron en los grupos con esquema heterólogo BNT162b2+mRNA-1273 y su contraparte híbrido-heterólogo, aunque contrastan con las respuestas de nAbs contra B.1.111 y Mu en los grupos con esquema heterólogo BNT162b2+ChAd0x1-s y su contraparte híbrido-heterólogo. La subunidad S1 contiene el RBD que abarca los residuos 331 a 524 de la proteína S [115], donde se encuentra el motivo de unión al receptor (RBM) que se une directamente al receptor celular ACE2 [116]. Diversos estudios señalan que el RBD es el principal blanco de los nAbs [117-119], sin embargo, la acumulación de mutaciones en ésta región como, K417T/N, T478K E484K/A y N501Y en múltiples VOI y VOC ha reducido la eficacia de las vacunas contra el SARS-CoV-2 evaluadas en este estudio, debido a que fueron diseñadas antes de la emergencia de variantes con estas mutaciones [116,117]. En este contexto, es importante tener en cuenta que el panel MILLIPLEX® SARS-CoV-2 Antigen empleado en este estudio para detectar anticuerpos IgG contra los antígenos del SARS-CoV-2, está basado en la cepa referencia de Wuhan, por lo cual, los niveles de anticuerpos contra estos antígenos no necesariamente reflejan niveles de nAbs, lo cual concuerda con la escasa correlación entre nAbs y anticuerpos contra RBD hallada en este estudio.

Finalmente, aunque los niveles altos de nAbs se correlacionan positivamente con la protección contra COVID-19 y la efectividad de la vacuna [14,120], queda por determinar el título protector de los anticuerpos neutralizantes. Lau et al. reportaron que un título de inhibición de la hemaglutinación de 1:40 protege de la infección por influenza [121]. Además, Gharbharan A. et al., sugieren que un título de 1:80 o superior después de la transfusión de plasma convaleciente para el tratamiento de COVID-19 inhibe el crecimiento viral in vitro en un 95% [122]. Por estas razones, en este trabajo se propone la hipótesis de que un título de 1:80 o superior puede proteger contra la progresión a enfermedad grave, lo que,

por razones de salud pública debería lograrse preferentemente mediante la vacunación. Sin embargo, algunos receptores de vacunas con respuestas de nAbs deficientes o inexistentes pueden desarrollar inmunidad celular protectora después de la exposición al SARS-CoV-2. Además, las mutaciones asociadas con la resistencia a nAbs no siempre dan como resultado una evasión importante de una respuesta específica de la célula, lo que puede disminuir la gravedad de la infección. Por lo tanto, aún es necesario realizar investigaciones que estudien tanto la inmunidad celular como la humoral para proporcionar un perfil más completo de la respuesta inmune a nuevas variantes [123,124].

Sin embargo, este estudio tiene varias limitaciones, incluyendo el seguimiento de los participantes entre 9 y 13 semanas posteriores al esquema de inmunización, por lo que se las respuestas de nAbs a largo plazo, no fueron estimadas. Además, el tamaño de la muestra pequeño con heterogeneidad demográfica, la ausencia de muestras de la población pediátrica o adolescente y la falta de información sobre la contribución de las respuestas de células B o T frente a las variantes estudiadas. Finalmente, aunque hubiera sido interesante caracterizar también las respuestas inmunitarias en cohortes de personas inmunizadas con esquemas híbrido-heterólogos de CoronaVac, ChAd0x1-s Ad26.COVS, dichas cohortes no estuvieron disponibles para éste estudio.

9. CONCLUSIONES

- Con este trabajo se logró establecer un biobanco de linajes del SARS-CoV-2 con caracterización de genoma completo, disponible para el desarrollo de múltiples estudios tales como evolución viral, dinámicas de interacción virus-hospedero, respuesta inmune celular y desarrollo de tratamientos y vacunas.
- Hasta la fecha del presente documento, éste es el único estudio que determina de manera simultánea el perfil de resistencia a nAbs inducidos por esquemas primarios de las vacunas de Pfizer, Sinovac, AstraZeneca y Janssen contra las 4 variantes de mayor impacto en Colombia y demuestra que las variantes Mu, Delta y Ómicron presentan alta resistencia a los nAbs inducidos por estas vacunas
- Este trabajo contribuye al entendimiento del impacto de la variante Mu en Colombia al reportar su alta resistencia a nAbs generados por vacunas y asociación al pico epidémico con mayor número de muertes por COVID-19 en Colombia.
- El refuerzo heterólogo permite recuperar los títulos de nAbs contra Ómicron y Mu a niveles comparables a los inducidos contra el linaje control que carece de mutaciones asociadas el escape de nAbs, y a niveles comparables con los individuos con inmunidad híbrida.
- Resultados conjuntos: Anticuerpos neutralizantes y anticuerpos contra antígenos del SARS-CoV-2 sugieren neutralización mediada principalmente por anticuerpos IgG.
- Las estrategias de laboratorio empleadas en este estudio son un modelo para el establecimiento de estrategias de vigilancia y caracterización de virus emergentes en el país, que permitieron el fortalecimiento de las capacidades técnico-científicas para dar respuesta ante futuros brotes de microorganismos que requieran manejo en laboratorios de alta contención.

10. COMUNICACIÓN Y APROPIACIÓN PÚBLICA DE LOS RESULTADOS

10.1 Artículos publicados en el marco del presente estudio

1. **Álvarez-Díaz, D.A.**; Muñoz, A.L.; Herrera-Sepúlveda, M.T.; Tavera-Rodríguez, P.; Laiton-Donato, K.; Franco-Muñoz, C.; Ruiz-Moreno, H.A.; Galindo, M.; Catama, J.D.; Bermudez-Forero, A.; Mercado-Reyes, M. Neutralizing Antibody Responses Elicited by Inactivated Whole Virus and Genetic Vaccines against Dominant SARS-CoV-2 Variants during the Four Epidemic Peaks of COVID-19 in Colombia. *Vaccines* **2022**, *10*, 2144. **REVISTA Q1**
2. **Álvarez-Díaz DA**, Ruiz-Moreno HA, Zapata-Bedoya S, Franco-Muñoz C, Laiton-Donato K, Ferro C, Sepulveda MTH, Pacheco-Montealegre M, Walteros DM, Carrero-Galindo LC, Mercado-Reyes M. Clinical outcomes associated with Mu variant infection during the third epidemic peak of COVID-19 in Colombia. *Int J Infect Dis.* 2022 Dec;125:149-152. **REVISTA Q1**
3. **Alvarez-Diaz DA**, Laiton-Donato K, Torres-Garcia OA, Ruiz-Moreno HA, Franco-Munoz C, Beltran MA, et al. Reduced levels of convalescent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 B.1+L249S+E484K lineage. *Virus Res.* 2022;308:198629. **REVISTA Q1**
4. **Álvarez-Díaz DA**, Muñoz AL, Tavera-Rodríguez P, Herrera-Sepúlveda MT, Ruiz-Moreno HA, Laiton-Donato K, et al. Low Neutralizing Antibody Titers against the Mu Variant of SARS-CoV-2 in 31 BNT162b2 Vaccinated Individuals in Colombia. *Vaccines.* 2022;10(2):180. **REVISTA Q1**
5. **Alvarez-Diaz DA**, Franco-Munoz C, Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Franco-Sierra ND, Florez-Sanchez AC, et al. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2020;84:104390. **REVISTA Q1**
6. **Alvarez-Diaz DA**, Laiton-Donato K, Franco-Munoz C, Mercado-Reyes M. SARS-CoV-2 sequencing: The technological initiative to strengthen early warning systems for public health emergencies in Latin America and the Caribbean. *Biomédica.* 2020;40(Supl. 2):188-97. **REVISTA Q3**

10.2 Presentaciones en congresos y otros eventos científicos

Evento	Nombre	Institución	
1	LVII CONGRESO NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	Impacto de la diversificación de variantes del SARS-CoV-2 en el escape a anticuerpos neutralizantes durante la pandemia de covid-19 en Colombia.	ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
2	XXXVII Congreso Chileno de Infectología	Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra variantes del sars-cov-2 en individuos vacunados con bnt162b2, Coronavac, chadox1 y ad26.Cov2.S en Colombia	Sociedad Chilena de Infectología
3	XVII Encuentro Científico del INS	VIGILANCIA GENÓMICA DEL SARS-COV-2: IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA COLOMBIANA.	Instituto Nacional de Salud
4	XVII Encuentro Científico del INS	Estandarización de un ensayo de microneutralización para la determinación de títulos neutralizantes en sueros convalecientes contra linajes del SARS-CoV-2	Instituto Nacional de Salud
5	X Simposio Colombiano de Virología y V Congreso Latinoamericano de Virología	Disminución del título neutralizante en sueros de convalecientes y vacunados contra el SARS-CoV-2 frente a linajes del virus con la mutación E484K.	Asociación Colombiana de Virología
6	Departamento de Química del Recinto Universitario de Mayagüez	La secuenciación como una herramienta de alarma temprana ante epidemias en Colombia	Universidad de Puerto Rico – Mayaguez
7	Seminario de Tópicos Avanzados en Biología Molecular del Doctorado en Ciencias de la Salud	Fundamento tecnología Oxford Nanopore: Aplicación en la secuenciación del SARS-CoV-2 en Colombia	Universidad Antonio Nariño – Doctorado en Ciencias
8	Simposio Internacional “El Genoma de SARS-CoV2, su evolución y epidemiología en América Latina”	Aplicación de estudios genómicos de SARSCoV-2 en Colombia” / “Application of SARS-CoV-2 genomic studies in Colombia	División de Ciencias de Centro Internacional de la Papa
9	Mes de la Ciencia y la Tecnología 2020, BLAA - UAN: Biotecnología: una ciencia de colores	La secuenciación como una herramienta de alerta temprana ante las epidemias en Latinoamérica.	Banco de la república

10.3 Premios y distinciones

PREMIO ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA 2022, por el trabajo de investigación: “Evolución de las variantes genéticas del SARS-CoV-2 y su asociación con la respuesta inmune adquirida durante la pandemia en Colombia” Marcela María Mercado Reyes, Diego Álvarez Díaz, Katherine Laiton Donato, Carlos Franco Muñoz, Héctor Ruiz, José Usme Giro, Jonnathan Reales, Diego Prada, Sheryll Corchuelo, María Teresa Herrera Sepúlveda, et al. Programa Nacional de Caracterización Genómica de SARS-COV-2, liderado por el grupo de Genómica de Microorganismos Emergentes. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.C., October 27th 2022.

Mención de honor en los premios de la Fundación Alejandro Angel Escobar en Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – 2022 por el trabajo Evolución de las variantes genéticas del SARS-CoV-2 y su asociación con la respuesta inmune adquirida durante la pandemia en Colombia. Marcela María Mercado Reyes, Diego Álvarez Díaz, Katherine Laiton Donato, Carlos Franco Muñoz, Héctor Ruiz, José Usme Giro, Jonnathan Reales, Diego Prada, Sheryll Corchuelo, María Teresa Herrera Sepúlveda, et al. Genómica de Microorganismos Emergentes. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.C., October 05th 2022.

Reconocimiento por su contribución científica para la secuenciación del primer genoma de SARS-COV-2 en Colombia, en marzo de 2020. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.C., April 5th de 2022

11. CONSIDERACIONES AMBIENTALES

Durante la ejecución del proyecto se produjeron algunos residuos químicos y orgánicos de interés sanitario y ambiental. La gestión integral de estos residuos en su generación, segregación, almacenamiento, inactivación, recolección, transporte, tratamiento y disposición final se realizó mediante los lineamientos de los Decretos 2676 de 2000, 4126 de 2005 y 1669 de 2002, del Ministerio del Medio Ambiente y el Manual de Gestión Integral de Residuos del Instituto Nacional de Salud – INS (INT-A05.0000-007). Este estudio no generó alteraciones significativas en el ambiente.

12. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

En esta investigación se trabajó con el patógeno SARS-CoV-2 causante de COVID-19, el cual, de acuerdo al Manual de Bioseguridad del INS, código MNL A01-0000-001, se considera perteneciente al grupo de riesgo 3 para trabajo en el laboratorio. Los ensayos de propagación y neutralización del virus se realizaron en el área de procedimientos EXP-14/BSL-3 ubicada en la zona de cuarentena de ABSL-2 bioterio de barrera - ABSL-2/BSL-2 del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), con el fin de aumentar la contención de las áreas dando cumplimiento a varios aspectos considerados para áreas destinadas como riesgo biológico 3 como el SARS-CoV-2. Esta área cuenta con zonas independientes y control de acceso restringido para uso exclusivo, redundancia en unidades de extracción con filtración HEPA y áreas sin recirculación de aire (100% exterior). El área es sellable y cuenta con mecanismos de descontaminación por nebulización y equipos como cabina de seguridad biológica y autoclave para neutralización de desechos. Los profesionales a cargo de la manipulación los aislamientos del SARS-CoV-2 cuentan con entrenamiento en prácticas de laboratorio BSL-3 y usan elementos de bioseguridad y protección personal de barrera. En el laboratorio de biocontención trabajan siempre en equipos de dos personas. El ingreso al área de procedimientos EXP-14/BSL-3 se realizó desde el vestuario del bioterio de barrera - ABSL-2/BSL-2 donde se retiraron la ropa de la calle hasta quedar en ropa interior y vistieron un overol de tela quirúrgica. En la precámara del área de procedimientos EXP-14/BSL-3 se

vistieron con los demás elementos de protección que incluyeron, protección de cabeza (cofia), protección respiratoria (Trajes envolventes PAPR (powered air-purifying respirator y mascarillas N-95), overol antilíquido Tyvek, y protección de manos (doble guante en cada mano) y protección de pies (polainas y botas de hule).

13. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto está enmarcado en el programa nacional de vigilancia genómica liderado por el INS, y las muestras que conforman la colección de hisopados nasofaríngeos y sueros fueron colectadas en el marco de los proyectos CORHUCO aprobado por el comité de ética del INS, CEMIN-04-2020, y “Evaluación de la inmunidad pos-inmunización contra el SARS-CoV-2 en una cohorte de trabajadores de la salud, Colombia 2021” con comité de ética CEMIN-04-2021 y “Evaluación de la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2 en una cohorte de población colombiana inmunizada con las vacunas incluidas dentro del Plan Nacional de vacunación en Colombia, 2021”, con comité de ética CEMIN-19-2021.

En cuanto a normatividad nacional, se tuvo en cuenta la resolución N° 8430 de 1993 en la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, artículo 11 del capítulo 1 (De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos) se establece que la investigación realizada en este proyecto está clasificada en la categoría de investigación sin riesgo dado que no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaron en el estudio, sino que se utilizó el Biobanco del grupo de Genómica de Microorganismos Emergentes del INS.

En este proyecto se tuvieron en cuenta los principios éticos generales promulgados en la Declaración de Helsinki adoptada por la 64va Asamblea Médica Mundial, Fortaleza, Brazil, Octubre 2013 (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>) así como la Guía 11 (RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y USO DE MATERIALES BIOLÓGICOS Y DATOS RELACIONADOS) del Consejo de las

Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS por sus siglas en inglés) (<https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/01/WEB-CIOMS-EthicalGuidelines.pdf>).

En esta investigación se hizo uso de la información asociada a los sueros que reposan en el Biobanco del grupo de Genómica de Microorganismos Emergentes, como historias clínicas, hallazgos clínicos y de los consentimientos informados.

Para garantizar la anonimización de las muestras, se empleó el código de Biobanco previamente asignado a dichas muestras y a los datos clínicos del paciente. El código consta de 6 caracteres así: BB (acrónimo de Biobanco) seguido de 4 dígitos numéricos (p.e BB0001).

14. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Morens, D.M.; Breman, J.G.; Calisher, C.H.; Doherty, P.C.; Hahn, B.H.; Keusch, G.T.; Kramer, L.D.; LeDuc, J.W.; Monath, T.P.; Taubenberger, J.K. The Origin of COVID-19 and Why It Matters. *Am J Trop Med Hyg* **2020**, *103*, 955-959, doi:10.4269/ajtmh.20-0849.
2. Laiton-Donato, K.; Villabona-Arenas, C.J.; Usme-Ciro, J.; Franco-Muñoz, C.; Álvarez-Díaz, D.; Villabona-Arenas, L.S.; Echeverría-Londoño, S.; Cucunubá, Z.; Franco-Sierra, N.; Flórez, A.; et al. Genomic Epidemiology of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Colombia. *Emerging Infectious Disease journal* **2020**, *26*, doi:10.3201/eid2612.202969.
3. INS. COVID-19 en Colombia. Available online: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus.aspx> (accessed on Dec 28 2022).
4. Dong, E.; Du, H.; Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis* **2020**, *20*, 533-534, doi:10.1016/S1473-3099(20)30120-1.
5. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. Available online: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (accessed on Dec 28, 2022).
6. Mohammed, R.N.; Tamjidifar, R.; Rahman, H.S.; Adili, A.; Ghoreishizadeh, S.; Saeedi, H.; Thangavelu, L.; Shomali, N.; Aslaminabad, R.; Marof, F.; et al. Correction: A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). *Cell Commun Signal* **2022**, *20*, 139, doi:10.1186/s12964-022-00967-4.
7. Morales-Nunez, J.J.; Munoz-Valle, J.F.; Torres-Hernandez, P.C.; Hernandez-Bello, J. Overview of Neutralizing Antibodies and Their Potential in COVID-19. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*, doi:10.3390/vaccines9121376.
8. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 104, doi:10.1038/s41541-021-00369-6.
9. Valdes-Balbin, Y.; Santana-Mederos, D.; Paquet, F.; Fernandez, S.; Climent, Y.; Chiodo, F.; Rodriguez, L.; Sanchez Ramirez, B.; Leon, K.; Hernandez, T.; et al. Molecular Aspects Concerning the Use of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a Target for Preventive Vaccines. *ACS Cent Sci* **2021**, *7*, 757-767, doi:10.1021/acscentsci.1c00216.
10. Negi, S.S.; Schein, C.H.; Braun, W. Regional and temporal coordinated mutation patterns in SARS-CoV-2 spike protein revealed by a clustering and network analysis. *Sci Rep* **2022**, *12*, 1128, doi:10.1038/s41598-022-04950-4.
11. Minsalud. Vacunación contra COVID-19. Available online: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/Vacunacion/Paginas/Vacunacion-covid-19.aspx> (accessed on December 13, 2022).
12. Fiolet, T.; Kherabi, Y.; MacDonald, C.J.; Ghosn, J.; Peiffer-Smadja, N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect* **2022**, *28*, 202-221, doi:10.1016/j.cmi.2021.10.005.
13. Lu, L.; Mok, B.W.; Chen, L.L.; Chan, J.M.; Tsang, O.T.; Lam, B.H.; Chuang, V.W.; Chu, A.W.; Chan, W.M.; Ip, J.D.; et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin Infect Dis* **2021**, doi:10.1093/cid/ciab1041.
14. Fukutani, K.F.; Barreto, M.L.; Andrade, B.B.; Queiroz, A.T.L. Correlation Between SARS-Cov-2 Vaccination, COVID-19 Incidence and Mortality: Tracking the Effect of Vaccination on Population Protection in Real Time. *Front Genet* **2021**, *12*, 679485, doi:10.3389/fgene.2021.679485.

15. WHO. Interim statement on booster doses for COVID-19 vaccination. Available online: <https://www.who.int/news/item/22-12-2021-interim-statement-on-booster-doses-for-covid-19-vaccination---update-22-december-2021> (accessed on March 11, 2022).
16. Atmar, R.L.; Lyke, K.E.; Deming, M.E.; Jackson, L.A.; Branche, A.R.; El Sahly, H.M.; Rostad, C.A.; Martin, J.M.; Johnston, C.; Rupp, R.E.; et al. Homologous and Heterologous Covid-19 Booster Vaccinations. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 1046-1057, doi:10.1056/NEJMoa2116414.
17. Crotty, S. Hybrid immunity. **2021**, *372*, 1392-1393, doi:doi:10.1126/science.abj2258.
18. Alvarez-Diaz, D.A.; Laiton-Donato, K.; Franco-Munoz, C.; Mercado-Reyes, M. SARS-CoV-2 sequencing: The technological initiative to strengthen early warning systems for public health emergencies in Latin America and the Caribbean. *Biomedica* **2020**, *40*, 188-197, doi:10.7705/biomedica.5841.
19. Laiton-Donato, K.; Franco-Munoz, C.; Alvarez-Diaz, D.A.; Ruiz-Moreno, H.A.; Usme-Ciro, J.A.; Prada, D.A.; Reales-Gonzalez, J.; Corchuelo, S.; Herrera-Sepulveda, M.T.; Naizaque, J.; et al. Characterization of the emerging B.1.621 variant of interest of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol* **2021**, *95*, 105038, doi:10.1016/j.meegid.2021.105038.
20. Laiton-Donato, K.; Usme-Ciro, J.A.; Franco-Munoz, C.; Alvarez-Diaz, D.A.; Ruiz-Moreno, H.A.; Reales-Gonzalez, J.; Prada, D.A.; Corchuelo, S.; Herrera-Sepulveda, M.T.; Naizaque, J.; et al. Novel Highly Divergent SARS-CoV-2 Lineage With the Spike Substitutions L249S and E484K. *Front Med (Lausanne)* **2021**, *8*, 697605, doi:10.3389/fmed.2021.697605.
21. Silva, A.R.D., Jr.; Villas-Boas, L.S.; Tozetto-Mendoza, T.R.; Honorato, L.; Paula, A.; Witkin, S.S.; Mendes-Correa, M.C. Generation of neutralizing antibodies against Omicron, Gamma and Delta SARS-CoV-2 variants following CoronaVac vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2022**, *64*, e19, doi:10.1590/S1678-9946202264019.
22. Ferrareze, P.A.G.; Franceschi, V.B.; Mayer, A.M.; Caldana, G.D.; Zimerman, R.A.; Thompson, C.E. E484K as an innovative phylogenetic event for viral evolution: Genomic analysis of the E484K spike mutation in SARS-CoV-2 lineages from Brazil. *Infect Genet Evol* **2021**, *93*, 104941, doi:10.1016/j.meegid.2021.104941.
23. Boehm, E.; Kronig, I.; Neher, R.A.; Eckerle, I.; Vetter, P.; Kaiser, L.; Geneva Centre for Emerging Viral, D. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2021**, *27*, 1109-1117, doi:10.1016/j.cmi.2021.05.022.
24. WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---31-august-2021> (accessed on May 23, 2022).
25. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **2020**, *382*, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017.
26. Zhou, P.; Yang, X.L.; Wang, X.G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **2020**, *579*, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
27. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 536-544, doi:10.1038/s41564-020-0695-z.
28. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Available online: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed on 2020, May 05).

29. Laiton-Donato K, V.-A.C., Usme-Ciro JA, Franco-Muñoz C, Álvarez-Díaz DA, Villabona-Arenas LS, et al. Genomic epidemiology of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Colombia. *Emerg Infect Dis* **2020**, *26*, 2854-2862, doi:0.3201/eid2612.202969.
30. Laiton-Donato, K.; Alvarez, D.A.; Pelaez-Carvajal, D.; Mercado, M.; Ajami, N.J.; Bosch, I.; Usme-Ciro, J.A. Molecular characterization of dengue virus reveals regional diversification of serotype 2 in Colombia. *Virology* **2019**, *16*, 62, doi:10.1186/s12985-019-1170-4.
31. Laiton-Donato, K.; Alvarez-Diaz, D.A.; Rengifo, A.C.; Torres-Fernandez, O.; Usme-Ciro, J.A.; Rivera, J.A.; Santamaria, G.; Naizaque, J.; Monroy-Gomez, J.; Sarmiento, L.; et al. Complete Genome Sequence of a Colombian Zika Virus Strain Obtained from BALB/c Mouse Brain after Intraperitoneal Inoculation. *Microbiol Resour Announc* **2019**, *8*, doi:10.1128/MRA.01719-18.
32. Rosales-Munar, A.; Alvarez-Diaz, D.A.; Laiton-Donato, K.; Pelaez-Carvajal, D.; Usme-Ciro, J.A. Efficient Method for Molecular Characterization of the 5' and 3' Ends of the Dengue Virus Genome. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/v12050496.
33. Orjuela, L.I.; Alvarez-Diaz, D.A.; Morales, J.A.; Grisales, N.; Ahumada, M.L.; Venegas, H.J.; Quinones, M.L.; Yasnot, M.F. Absence of knockdown mutations in pyrethroid and DDT resistant populations of the main malaria vectors in Colombia. *Malar J* **2019**, *18*, 384, doi:10.1186/s12936-019-3034-1.
34. Alvarez-Diaz, D.A.; Franco-Munoz, C.; Laiton-Donato, K.; Usme-Ciro, J.A.; Franco-Sierra, N.D.; Florez-Sanchez, A.C.; Gomez-Rangel, S.; Rodriguez-Calderon, L.D.; Barbosa-Ramirez, J.; Ospitia-Baez, E.; et al. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect Genet Evol* **2020**, *84*, 104390, doi:10.1016/j.meegid.2020.104390.
35. Franco-Munoz, C.; Alvarez-Diaz, D.A.; Laiton-Donato, K.; Wiesner, M.; Escandon, P.; Usme-Ciro, J.A.; Franco-Sierra, N.D.; Florez-Sanchez, A.C.; Gomez-Rangel, S.; Rodriguez-Calderon, L.D.; et al. Substitutions in Spike and Nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 circulating in South America. *Infect Genet Evol* **2020**, 104557, doi:10.1016/j.meegid.2020.104557.
36. Volz, E.; Hill, V.; McCrone, J.T.; Price, A.; Jorgensen, D.; O'Toole, A.; Southgate, J.; Johnson, R.; Jackson, B.; Nascimento, F.F.; et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell* **2021**, *184*, 64-75 e11, doi:10.1016/j.cell.2020.11.020.
37. Plante, J.A.; Liu, Y.; Liu, J.; Xia, H.; Johnson, B.A.; Lokugamage, K.G.; Zhang, X.; Muruato, A.E.; Zou, J.; Fontes-Garfias, C.R.; et al. Author Correction: Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* **2021**, *595*, E1, doi:10.1038/s41586-021-03657-2.
38. Rotondo, J.C.; Martini, F.; Maritati, M.; Mazziotta, C.; Di Mauro, G.; Lanzillotti, C.; Barp, N.; Gallerani, A.; Tognon, M.; Contini, C. SARS-CoV-2 Infection: New Molecular, Phylogenetic, and Pathogenetic Insights. Efficacy of Current Vaccines and the Potential Risk of Variants. *Viruses* **2021**, *13*, doi:10.3390/v13091687.
39. Chakraborty, S. E484K and N501Y SARS-CoV 2 spike mutants Increase ACE2 recognition but reduce affinity for neutralizing antibody. *Int Immunopharmacol* **2022**, *102*, 108424, doi:10.1016/j.intimp.2021.108424.
40. Liu, Y.; Liu, J.; Plante, K.S.; Plante, J.A.; Xie, X.; Zhang, X.; Ku, Z.; An, Z.; Scharton, D.; Schindewolf, C.; et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature* **2022**, *602*, 294-299, doi:10.1038/s41586-021-04245-0.
41. Laffebber, C.; de Koning, K.; Kanaar, R.; Lebbink, J.H.G. Experimental Evidence for Enhanced Receptor Binding by Rapidly Spreading SARS-CoV-2 Variants. *J Mol Biol* **2021**, *433*, 167058, doi:10.1016/j.jmb.2021.167058.

42. Tian, D.; Sun, Y.; Zhou, J.; Ye, Q. The global epidemic of SARS-CoV-2 variants and their mutational immune escape. *Journal of Medical Virology* **2022**, *94*, 847-857, doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.27376>.
43. Yang, W.T.; Huang, W.H.; Liao, T.L.; Hsiao, T.H.; Chuang, H.N.; Liu, P.Y. SARS-CoV-2 E484K Mutation Narrative Review: Epidemiology, Immune Escape, Clinical Implications, and Future Considerations. *Infect Drug Resist* **2022**, *15*, 373-385, doi:10.2147/IDR.S344099.
44. Fraley, E.; LeMaster, C.; Geanes, E.; Banerjee, D.; Khanal, S.; Grundberg, E.; Selvarangan, R.; Bradley, T. Humoral immune responses during SARS-CoV-2 mRNA vaccine administration in seropositive and seronegative individuals. *BMC Med* **2021**, *19*, 169, doi:10.1186/s12916-021-02055-9.
45. Krammer, F.; Srivastava, K.; Alshammary, H.; Amoako, A.A.; Awawda, M.H.; Beach, K.F.; Bermudez-Gonzalez, M.C.; Bielak, D.A.; Carreno, J.M.; Chernet, R.L.; et al. Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *N Engl J Med* **2021**, *384*, 1372-1374, doi:10.1056/NEJMc2101667.
46. Goldberg, Y.; Mandel, M.; Bar-On, Y.M.; Bodenheimer, O.; Freedman, L.S.; Ash, N.; Alroy-Preis, S.; Huppert, A.; Milo, R. Protection and Waning of Natural and Hybrid Immunity to SARS-CoV-2. *N Engl J Med* **2022**, doi:10.1056/NEJMoa2118946.
47. Mercado-Reyes, M.; Malagon-Rojas, J.; Rodriguez-Barraquer, I.; Zapata-Bedoya, S.; Wiesner, M.; Cucunuba, Z.; Toloza-Perez, Y.G.; Hernandez-Ortiz, J.P.; Acosta-Reyes, J.; Parra-Barrera, E.; et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Colombia, 2020: A population-based study. *Lancet Reg Health Am* **2022**, *9*, 100195, doi:10.1016/j.lana.2022.100195.
48. Laajaj, R.; De Los Rios, C.; Sarmiento-Barbieri, I.; Aristizabal, D.; Behrentz, E.; Bernal, R.; Buitrago, G.; Cucunuba, Z.; de la Hoz, F.; Gaviria, A.; et al. COVID-19 spread, detection, and dynamics in Bogota, Colombia. *Nat Commun* **2021**, *12*, 4726, doi:10.1038/s41467-021-25038-z.
49. Chiesa, V.; Antony, G.; Wismar, M.; Rechel, B. COVID-19 pandemic: health impact of staying at home, social distancing and 'lockdown' measures-a systematic review of systematic reviews. *J Public Health (Oxf)* **2021**, *43*, e462-e481, doi:10.1093/pubmed/fdab102.
50. UN. The Impact of COVID-19 on Latin America and the Caribbean. **2020**, 25.
51. Perez, J.; Ricciulli-Marín, D.; Bonet, J.; Haddad, E.; Araújo, I.; S. Perobelli, F. Regional differences in the economic impact of lockdown measures to prevent the spread of COVID-19: A case study for Colombia. *Cuadernos de Economía* **2021**, *40*, doi:10.15446/cuad.econ.v40n85.90803.
52. Restrepo Zea, J.H.; Espinal Piedrahita, J.; Palacios Romaña, L.D. *Gasto en salud durante la pandemia por covid-19 en países de América Latina*; Asociación Nacional de Empresarios - ANDI; Universidad de Antioquia: 2022.
53. INS. COVID-19: progreso de la pandemia y sus desigualdades en Colombia Décimo tercero Informe Técnico. **2021**, 278.
54. INS. Coronavirus (COVID - 2019) en Colombia: Genoma. Available online: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-genoma.aspx> (accessed on April 18, 2022).
55. OPS. Reportes de Situación COVID-19: Colombia. Available online: <https://www.paho.org/es/reportes-situacion-covid-19-colombia?topic=All&d%5Bmin%5D=&d%5Bmax%5D=&page=0> (accessed on Dec 14, 2022).
56. Ng, O.T.; Marimuthu, K.; Lim, N.; Lim, Z.Q.; Thevasagayam, N.M.; Koh, V.; Chiew, C.J.; Ma, S.; Koh, M.; Low, P.Y.; et al. Analysis of COVID-19 Incidence and Severity Among Adults

- Vaccinated With 2-Dose mRNA COVID-19 or Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines With and Without Boosters in Singapore. *JAMA Netw Open* **2022**, *5*, e2228900, doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.28900.
57. Andrews, N.; Tessier, E.; Stowe, J.; Gower, C.; Kirsebom, F.; Simmons, R.; Gallagher, E.; Thelwall, S.; Groves, N.; Dabrera, G.; et al. Duration of Protection against Mild and Severe Disease by Covid-19 Vaccines. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 340-350, doi:10.1056/NEJMoa2115481.
 58. Mueller, A.L.; McNamara, M.S.; Sinclair, D.A. Why does COVID-19 disproportionately affect older people? *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 9959-9981, doi:10.18632/aging.103344.
 59. Collarino, R.; Vauloup-Fellous, C.; Allemang-Trivalle, A.; Mouna, L.; Baudouin, E.P.; Keravec, H.; Neiss, M.; Bouchareb, S.; Bessai, C.; Sanchez-Tamayo, J.; et al. Persistence of Neutralizing Antibodies and Clinical Protection up to 12 Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in the Elderly. *Open Forum Infect Dis* **2022**, *9*, ofac613, doi:10.1093/ofid/ofac613.
 60. Minsalud. Personas con hipertensión arterial, priorizadas en el Plan Nacional de Vacunación. Available online: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Personas-con-hipertension-arterial-priorizadas-en-el-Plan-Nacional-de-Vacunacion.aspx> (accessed on November 29, 2021).
 61. To, K.K.; Tsang, O.T.; Chik-Yan Yip, C.; Chan, K.H.; Wu, T.C.; Chan, J.M.C.; Leung, W.S.; Chik, T.S.; Choi, C.Y.; Kandamby, D.H.; et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis* **2020**, doi:10.1093/cid/ciaa149.
 62. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **2020**, *25*, 2000045, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 63. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589-595, doi:10.1093/bioinformatics/btp698.
 64. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* **2019**, *20*, 1160-1166, doi:10.1093/bib/bbx108.
 65. WHO. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> (accessed on February 7th, 2020).
 66. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 1792-1797, doi:10.1093/nar/gkh340.
 67. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **2018**, *35*, 1547-1549, doi:10.1093/molbev/msy096.
 68. Verity, R.; Okell, L.C.; Dorigatti, I.; Winskill, P.; Whittaker, C.; Imai, N.; Cuomo-Dannenburg, G.; Thompson, H.; Walker, P.G.T.; Fu, H.; et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis* **2020**, *20*, 669-677, doi:10.1016/S1473-3099(20)30243-7.
 69. Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **1938**, *27*, 493-497, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

70. Algaissi, A.; Hashem, A.M. Evaluation of MERS-CoV Neutralizing Antibodies in Sera Using Live Virus Microneutralization Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2020**, *2099*, 107-116, doi:10.1007/978-1-0716-0211-9_9.
71. Saker, K.; Escuret, V.; Pitiot, V.; Massardier-Pilonchery, A.; Paul, S.; Mokdad, B.; Langlois-Jacques, C.; Rabilloud, M.; Goncalves, D.; Fabien, N.; et al. Evaluation of Commercial Anti-SARS-CoV-2 Antibody Assays and Comparison of Standardized Titers in Vaccinated Health Care Workers. *J Clin Microbiol* **2022**, *60*, e0174621, doi:10.1128/JCM.01746-21.
72. Colombini, A.; Vigano, M.; Tomaiuolo, R.; Di Resta, C.; Corea, F.; Sabetta, E.; Ferrari, D.; De Vecchi, E.; Maria Spano, S.; Banfi, G. Exploratory assessment of serological tests to determine antibody titer against SARS-CoV-2: Appropriateness and limits. *J Clin Lab Anal* **2022**, *36*, e24363, doi:10.1002/jcla.24363.
73. Álvarez-Díaz, D.A.; Franco-Muñoz, C.; Laiton-Donato, K.; Usme-Ciro, J.A.; Franco-Sierra, N.D.; Flórez-Sánchez, A.C.; Gómez-Rangel, S.; Rodríguez-Calderon, L.D.; Barbosa-Ramirez, J.; Ospitia-Baez, E.; et al. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* **2020**, *84*, 104390, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104390>.
74. Alvarez-Diaz, D.A.; Ruiz-Moreno, H.A.; Zapata-Bedoya, S.; Franco-Munoz, C.; Laiton-Donato, K.; Ferro, C.; Sepulveda, M.T.H.; Pacheco-Montealegre, M.; Walteros, D.M.; Carrero-Galindo, L.C.; et al. Clinical outcomes associated with Mu variant infection during the third epidemic peak of COVID-19 in Colombia. *Int J Infect Dis* **2022**, *125*, 149-152, doi:10.1016/j.ijid.2022.10.028.
75. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. Available online: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (accessed on Dec 25, 2022).
76. Faria, N.R.; Mellan, T.A.; Whittaker, C.; Claro, I.M.; Candido, D.D.S.; Mishra, S.; Crispim, M.A.E.; Sales, F.C.S.; Hawryluk, I.; McCrone, J.T.; et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **2021**, *372*, 815-821, doi:10.1126/science.abh2644.
77. Mlcochova, P.; Kemp, S.A.; Dhar, M.S.; Papa, G.; Meng, B.; Ferreira, I.; Datir, R.; Collier, D.A.; Albecka, A.; Singh, S.; et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* **2021**, *599*, 114-119, doi:10.1038/s41586-021-03944-y.
78. Planas, D.; Veyer, D.; Baidaliuk, A.; Staropoli, I.; Guivel-Benhassine, F.; Rajah, M.M.; Planchais, C.; Porrot, F.; Robillard, N.; Puech, J.; et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* **2021**, *596*, 276-280, doi:10.1038/s41586-021-03777-9.
79. Dhawan, M.; Sharma, A.; Priyanka; Thakur, N.; Rajkhowa, T.K.; Choudhary, O.P. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother* **2022**, *18*, 2068883, doi:10.1080/21645515.2022.2068883.
80. O'Toole, A., E. Scher, and A. Rambaut. Lineage List. Available online: https://cov-lineages.org/lineage_list.html (accessed on Dec 27, 2022).
81. Araf, Y.; Akter, F.; Tang, Y.D.; Fatemi, R.; Parvez, M.S.A.; Zheng, C.; Hossain, M.G. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol* **2022**, *94*, 1825-1832, doi:10.1002/jmv.27588.
82. Gangavarapu, K.; Latif, A.; Mullen, J.; Alkuzweny, M.; Hufbauer, E.; Tsueng, G.; Haag, E.; Zeller, M.; Aceves, C.; Zaiets, K.; et al. Omicron Variant Report Available online: <https://outbreak.info/situation-reports/Omicron?xmin=2022-06-27&xmax=2022-12-27> (accessed on 27 December 2022.).

83. Alvarez-Diaz, D.A.; Laiton-Donato, K.; Torres-Garcia, O.A.; Ruiz-Moreno, H.A.; Franco-Munoz, C.; Beltran, M.A.; Mercado-Reyes, M.; Rueda, M.G.; Munoz, A.L. Reduced levels of convalescent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 B.1+L249S+E484K lineage. *Virus Res* **2022**, *308*, 198629, doi:10.1016/j.virusres.2021.198629.
84. Alvarez-Diaz, D.A.; Munoz, A.L.; Herrera-Sepulveda, M.T.; Tavera-Rodriguez, P.; Laiton-Donato, K.; Franco-Munoz, C.; Ruiz-Moreno, H.A.; Galindo, M.; Catama, J.D.; Bermudez-Forero, A.; et al. Neutralizing Antibody Responses Elicited by Inactivated Whole Virus and Genetic Vaccines against Dominant SARS-CoV-2 Variants during the Four Epidemic Peaks of COVID-19 in Colombia. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, doi:10.3390/vaccines10122144.
85. Alvarez-Diaz, D.A.; Munoz, A.L.; Tavera-Rodriguez, P.; Herrera-Sepulveda, M.T.; Ruiz-Moreno, H.A.; Laiton-Donato, K.; Franco-Munoz, C.; Pelaez-Carvajal, D.; Cuellar, D.; Munoz-Suarez, A.M.; et al. Low Neutralizing Antibody Titers against the Mu Variant of SARS-CoV-2 in 31 BNT162b2 Vaccinated Individuals in Colombia. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, doi:10.3390/vaccines10020180.
86. Gdoura, M.; Abouda, I.; Mrad, M.; Ben Dhifallah, I.; Belaiba, Z.; Fares, W.; Chouikha, A.; Khedhiri, M.; Layouni, K.; Touzi, H.; et al. SARS-CoV2 RT-PCR assays: In vitro comparison of 4 WHO approved protocols on clinical specimens and its implications for real laboratory practice through variant emergence. *Virology Journal* **2022**, *19*, 54, doi:10.1186/s12985-022-01784-4.
87. Razu, M.H.; Ahmed, Z.B.; Hossain, M.I.; Rabbi, M.F.A.; Nayem, M.R.; Hassan, M.A.; Paul, G.K.; Khan, M.R.; Moniruzzaman, M.; Karmaker, P.; et al. Performance Evaluation of Developed Bangasore Multiplex rRT-PCR Assay for SARS-CoV-2 Detection in Bangladesh: A Blinded Observational Study at Two Different Sites. *Diagnostics (Basel)* **2022**, *12*, doi:10.3390/diagnostics12112617.
88. Fu, J.Y.L.; Chong, Y.M.; Sam, I.C.; Chan, Y.F. SARS-CoV-2 multiplex RT-PCR to detect variants of concern (VOCs) in Malaysia, between January to May 2021. *J Virol Methods* **2022**, *301*, 114462, doi:10.1016/j.jviromet.2022.114462.
89. Ng, W.H.; Tipih, T.; Makoah, N.A.; Vermeulen, J.G.; Goedhals, D.; Sempa, J.B.; Burt, F.J.; Taylor, A.; Mahalingam, S. Comorbidities in SARS-CoV-2 Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis. *mBio* **2021**, *12*, doi:10.1128/mBio.03647-20.
90. Padilla-Rojas, C.; Jimenez-Vasquez, V.; Hurtado, V.; Mestanza, O.; Molina, I.S.; Barcena, L.; Morales Ruiz, S.; Acedo, S.; Lizarraga, W.; Bailon, H.; et al. Genomic analysis reveals a rapid spread and predominance of lambda (C.37) SARS-COV-2 lineage in Peru despite circulation of variants of concern. *J Med Virol* **2021**, *93*, 6845-6849, doi:10.1002/jmv.27261.
91. Yang, Y.; Du, L. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 95, doi:10.1038/s41392-021-00523-5.
92. Jangra, S.; Ye, C.; Rathnasinghe, R.; Stadlbauer, D.; Personalized Virology Initiative study, g.; Krammer, F.; Simon, V.; Martinez-Sobrido, L.; Garcia-Sastre, A.; Schotsaert, M. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *Lancet Microbe* **2021**, *2*, e283-e284, doi:10.1016/S2666-5247(21)00068-9.
93. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M.M.; Bishop, E.; et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med* **2021**, *27*, 917-924, doi:10.1038/s41591-021-01318-5.
94. Annavajhala, M.K.; Mohri, H.; Wang, P.; Nair, M.; Zucker, J.E.; Sheng, Z.; Gomez-Simmonds, A.; Kelley, A.L.; Tagliavia, M.; Huang, Y.; et al. Emergence and expansion of SARS-CoV-2 B.1.526 after identification in New York. *Nature* **2021**, *597*, 703-708, doi:10.1038/s41586-021-03908-2.

95. McCallum, M.; Bassi, J.; De Marco, A.; Chen, A.; Walls, A.C.; Di Iulio, J.; Tortorici, M.A.; Navarro, M.J.; Silacci-Fregni, C.; Saliba, C.; et al. SARS-CoV-2 immune evasion by the B.1.427/B.1.429 variant of concern. *Science* **2021**, *373*, 648-654, doi:10.1126/science.abi7994.
96. Malli, F.; Lampropoulos, I.C.; Papagiannis, D.; Papathanasiou, I.V.; Daniil, Z.; Gourgoulianis, K.I. Association of SARS-CoV-2 Vaccinations with SARS-CoV-2 Infections, ICU Admissions and Deaths in Greece. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, doi:10.3390/vaccines10020337.
97. Hasan, T.; Beardsley, J.; Marais, B.J.; Nguyen, T.A.; Fox, G.J. The Implementation of Mass-Vaccination against SARS-CoV-2: A Systematic Review of Existing Strategies and Guidelines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*, doi:10.3390/vaccines9040326.
98. Bian, L.; Liu, J.; Gao, F.; Gao, Q.; He, Q.; Mao, Q.; Wu, X.; Xu, M.; Liang, Z. Research progress on vaccine efficacy against SARS-CoV-2 variants of concern. *Hum Vaccin Immunother* **2022**, *18*, 2057161, doi:10.1080/21645515.2022.2057161.
99. Minsalud. Dosis aplicadas contra COVID-19. Available online: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoIbThmZTJmZWYtOWFhMy00OGE1LWFiNDAtMTJmYjMONDA5NGY2IiwidCI6ImJmYjdIMTNhLTdmYjctNDAXNi04MzBjLWQzNzE2ZThkZDhiOCJ9> (accessed on July 14, 2022).
100. Lopera, T.J.; Chvatal-Medina, M.; Florez-Alvarez, L.; Zapata-Cardona, M.I.; Taborda, N.A.; Rugeles, M.T.; Hernandez, J.C. Humoral Response to BNT162b2 Vaccine Against SARS-CoV-2 Variants Decays After Six Months. *Front Immunol* **2022**, *13*, 879036, doi:10.3389/fimmu.2022.879036.
101. Yu, J.; Collier, A.Y.; Rowe, M.; Mardas, F.; Ventura, J.D.; Wan, H.; Miller, J.; Powers, O.; Chung, B.; Siamatu, M.; et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 Variants. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 1579-1580, doi:10.1056/NEJMc2201849.
102. Ou, J.; Lan, W.; Wu, X.; Zhao, T.; Duan, B.; Yang, P.; Ren, Y.; Quan, L.; Zhao, W.; Seto, D.; et al. Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Signal Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 138, doi:10.1038/s41392-022-00992-2.
103. Magazine, N.; Zhang, T.; Wu, Y.; McGee, M.C.; Veggiani, G.; Huang, W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses* **2022**, *14*, doi:10.3390/v14030640.
104. Fratev, F. R346K Mutation in the Mu Variant of SARS-CoV-2 Alters the Interactions with Monoclonal Antibodies from Class 2: A Free Energy Perturbation Study. *J Chem Inf Model* **2022**, *62*, 627-631, doi:10.1021/acs.jcim.1c01243.
105. Koyama, T.; Miyakawa, K.; Tokumasu, R.; S, S.J.; Kudo, M.; Ryo, A. Evasion of vaccine-induced humoral immunity by emerging sub-variants of SARS-CoV-2. *Future Microbiol* **2022**, *17*, 417-424, doi:10.2217/fmb-2022-0025.
106. McLean, G.; Kamil, J.; Lee, B.; Moore, P.; Schulz, T.F.; Muik, A.; Sahin, U.; Tureci, O.; Pather, S. The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. *mBio* **2022**, *13*, e0297921, doi:10.1128/mbio.02979-21.
107. Muttineni, R.; R, N.B.; Putty, K.; Marapakala, K.; K, P.S.; Panyam, J.; Vemula, A.; Singh, S.M.; Balachandran, S.; S, T.V.; et al. SARS-CoV-2 variants and spike mutations involved in second wave of COVID-19 pandemic in India. *Transbound Emerg Dis* **2022**, *69*, e1721-e1733, doi:10.1111/tbed.14508.
108. Di Giacomo, S.; Mercatelli, D.; Rakhimov, A.; Giorgi, F.M. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virol* **2021**, *93*, 5638-5643, doi:10.1002/jmv.27062.

109. Andrews, N.; Stowe, J.; Kirsebom, F.; Toffa, S.; Rickeard, T.; Gallagher, E.; Gower, C.; Kall, M.; Groves, N.; O'Connell, A.M.; et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med* **2022**, *386*, 1532-1546, doi:10.1056/NEJMoa2119451.
110. Barros-Martins, J.; Hammerschmidt, S.I.; Cossmann, A.; Odak, I.; Stankov, M.V.; Morillas Ramos, G.; Dopfer-Jablonka, A.; Heidemann, A.; Ritter, C.; Friedrichsen, M.; et al. Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Nat Med* **2021**, *27*, 1525-1529, doi:10.1038/s41591-021-01449-9.
111. Deng, J.; Ma, Y.; Liu, Q.; Du, M.; Liu, M.; Liu, J. Comparison of the Effectiveness and Safety of Heterologous Booster Doses with Homologous Booster Doses for SARS-CoV-2 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health* **2022**, *19*, doi:10.3390/ijerph191710752.
112. Ntziora, F.; Kostaki, E.G.; Karapanou, A.; Mylona, M.; Tseti, I.; Sipsas, N.V.; Paraskevis, D.; Sfrikakis, P.P. Protection of vaccination versus hybrid immunity against infection with COVID-19 Omicron variants among Health-Care Workers. *Vaccine* **2022**, *40*, 7195-7200, doi:10.1016/j.vaccine.2022.09.042.
113. Ho-Yan Fong, C.; Zhang, X.; Chen, L.L.; Wing-Shan Poon, R.; Pui-Chun Chan, B.; Zhao, Y.; King-Ho Wong, C.; Chan, K.H.; Yuen, K.Y.; Fan-Ngai Hung, I.; et al. Effect of vaccine booster, vaccine type, and hybrid immunity on humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2 ancestral strain and Omicron variant sublineages BA.2 and BA.5 among older adults with comorbidities: a cross sectional study. *EBioMedicine* **2023**, *88*, 104446, doi:10.1016/j.ebiom.2023.104446.
114. Cervantes-Luevano, K.; Espino-Vazquez, A.N.; Flores-Acosta, G.; Bernaldez-Sarabia, J.; Cabanillas-Bernal, O.; Gasperin-Bulbarela, J.; Gonzalez-Sanchez, R.; Comas-Garcia, A.; Licea-Navarro, A.F. Neutralizing antibodies levels are increased in individuals with heterologous vaccination and hybrid immunity with Ad5-nCoV in the north of Mexico. *PLoS One* **2022**, *17*, e0269032, doi:10.1371/journal.pone.0269032.
115. Tai, W.; He, L.; Zhang, X.; Pu, J.; Voronin, D.; Jiang, S.; Zhou, Y.; Du, L. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17*, 613-620, doi:10.1038/s41423-020-0400-4.
116. Alaofi, A.L.; Shahid, M. Mutations of SARS-CoV-2 RBD May Alter Its Molecular Structure to Improve Its Infection Efficiency. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11091273.
117. Hernandez-Luis, P.; Aguilar, R.; Pelegrin-Perez, J.; Ruiz-Olalla, G.; Garcia-Basteiro, A.L.; Tortajada, M.; Moncunill, G.; Dobano, C.; Angulo, A.; Engel, P. Decreased and Heterogeneous Neutralizing Antibody Responses Against RBD of SARS-CoV-2 Variants After mRNA Vaccination. *Front Immunol* **2022**, *13*, 816389, doi:10.3389/fimmu.2022.816389.
118. Liu, S.; Jia, Z.; Nie, J.; Liang, Z.; Xie, J.; Wang, L.; Zhang, L.; Wang, X.; Wang, Y.; Huang, W. A broader neutralizing antibody against all the current VOCs and VOIs targets unique epitope of SARS-CoV-2 RBD. *Cell Discovery* **2022**, *8*, 81, doi:10.1038/s41421-022-00443-w.
119. Starr, T.N.; Czudnochowski, N.; Liu, Z.; Zatta, F.; Park, Y.-J.; Addetia, A.; Pinto, D.; Beltramello, M.; Hernandez, P.; Greaney, A.J.; et al. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. *Nature* **2021**, *597*, 97-102, doi:10.1038/s41586-021-03807-6.
120. Speletas, M.; Voulgaridi, I.; Sarrou, S.; Dadouli, A.; Mouchtouri, V.A.; Nikoulis, D.J.; Tsakona, M.; Kyritsi, M.A.; Peristeri, A.M.; Avakian, I.; et al. Intensity and Dynamics of Anti-

- SARS-CoV-2 Immune Responses after BNT162b2 mRNA Vaccination: Implications for Public Health Vaccination Strategies. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, doi:10.3390/vaccines10020316.
121. Lau, E.H.Y.; Tsang, O.T.Y.; Hui, D.S.C.; Kwan, M.Y.W.; Chan, W.H.; Chiu, S.S.; Ko, R.L.W.; Chan, K.H.; Cheng, S.M.S.; Perera, R.; et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* **2021**, *12*, 63, doi:10.1038/s41467-020-20247-4.
122. Gharbharan, A.; Jordans, C.C.E.; GeurtsvanKessel, C.; den Hollander, J.G.; Karim, F.; Mollema, F.P.N.; Stalenhoef-Schukken, J.E.; Dofferhoff, A.; Ludwig, I.; Koster, A.; et al. Effects of potent neutralizing antibodies from convalescent plasma in patients hospitalized for severe SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* **2021**, *12*, 3189, doi:10.1038/s41467-021-23469-2.
123. Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **2022**, *23*, 186-193, doi:10.1038/s41590-021-01122-w.
124. Bertoletti, A.; Le Bert, N.; Tan, A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity* **2022**, *55*, 1764-1778, doi:10.1016/j.immuni.2022.08.008.