





**Universidad Miguel Hernández de Elche**

**Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas**

**TESIS DOCTORAL**

**Determinantes de seroconversión, aclaramiento viral y  
cinética de la inmunidad humoral en pacientes con  
infección por SARS-CoV-2**

Realizada por:

**GUILLERMO TELENTI RODRIGUEZ**

**Director de la Tesis:**

**DR. FÉLIX GUTIÉRREZ RODERO**

**Codirectora de la Tesis:**

**DRA. MAR MASIÁ CANUTO**





La presente Tesis Doctoral con título “DETERMINANTES DE SEROCONVERSIÓN, ACLARAMIENTO VIRAL Y CINÉTICA DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR SARS-COV-2” se presenta en modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas indexadas:

- Masiá M, Telenti G, Fernández M, García JA, Agulló V, Padilla S, García-Abellán J, Guillén L, Mascarell P, Asenjo JC, Gutiérrez F. SARS-CoV-2 Seroconversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized With COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response. *Open Forum Infect Dis.* 2021 Jan 5;8(2):ofab005. doi: 10.1093/ofid/ofab005. PMID: 33614814; PMCID: PMC7881755.
- Masiá M, Fernández-González M, Telenti G, Agulló V, García JA, Padilla S, García-Abellán J, Galiana A, Gonzalo-Jiménez N, Gutiérrez F. Durable antibody response one year after hospitalization for COVID-19: A longitudinal cohort study. *J Autoimmun.* 2021 Sep;123:102703. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102703. Epub 2021 Jul 20. PMID: 34303083; PMCID: PMC8289631.





El Dr. D. Félix Gutiérrez Rodero, director y la Dra. Dña. *Mar Masía Canuto*, codirectora de la tesis doctoral titulada **“DETERMINANTES DE SEROCONVERSIÓN, ACLARAMIENTO VIRAL Y CINÉTICA DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR SARS-COV-2”**

**INFORMA/N:**

Que D. *Guillermo Telenti Rodríguez* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“DETERMINANTES DE SEROCONVERSIÓN, ACLARAMIENTO VIRAL Y CINÉTICA DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR SARS-COV-2”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo/firmamos para los efectos oportunos, en Elche a 24 de Abril de 2023

Director/a de la tesis  
Dr. D. *Félix Gutiérrez Rodero*

Codirector/a de la tesis  
Dra. Dña. *Mar Masía Canuto*





La Dra. Dña. *Mar Masía Canuto*, Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

**INFORMA:**

Que D. *Guillermo Telenti Rodríguez* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“DETERMINANTES DE SEROCONVERSIÓN, ACLARAMIENTO VIRAL Y CINÉTICA DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR SARS-COV-2”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a 24 de Abril de 2023.

Profa. Dra. Dña. *Mar Masía Canuto*

Coordinador/a del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



## **FINANCIACIÓN**

Los fondos empleados para el desarrollo de la investigación provienen de las siguientes fuentes de financiación:

- RD16/0025/0038/Instituto de Salud Carlos III
- PI16/01740/Instituto de Salud Carlos III
- PI18/01861/Instituto de Salud Carlos III
- CM19/00160/Instituto de Salud Carlos III
- COV20/00156/Instituto de Salud Carlos III





## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis doctoral no constituye un mérito personal, sino colectivo. Además del conocimiento que se pueda extraer de ella, se ve reflejado el trabajo de las personas que constituyen el equipo del Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas y VIH/SIDA del Hospital General Universitario de Elche, sin las que este trabajo no habría sido posible. Por ello quiero agradecer:

A mi director de tesis el Dr. Félix Gutiérrez por haber apostado por mí, por haberme transmitido su pasión por la investigación, ejemplo de constancia y esfuerzo en el ejercicio de la medicina y por guiarme en un camino nuevo para mí.

A mi codirectora de tesis la Dra. Mar Masiá por confiar en mi en este proyecto, por su voluntad inquebrantable en la enseñanza, por su apoyo constante, y por sus orientaciones indispensables para este trabajo

A todo el equipo del Grupo de investigación, por dedicar su tiempo y esfuerzo al desarrollo de este trabajo, sin sus pasos previos y sus consejos y sus recomendaciones, no habría conseguido llegar al final de este camino. Por haber mantenido la compostura y el sacrificio en los momentos más duros de la pandemia, un pequeño grano de arena que sin lugar a dudas ha supuesto una gran diferencia en la salud de muchas personas.

A mi familia, por inculcarme los valores de los que ahora dispongo, por despertar en mí el amor por la medicina, y por estar ahí incondicionalmente.

A la Dra. Guillén, amiga, ejemplo de solidaridad y de amor por lo que hace, fiel apoyo en este trabajo y sobre todo en mi día a día.

Y a Lucía, mi compañera de vida.



<b>RESUMEN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
1.1.1    Generalidades .....	21
1.1.2    Barreras naturales y respuesta inmune innata.....	25
1.1.3    Respuesta inmune adaptativa.....	36
1.1.4    Respuesta inmune desregulada. Síndrome de tormenta citocínica.....	45
<b>2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>3 HIPÓTESIS .....</b>	<b>53</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5 METODOLOGÍA.....</b>	<b>61</b>
5.1.1    Diseño .....	63
5.1.2    Sujetos del estudio .....	63
5.1.3    Criterios de inclusión.....	63
5.1.4    Criterios de exclusión .....	64
5.1.5    Protocolo .....	64
5.1.6    Análisis estadístico .....	67
5.1.7    Periodo de estudio .....	67
5.1.8    Variables.....	68
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
6.1.1    Características basales de los pacientes.....	75
6.1.2    Predictores del tiempo hasta la seropositividad .....	80
6.1.3    Predictores de la intensidad de la respuesta de los anticuerpos .....	85
6.1.4    Predictores de no seroconversión .....	86
6.1.5    Pacientes con seguimiento a 12 meses.....	91
6.1.6    Tiempo hasta serorreversión.....	94
<b>7 DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>8 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>107</b>
<b>9 FORTALEZAS.....</b>	<b>111</b>
<b>10 CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>11 TRABAJOS PUBLICADOS.....</b>	<b>119</b>
<b>12 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>
<b>13 ANEXO I:.....</b>	<b>157</b>



## RESUMEN

---

Antecedentes: La relación entre la replicación viral del SARS-CoV-2 y la respuesta inmunitaria del huésped, así como su duración en pacientes con la COVID-19 aún no están bien definidas. Investigamos los determinantes virales de la respuesta de anticuerpos, los predictores de la no seroconversión y el papel de los anticuerpos en la dinámica viral en el momento de la infección, así como la respuesta de anticuerpos y sus predictores de disminución y de serorreversión a los 12 meses tras la enfermedad.

Métodos: Estudio prospectivo realizado en pacientes hospitalizados con COVID-19 que fue confirmado microbiológicamente por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Se obtuvieron hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos seriados y muestras de plasma para medir ARN viral y anticuerpos (total y S-IgG/N-IgG) durante la hospitalización, respectivamente. Además, se obtuvieron muestras de sangre y nasofaríngeas de forma secuencial a los 1, 2, 6 y 12 meses tras el alta de los pacientes para medir los niveles de anticuerpos S-IgG y N-IgG, así como el ARN del SARS-CoV-2, respectivamente.

Resultados. De los 132 pacientes incluidos, 99 (75%) mostraron títulos de anticuerpos positivos tras una mediana (Q1-Q3) de 11 (8-14) días. La mediana (Q1-Q3) de seguimiento fue de 74,5 (63,0-87,0) días. En un modelo de regresión lineal ajustado, el tiempo hasta la seropositividad se asoció inversamente con el logaritmo del pico de carga viral del SRAS-CoV-2 ( $p = 0,009$ ) y positivamente con el tiempo de eliminación del virus ( $p = 0,004$ ). Los predictores ajustados de los niveles de S-IgG

fueron el tiempo hasta la eliminación del virus ( $P < 0,001$ ), los infiltrados pulmonares bilaterales en el momento del ingreso ( $P = 0,011$ ) y el ARN del SARS-CoV-2 dependiente del tiempo ( $P < 0,002$ ) así como el área bajo la curva del ARN del SRAS-CoV-2 ( $P = 0,001$ ). Treinta y tres (25%) pacientes mostraron títulos de anticuerpos indetectables. Estos pacientes tenían valores de umbral de ciclo de la RT-PCR más altos (38,0 frente a 28,0;  $P < 0,001$ ), un tiempo más corto hasta la eliminación del virus (3,0 frente a 41,0;  $P < 0,001$ ) y más probabilidades de que el virus se detectara únicamente en muestras fecales ( $P < 0,001$ ), así como niveles más bajos de biomarcadores inflamatorios en sangre al ingreso y una menor gravedad de la enfermedad. Posteriormente estudiamos longitudinalmente a 80 pacientes no vacunados. Al año del alta hospitalaria, 73 (91,2%) presentaban títulos detectables de S-IgG y 35 (43,8%) de N-IgG. Se observó una disminución gradual de los títulos de anticuerpos S-IgG y N-IgG. La regresión lineal mostró que la disminución de S-IgG estaba positivamente asociada con los títulos máximos de anticuerpos (coeficiente [IC 95%] 0,059 [0,05-0,067],  $p < 0,001$ ), e inversamente con la puntuación de gravedad de la OMS (coeficiente [IC 95%] -0,042 [-0,079/-0,004],  $p = 0,033$ ), y hubo una asociación positiva trivial con la edad (coeficiente [IC 95%] 0,002 [0-0,005],  $p = 0,10$ ); el descenso de N-IgG se asoció positivamente con los títulos máximos de anticuerpos (coeficiente [IC 95%] 0,091 [0,078-0,105],  $p < 0,001$ ). La regresión logística mostró que la seroreversión para la S-IgG estaba inversamente asociada con el pico de S-IgG (OR 0,19; IC del 95%, 0,04-0,45;  $p = 0,004$ ); la seroreversión para la N-IgG estaba inversamente asociada con el pico de N-IgG (OR 0,71; IC del 95%, 0,53-0,90;  $p = 0,009$ ) y positivamente con el umbral de ciclo de la RT-PCR (OR 1,14; IC del 95%, 1,00-1,33;  $p = 0,062$ ).

**Conclusiones.** La replicación viral determina la magnitud de la respuesta de los anticuerpos al SARS-CoV-2, que, a su vez, contribuye a la eliminación del virus. Los pacientes con COVID-19 que no seroconvierten presentan un perfil virológico y clínico diferencial. Los anticuerpos S-IgG continúan siendo detectables un año después de la hospitalización por COVID-19. Títulos máximos de anticuerpos más

elevados y la gravedad de la enfermedad se asociaron con una mayor durabilidad de los anticuerpos.







# **1.INTRODUCCIÓN**

---



# 1.INTRODUCCION

---

## 1.1.1 Generalidades

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2) es un virus ARN de cadena positiva simple causante de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) (1). La COVID-19 se ha convertido en una pandemia que rápidamente se ha extendido provocando más de 6 millones de muertes en todo el mundo entre diciembre de 2019 y octubre de 2022(2) así como una importante morbilidad. Esta facilidad para la propagación y la importante tasa de fallecimientos llevó a la Organización Mundial de la Salud a declarar la COVID-19 como una Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional el 30 de enero de 2020.

El SARS-CoV2 forma parte de la familia coronaviridae(3), que se dividen en coronavirus alfa ( $\alpha$ -CoV), beta ( $\beta$ -CoV), gamma ( $\gamma$ -CoV) y delta ( $\delta$ -CoV). Los coronavirus alfa y beta pueden infectar a los mamíferos, y los virus de esta familia encontrados en humanos son genéticamente similares al género  $\beta$ -CoV. Los  $\beta$ -CoV se dividen además en diferentes linajes que se nominan de la A a la D, agrupándose el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 en el linaje B, mientras que el MERS-CoV se incluye en el linaje C(4).

Estos virus causan infecciones respiratorias, gastrointestinales y neurológicasl en humanos y animales. Incluido el SARS-CoV-2, otros coronavirus procedentes de animales han sido capaces de transmitirse al ser humano, provocando cuadros

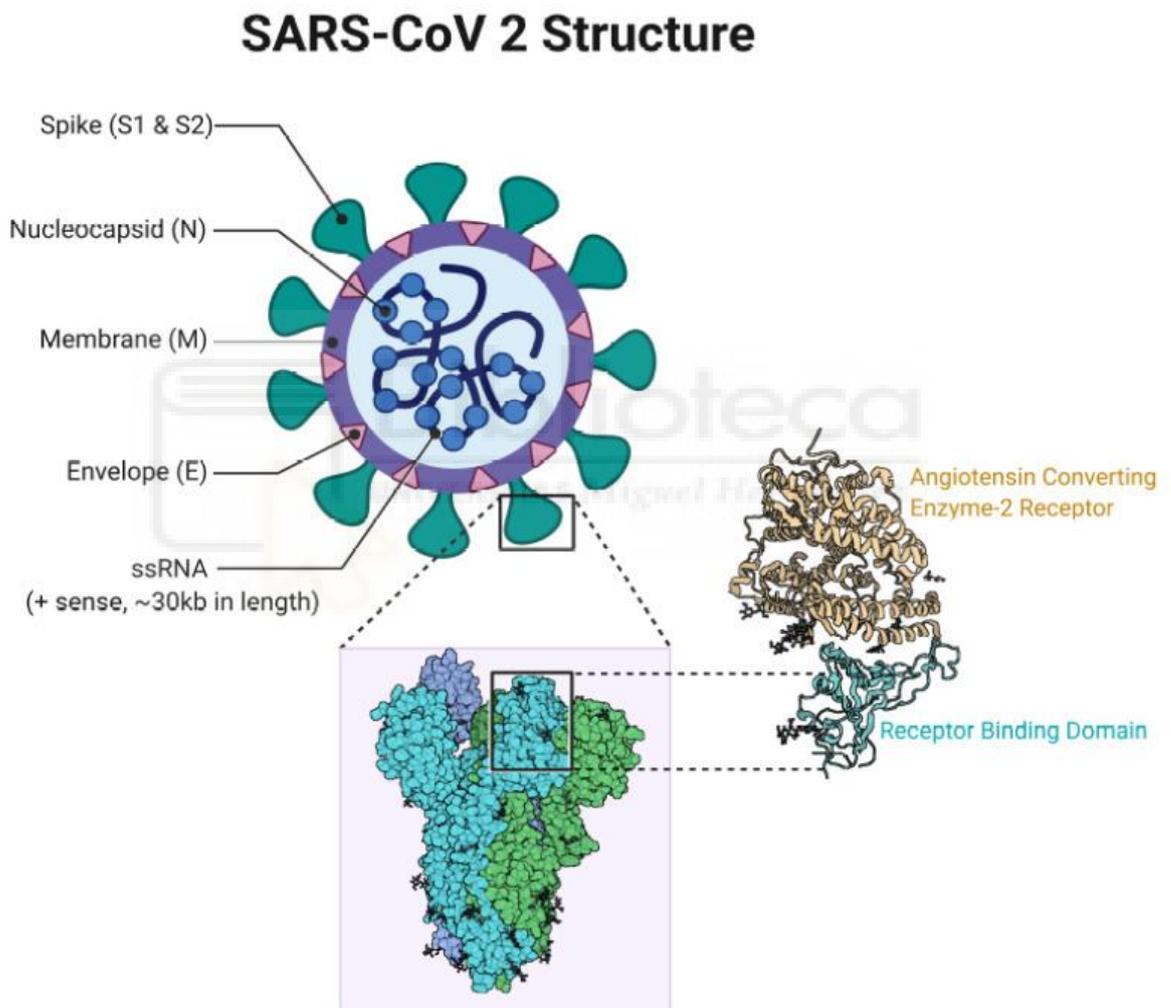
infecciosos previamente no conocidos. Por ejemplo, el SARS-CoV conocido en murciélagos, fue detectado por primera vez en humanos en 2003, tras la infección por animales en mercados callejeros en China(5,6).

Entre los coronavirus que afectan al ser humano encontramos los HCoV-229E y HCoV-NL63 que pertenecen al género *Alphacoronavirus*; y los HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y SARS-CoV que pertenecen al género *Betacoronavirus*(7,8). El análisis filogenético muestra que la proteína spike del SARS-CoV-2 se encuentra fuertemente relacionada con el género  $\beta$  de los coronavirus de murciélago(9). Se ha demostrado que algunos de los genes del SARS-CoV-2 comparten menos del 80 % de la secuencia de nucleótidos con el SARS-CoV. No obstante, las secuencias de aminoácidos de los siete dominios de la replicasa conservados en ORF1ab que se usaron para la clasificación de especies de CoV fueron idénticas en un 94,4 % entre el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV, lo que sugiere que los dos virus pertenecen a la misma especie. Por otra parte, se ha descrito una concordancia del 96,2% entre la secuencia genómica del SARS-CoV-2 y la de un coronavirus del murciélago(1,10).

#### **1.1.1.1 Estructura**

La similitud de secuencia entre la proteína de la espícula (conocida también como proteína spike o S) del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV explica la posibilidad de unirse al mismo receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la célula huésped(9). La endocitosis mediada por receptores en este caso el receptor ACE2, es la principal forma de entrada del SARS-CoV-2 en las células huésped. Este receptor está presente en el corazón, el riñón, el endotelio vascular y en las células epiteliales de tipo dos del alveolo pulmonar (AT2). La proteína de la espícula, responsable de la entrada viral, tiene dominios N-terminal y C-terminal, y dos subunidades principales S1 y S2, presentes en casi todos los coronavirus. Una de estas subunidades S1 o S2 se une a los receptores del huésped y actúa como un dominio de unión al receptor (RBD) (figura 1).

Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2



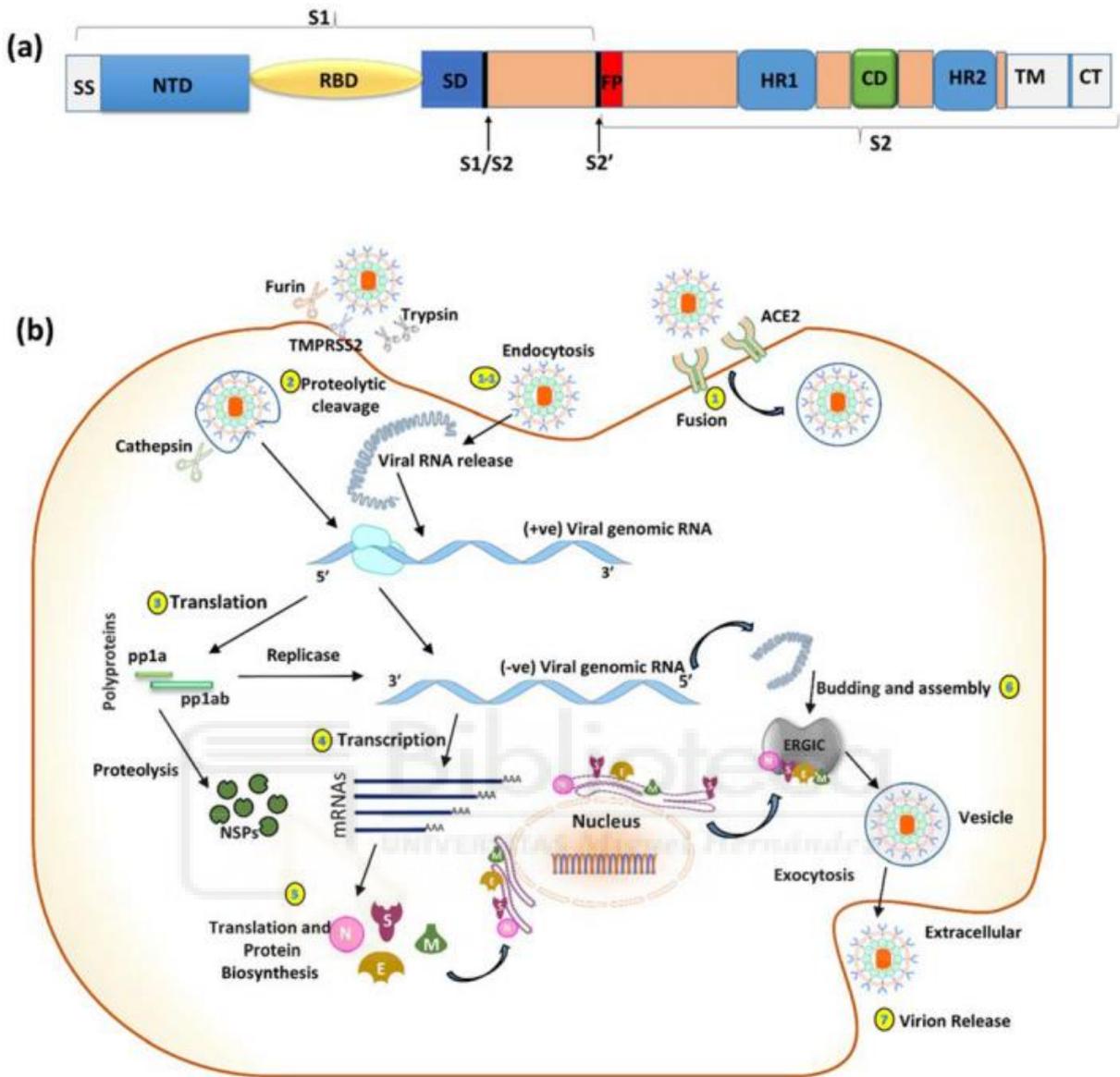
\*Tomado de Treasure Island; 2022 Jan-. Contributed by Rohan Bir Singh, MD; Made with Biorender.com

### **1.1.1.2 Entrada en la célula huésped y replicación del SARS-CoV-2**

La infección por SARS-CoV-2 comienza con la unión de la proteína spike al receptor ACE2 y el proceso de invasión lo desencadenan las proteasas de la célula huésped (figura 2). El SARS-CoV-2 libera el ARN en la célula huésped, produciendo proteínas de replicasa viral para posteriormente escindirse en proteínas no estructurales. Las copias de ARN del genoma viral son también producidas por la replicasa utilizando el genoma de ARN de cadena positiva como plantilla. Durante la transcripción, la ARN polimerasa produce una serie de ARN mensajeros que se traducen en las distintas proteínas que van a conformar el virus: S (espiga), E (envoltura), N (nucleocápside) y M (membrana). Las proteínas virales y el ARN del genoma se unen en forma de viriones en el complejo de Golgi y en el retículo endoplásmico y una vez liberadas y continúan infectando nuevas células, repitiendo el proceso que finalizará con la recuperación o la muerte del individuo(11).



**Figura 2. Endocitosis y replicación viral.**



\* Tomada de Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*. 2021 Apr;49(2):199-213.

### 1.1.2 Barreras naturales y respuesta inmune innata

El sistema respiratorio se comporta como una barrera física eficiente para numerosos microorganismos y otras sustancias potencialmente perjudiciales. Entre estas estructuras protectoras encontramos los velos nasales, las estructuras mucociliares y la barrera epitelial. No obstante, estas estructuras pueden ser

eludidas y los patógenos alcanzar el alveólo pulmonar donde entra en acción la respuesta inmune innata. Esta respuesta posee mecanismos complejos que se activan previamente a la inmunidad adaptativa, eliminando agentes extraños y manteniendo la integridad tisular(12).

#### **1.1.2.1 Macrófagos alveolares**

Los macrófagos alveolares son células del sistema inmune presentes en el espacio alveolar constituyendo la primera línea de defensa, encargándose de la vigilancia de las vías respiratorias, del mantenimiento estructural y de la integridad funcional de las mismas(13–15). Su origen es durante el desarrollo fetal, y su situación anatómica es adyacente a los neumocitos tipo 2. Entre las diversas funciones que realizan encontramos mantener el alveolo pulmonar libre de partículas, células en apoptosis y exceso de surfactante pulmonar(16–18); coordinar la respuesta inmune pulmonar al inicio de una infección(19,20); eliminar de forma directa microorganismos mediante producción de radicales, fagocitosis u apoptosis(19,20); y regular la respuesta inflamatoria con procesos de reparación y regeneración del tejido pulmonar(19,21).

Al entrar el virus en contacto con el epitelio pulmonar, las células del alveolo pulmonar van a ser destruidas debido a la replicación viral(22). Los macrófagos van a ser activados debido a la estimulación por el SARS-CoV-2 o por las células infectadas por el mismo que se encuentran próximas a dichos macrófagos, dando lugar a una rápida liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la IL-8 que aumentando la permeabilidad del endotelio (22). De esta forma, las células infectadas activan el inflammasoma, son destruidas y secretan diversas interleucinas y factores de necrosis tumoral iniciando la inflamación y dando lugar a la activación de otras células pulmonares y a los macrófagos alveolares(23,24).

Tras la lisis celular las partículas virales son opsonizadas por anticuerpos para posteriormente ser introducidas en el macrófago mediante fagocitosis formando

fagolisosomas que van a ocuparse de degradar proteínas y presentar partículas virales para su reconocimiento y señalización. Una vez activados los macrófagos se va a producir una liberación de citoquinas y quimiocinas, que conduce al aumento de la permeabilidad vascular y la llegada de monocitos que posteriormente se van a transformar en neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, dando lugar a una amplificación de inflamación en un intento de contener al virus(22,24). En la mayor parte de los individuos con infección por SARS-CoV-2 dicho conjunto de mecanismos va a ser suficiente para eliminar la infección, disminuir la respuesta inflamatoria e iniciar la reparación.

Sin embargo, aproximadamente un tercio de los pacientes con infección por SARS-CoV-2 va a presentar neumonía grave(25). Esta gravedad se relaciona con un estado hiperinflamatorio que se conoce como «síndrome de liberación de citoquinas» o «tormenta de citoquinas». Este síndrome resulta de una activación de diferentes células inmunitarias que provoca una liberación descontrolada de citoquinas entre las que encontramos IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre las más importantes(22,23). Entre estas citoquinas se considera que la IL6 tiene un papel fundamental, dado que su incremento se correlaciona con el grado de severidad del cuadro clínico que presentan los pacientes(26). La elevación de citoquinas como la IL-1 $\beta$  y la IL-6 sugiere que los macrófagos son unos de los principales contribuyentes a este estado hiperinflamatorio. Esta tormenta citocínica se encuentra relacionada con el síndrome de activación macrofágica, una complicación potencialmente mortal de varias enfermedades autoinmunes relacionadas con la linfocitosis hemofagocítica, así como infecciones o neoplasias, caracterizado por producir en estos pacientes diversas alteraciones como leucopenia, hiperferritinemia, insuficiencia renal y hepática o trastornos de la coagulación, similar a lo que sucede en la infección por SARS-CoV-2 grave(27,28). Esta tormenta de citoquinas y el síndrome de activación macrofágica van a desencadenar un reclutamiento masivo de células inflamatorias al tejido pulmonar, y una liberación de citoquinas, proteasas, radicales libres y óxido nítrico que provocará un daño al epitelio y endotelio pulmonar, con afectación de las células alveolares y la salida de líquidos al espacio

endotelial lo que desemboca en un edema pulmonar(29), y por tanto desarrollando un síndrome de distrés respiratorio.

En los pacientes graves la fibrosis pulmonar que se desarrolla se asocia a un funcionamiento alterado de las diferentes poblaciones macrofágicas (M1 y M2)(14). Las poblaciones M1 se encuentran más presentes en el momento inicial de la infección viral, actuando sobre el virus, induciendo su destrucción e iniciando el proceso inflamatorio, mientras que las poblaciones M2 actúan predominantemente durante la fase resolutive de la infección y en la reparación posterior del endotelio dañado(30,31). En condiciones normales, tras haberse iniciado la fase inflamatoria por los macrófagos M1, estos se diferencian a M2 mediante la señal de citocinas antiinflamatorias, produciendo una disminución de la respuesta inflamatoria, y de la producción de citocinas proinflamatorias y comenzando la secreción de citocinas antiinflamatorias(32). Las poblaciones M2 se encargarán de reparar la matriz extracelular mediante la producción de colágenos, metaloproteinasas y factores proangiogénicos(33,34). No obstante, a pesar de las diferencias de las poblaciones macrofágicas, los M1 también pueden actuar en el proceso de reparación y cicatrización mediante la secreción de diversas citocinas y la capacidad de reclutación de fibrocitos que tras la evolución a fibroblastos pueden ayudar en la reparación de la matriz extracelular.

Las propiedades de curación de lesiones de los macrófagos tipo M1 pueden ser "patológicas" debido a la producción excesiva de mediadores inflamatorios como los interferones (INF), la IL-1 $\beta$  o la IL-6(35). Estas citocinas inflamatorias también pueden promover un cambio a fenotipo M2(36) y servir como freno a la activación de los macrófagos como mecanismo para proteger los tejidos de respuestas inmunitarias hiperactivas o desmesuradas(37). Además de inducir la secreción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos tipo M1, los patrones moleculares asociados a daño también promueven la secreción de IL-4 e IL-13, induciendo el paso del macrófago a fenotipo M2 con funciones de curación, proangiogénicas y profibróticas(38).

Por lo tanto, las funciones desequilibradas del macrófago tipo M1 crean un bucle retroalimentado de inflamación que desemboca en la tormenta de citocinas produciendo un daño tisular que, a su vez, aumenta la actividad de los macrófagos de tipo M2. Estos macrófagos inducen la proliferación y activación de fibroblastos con secreción de colágeno y componentes de la matriz, con la formación finalmente de tejido fibrótico.

### **1.1.2.2 Macrófagos reclutados**

Los macrófagos anteriormente mencionados que se encuentran presentes en el espacio pulmonar no representan la única población de estas células que está relacionada con la inmunidad innata. Una población de macrófagos que son producidos en la médula ósea y reclutados en el momento de la infección puede tener un papel indispensable en la inmunidad innata pulmonar. Tras la agresión por parte de un patógeno y en respuesta a la estimulación inflamatoria, la inducción de la quimiocina CCL2 actúa como señal para reclutar monocitos en los espacios aéreos, que posteriormente se especializan aumentando el grupo de macrófagos disponible(39,40).

Esta población de monocitos/macrófagos inflamatorios recién reclutados es funcionalmente similar a los macrófagos tipo M1 con capacidad para producir citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12(13,40). Además, se conoce que en la COVID-19 estos monocitos/macrófagos tienen un importante papel en la producción del síndrome de liberación de citocinas en el que están implicadas la IL-1 y la IL-6. Los pacientes con infección grave tienen características similares al síndrome de activación macrofágica, lo que podría explicar la evolución que presentan estos pacientes hacia el síndrome de distrés respiratorio (SDRA). Este, se asocia a alteraciones en la coagulación, así como a fenómenos trombóticos, que aparecen con frecuencia en estos pacientes(23). Además, la infección produce

alteraciones en el inflammasoma de los monocitos desencadenando piroptosis (41) y las modificaciones en los monocitos y macrófagos inducen un fenómeno de inmunoparálisis que favorece la progresión de COVID-19(42).

### **1.1.2.3 Neutrófilos**

Los neutrófilos son las primeras células y las que más rápidamente responden ante un estímulo infeccioso. Los mecanismos de reclutamiento en el momento de la infección son múltiples entre los que destaca la generación de quimiotaxis y haptotaxis mediante quimiocinas(19). Estas células tienen una vida corta, y su supervivencia se encuentra regulada por factores expresados durante el proceso inflamatorio(19). Actúan mediante varios mecanismos como son la fagocitosis; la desgranulación, con liberación por parte de los gránulos de factores tóxicos como mieloperoxidasa y otras proteínas antimicrobianas en el fagosoma y en el espacio extracelular; y mediante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que resultan de la extrusión de ADN asociado con histonas y proteínas derivadas de los gránulos(19). Además, los neutrófilos producen diversas sustancias como quimiocinas o citocinas que refuerzan la respuesta inicial a la infección, siendo un importante mecanismo de la defensa, aunque en ocasiones puede derivar en daño pulmonar(19,43)

Con respecto al papel de los neutrófilos en la infección por SARS-CoV-2, la proporción neutrófilo/linfocito es un factor asociado a la intubación orotraqueal y un factor independiente asociado al fallecimiento de estos pacientes en los días posteriores al ingreso (44). Los neutrófilos de los pacientes con infección por SARS-CoV-2 liberan una mayor cantidad de trampas extracelulares de neutrófilos y presentan una activación aumentada. Leepkes et al. observaron en la histología de pulmones de individuos fallecidos por COVID-19 congestión en la vascularización pulmonar por agregados de trampas extracelulares de neutrófilos y objetivaron que la formación de estos agregados aumenta la inmunopatología en la coagulopatía

intravascular pulmonar diseminada severa que se asocia a la COVID-19(45). Middleton et al. encontraron resultados similares donde la producción aumentada de trampas extracelulares de neutrófilos por parte de los neutrófilos contribuyó a la inmunotrombosis presente en la infección por SARS-CoV-2(46) .

#### **1.1.2.4 Linfocitos innatos**

Las células linfoides innatas (CLI) son un grupo de linfocitos con similitudes funcionales con los linfocitos B y T, innatos en lo que respecta al reconocimiento de patógenos(47). Este grupo a su vez se subdivide en tres grupos: las CLI1 y "Natural Killer" (NK), las CLI2 y las CLI3. La categorización de las CLI en tres grupos se basa en su capacidad para producir citocinas que reflejan las células linfoides adaptativas Th1, Th2 y Th17, sin embargo, las CLI están desprovistas de los marcadores de linaje conocidos asociados con las células T adaptativas y no son específicas de antígeno(48,49). Las CLI1, CLI2 e CLI3 tienen una función similar a las células CD4 + T helper (Th) 1, Th2 y Th17, mientras que las natural killer a la de las células T CD8 + (citotóxicas).

En cuanto a su función específica, las células CLI1 responden a patógenos intracelulares; las CLI2 a alérgenos y parásitos; y las células CLI3 a patógenos extracelulares(47). Además de las CLI, las células T no convencionales son otro grupo de linfocitos innatos que promueven la defensa pulmonar. Dentro de este grupo encontramos las células T invariantes, las células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT), las células T  $\gamma\delta$  y células T de memoria residente (T MR)(50). Estudios recientes señalan la relación entre las CLI y trastornos inmunitarios, así como con el fenómeno de reparación inmunológica(47,51).

La infección por SARS-CoV-2 produce alteraciones especialmente en las células NK afectando tanto en el número como en su función y favoreciendo una migración de estos linfocitos desde la sangre hacia el pulmón, donde contribuiría al proceso inflamatorio y a la lesión pulmonar. Durante la infección el recuento de células NK se reduce notablemente predominantemente en pacientes graves(52–54). Esto es consistente con hallazgos previos en el SARS-CoV1(55) y podría deberse al secuestro de NK en órganos diana, por ejemplo, el pulmón. De momento no parece claro si esta disminución se debe a la redistribución de células NK en los sitios infectados o a la muerte celular.

Una de las hipótesis propuesta por Zheng et al. es el agotamiento de las células T y NK(52). En su trabajo, los autores observan que un receptor del NK (NKG2A), que transduce la señalización inhibitoria y suprime la secreción de citocinas de células T y NK, se sobre expresa en pacientes con COVID-19 en comparación con pacientes sanos, mientras que el porcentaje de células T y NK que expresan marcadores de activación fue significativamente menor. Estos datos indican que los pacientes con COVID-19 grave tienen una respuesta inmunitaria innata gravemente comprometida, probablemente debido a un agotamiento funcional de las células T CD8 + y NK periféricas(52).

Por otra parte, la gravedad de la COVID-19 se relaciona con el porcentaje de las CLI, marcado por una caída de las células linfoides innatas circulantes y un predominio de las CLI2, encontrando una relación entre de los diferente subgrupos y las alteraciones bioquímicas relacionadas con la gravedad del cuadro(56). Además, los pacientes con infección por SARS-CoV-2 que precisan ingreso hospitalario presentan una mayor activación de células NK, acompañada de una desregulación en los subgrupos de NK asociada a una actividad citotóxica alterada(57).

#### **1.1.2.5 Plaquetas**

Además de su destacada función en la coagulación, las plaquetas son células efectoras clave en la inflamación y en la inmunidad, abarcando las respuestas inmunes innata y adaptativa.(58,59) También presentan funciones de señalización que desencadenan importantes respuestas de otros leucocitos mieloides y linfocitos, y de las células endoteliales, que también contribuyen a las respuestas inflamatorias e inmunitarias(59–61). Es conocido el papel de las plaquetas en el SDRA que se produce en respuesta a infecciones graves por algunos virus como el virus de la gripe, donde el aumento de la activación plaquetaria amplifica la inflamación y el daño pulmonar, con el consecuente aumento de la mortalidad(62,63).

Las biopsias pulmonares de pacientes con infección por SARS-CoV-2, muestran coágulos fibróticos en la pequeña vía aérea, y datos de coagulación intravascular diseminada. En estos pacientes se han encontrado diversas alteraciones como la presencia de megacariocitos, depósitos de fibrina, plaquetas y otras células inflamatorias, lo que se ha asociado a activación en la producción plaquetaria(64).

Además, cuando se estudia la fibrinólisis en pacientes con COVID-19 grave, un estado de hiperfibrinólisis evidenciada por el aumento del dímero D en suero se encontró en la mayoría de los individuos con SARS-CoV-2 al ingreso y aumentó en todos ellos previo al fallecimiento(65). Además, en los pacientes graves y fallecidos el recuento de plaquetas disminuyó de forma significativa(65,66). La mayoría de los pacientes que fallecieron cumplían criterios de coagulación intravascular diseminada (CID), lo que sugiere la implicación de una activación de la cascada de coagulación y de un estado de hiperfibrinólisis en pacientes con infección grave por SARS-CoV-2(67). Todo ello indica que la infección por SARS-CoV-2 se asocia a una elevada incidencia de fenómenos trombóticos y alteraciones en la coagulación. Además se ha descrito que las plaquetas de pacientes con COVID-19 son hiperreactivas en la liberación de citocinas inflamatorias, y además presentan la capacidad de adherirse a superficies de colágeno de manera más eficiente (68–70).

### **1.1.2.6 Sistema del complemento**

El complemento es un sistema inmediato cuya función es la defensa frente a patógenos. Está compuesto por una serie de proteínas producidas en el hígado y actúa en primer lugar detectando patógenos mediante tres vías que actúan de forma independiente pero que se amplifican entre sí. También actúa generando las enzimas C3 y C5 y, mediante la formación de poros por la unión de las proteínas C6 a C9 que van a permitir el paso de agua e iones en el microorganismo produciendo la lisis del mismo. Este conjunto de proteínas se conoce como complejo de ataque de membrana (MAC). Además, la activación de este sistema provoca la liberación de C3a y C5a, subunidades proinflamatorias y quimiotácticas que inducen la migración de células del sistema inmune al lugar de la infección, van a producir la activación del endotelio y la producción de histaminas por parte de los mastocitos aumentando la permeabilidad vascular. Además, la subunidad del complemento C5b es capaz de señalar para la fagocitosis y de activar a los linfocitos B(71).

No obstante, una activación del sistema del complemento excesiva puede mantener el estado inflamatorio y dañar a los tejidos. El aumento de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que se produce en el seno de la infección por SARS-CoV-2 provoca el aumento en la producción de C3 y C5. La vía de activación más afectada en la infección por SARS-CoV-2 es la vía de las lectinas, ya que este virus, de forma similar a lo que ha sido descrito en la infección por otros virus respiratorios, no es capaz de interactuar de forma adecuada con las proteínas del complejo lectina unidora de manosas (MBL); por lo que activando de forma inespecífica dicha vía de forma , se liberan importantes cantidades de C3a y C5a que aumentará el reclutamiento de monocitos y neutrófilos al tejido pulmonar, aumentando la inflamación pulmonar con la consiguiente amplificación del sistema del complemento(74,75). De esta manera los pacientes van a mostrar un sistema del complemento con aumento de su activación desde el inicio de la infección, manteniéndose elevado durante toda la estancia hospitalaria. Además, los pacientes que requieren ingreso en unidades de intensivos debido a la gravedad de sus síntomas presentan un aumento de la

formación del complejo de ataque de membrana frente a los que no desarrollan insuficiencia respiratoria(75). Esto podría deberse al daño en el endotelio alveolar producido por el complejo de ataque de membrana, junto con la trombosis y el daño microvascular, por lo que la disregulación en la activación del del complemento podría estar relacionada con la disfunción respiratoria(72).



### **1.1.3 Respuesta inmune adaptativa**

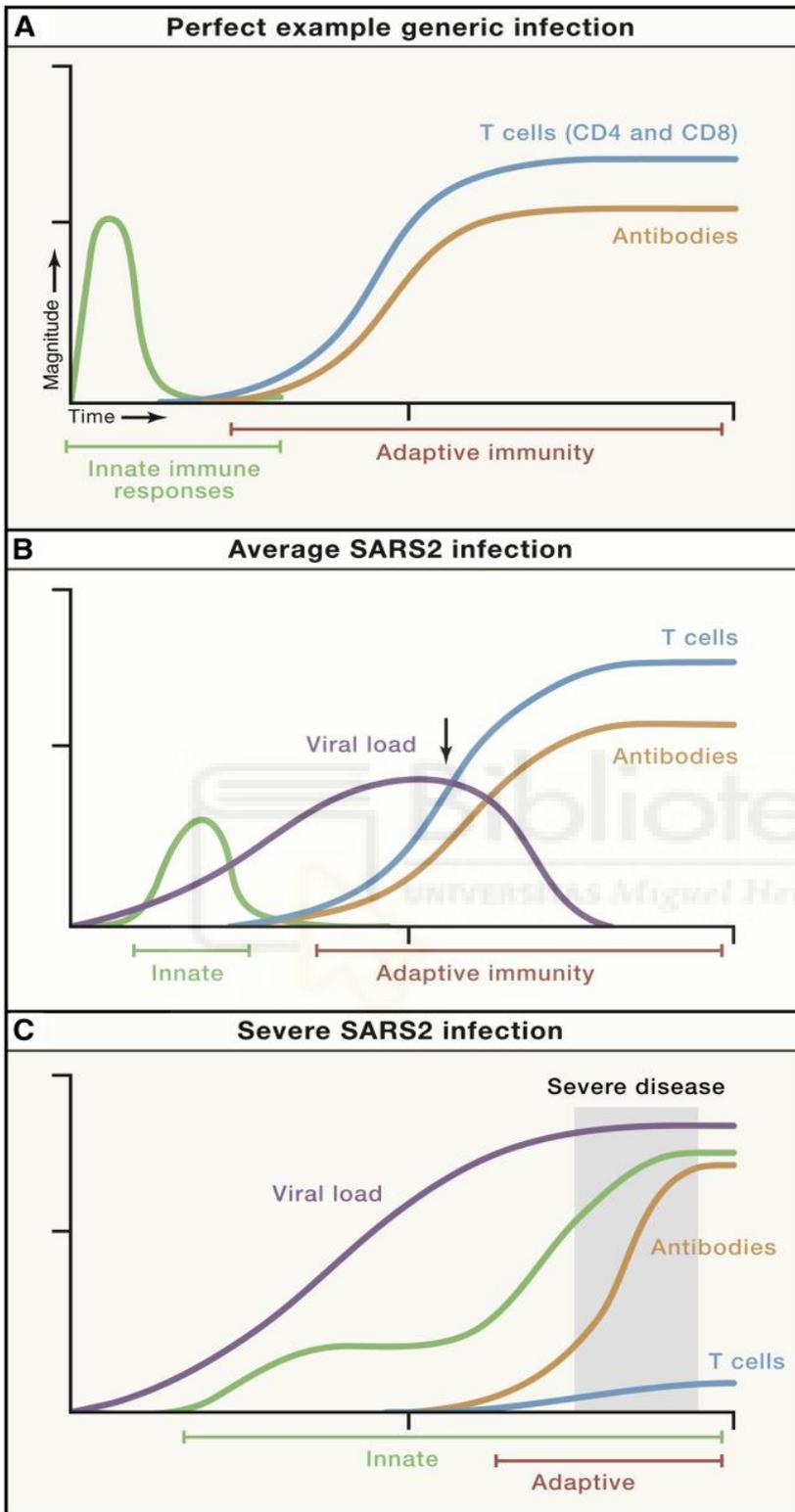
La respuesta inmune adaptativa del huésped se encarga de eliminar las infecciones virales respiratorias y prevenir futuras reinfecciones, y se desencadena mediante la acción coordinada de la respuesta inmunitaria innata inicial. Las células dendríticas presentes en el tracto respiratorio recogen los antígenos del virus circulante, migrando a los ganglios linfáticos y desencadenando la activación de la respuesta inmune adaptativa humoral y de la mediada por células. Una vez en los ganglios linfáticos, estas células presentan y cruzan los antígenos a las células T CD4+ y CD8+, dando lugar a la maduración y diferenciación de los linfocitos T. Estas células T específicas del antígeno realizan diversas funciones, entre las que encontramos: la destrucción de las células infectadas, la producción de citocinas y la activación de la respuesta de los linfocitos B que comenzarán la producción de anticuerpos IgA e IgG específicos(73). Los anticuerpos IgA situados en las superficies de las mucosas y constituyen una primera línea de defensa mientras que los anticuerpos IgG sirven como mecanismo de defensa específico a nivel sistémico contra el patógeno. Estas respuestas inmunes adaptativas se producen con mayor facilidad en los individuos más jóvenes, ya que, a medida que envejecemos, nuestro organismo experimenta un complejo proceso conocido como inmunosenescencia(74). La inmunosenescencia es el resultado de múltiples factores, como son la involución tímica, la expansión clonal de las células T, el deterioro de la capacidad progenitora de las células madre hematopoyéticas o los cambios en la médula ósea. Estos factores pueden verse acelerados por enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes mellitus, la obesidad o las enfermedades cardiovasculares dando como resultado que los individuos de mayor edad y, en particular aquellos con enfermedades inflamatorias crónicas presenten una función deteriorada de las células T, siendo más susceptibles a nuevas infecciones(75,76).

#### **1.1.3.1 Linfocitos T**

Los linfocitos T son los encargados de la defensa frente a virus y tumores. Diferenciamos entre linfocitos Th o colaboradores y linfocitos Tc o citotóxicos. Los linfocitos Th se encargan de dirigir la respuesta inmune mediante la producción de citocinas. Su función es dependiente de la información transmitida por el sistema inmune innato tras la respuesta inicial a la infección. Los linfocitos Tc o citotóxicos se encargan mediante la liberación de gránulos citotóxicos de neutralizar las células infectadas.

En la infección por el SARS-CoV-2 el sistema inmune innato es clave en el desarrollo de la inmunidad. Los linfocitos Th y Tc específicos se activan mediante diversos mecanismos como la producción de citocinas y la presentación de las células dendríticas las cuales contienen partículas virales en los órganos linfoides secundarios. Estos linfocitos regresarán al tejido pulmonar para eliminar la infección(77). Si la respuesta inicial a la infección es adecuada y eficiente, dará lugar a la presentación de un fenotipo asintomático o con síntomas leves o moderados. Sin embargo, en algunos individuos el SARS-COV-2 se acompaña de respuestas inadecuadas en los macrófagos, las células dendríticas y las células NK, provocando una activación y una respuesta retardada de los linfocitos T y un aumento de la replicación viral, lo que dará lugar a la presentación de fenotipos graves o críticos(77). La inmunidad innata ineficaz de IFN se asocia a una falta de control de la primoinfección por SARS-CoV-2 y a un aumento del riesgo de progresión a COVID-19 severo(78). Una respuesta de IFN tipo I y tipo III deteriorada y/o retrasada también se encuentra asociada a un riesgo elevado de COVID-19 grave(79). Se considera que si el retraso de la respuesta inmune innata se prolonga en el tiempo entonces el virus obtiene una gran ventaja en cuanto a la replicación en el sistema respiratorio, y el sistema inmune no va a conseguir preparar una respuesta inmune adaptativa en un tiempo razonablemente corto, lo que da lugar a condiciones que conducen a una enfermedad pulmonar grave. (Figura 3)

**Figura 3. Modelo integrado de la inmunología de COVID-19 y la gravedad de la enfermedad**



\*Tomado de Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Cell. 2021 Feb 18;184(4):861-880.

En este supuesto, el sistema inmunitario parece intentar controlar el virus con una respuesta inmunitaria innata en constante expansión en ausencia de una respuesta por parte de las células T, solución que va a terminar siendo nociva dado que una respuesta innata desmedida da como resultado una inmunopatología pulmonar excesiva. Esta conclusión es consistente con muchos estudios en los que se encontraron alteraciones en la inmunopatología de citocinas y quimiocinas del sistema inmune innato y, en la observación de frecuencias elevadas de neutrófilos en la sangre y grandes cantidades de neutrófilos en el tejido pulmonar en los pacientes con infección severa(46,80,81). Por el contrario, en este perfil de paciente generalmente no se ha encontrado una cantidad particularmente elevada de células T en el tejido pulmonar(80,82,83)

La respuesta de las células T es detectable tras la práctica totalidad de las infecciones por SARS-CoV-2(84,85). La respuesta de las células T CD4 + al SARS-CoV-2 es más prominente que la de las células T CD8 + y se asocia con el control inicial de la infección(84–86). Las células T específicas de cualquier proteína viral son relevantes en la inmunidad protectora. La prevalencia y la magnitud de las respuestas de las células T CD4 + se correlacionan con el nivel de expresión de cada proteína del SARS-CoV-2 (84) . Las proteínas Spike, M y la nucleocápside son las dianas más importantes de las células T CD4 +, y algunos estudios parecen indicar que la exposición previa a otros coronavirus puede inducir una reacción de estas células a la infección por SARS-CoV-2. En concreto un estudio de Braun et al. examina la respuesta de los linfocitos T CD4+ a la proteína de la espiga en sangre periférica de pacientes la COVID-19, así como en controles sanos(87). Se detectaron células T CD4+ reactivas a la espiga en el 83% de los individuos infectados. Lo interesante en este estudio fue la detección de células T CD4+ reactivas a la espiga en la sangre periférica del 35% de los donantes sanos. Estas células T CD4+ de los donantes sanos estaban dirigidas contra epítomos C-terminales de la proteína de la espiga, que son similares a células T reactivas a la espiga frente a epítomos C-terminales de proteínas de la espiga de coronavirus endémicos responsables de infecciones estacionales del tracto respiratorio superior. En particular las células T

CD4+ reactivas al SARS-CoV-2 de donantes sanos respondían a las proteínas de la espiga de los coronavirus endémicos humanos 229E y OC43. Estos hallazgos sugieren que estas células T CD4+ pueden ejercer una respuesta inmune de reacción cruzada a la infección por SARS-CoV-2, pudiendo explicar los distintos fenotipos clínicos de la COVID-19 y de la resistencia de los pacientes en edad infantil o los adultos jóvenes a la infección sintomática por SARS-CoV-2, dado que los adultos jóvenes y, especialmente, los niños en las guarderías y colegios tienen mayor número de contacto entre individuos que las personas de mayor edad, por lo que puede haber una mayor prevalencia de infecciones por coronavirus estacionales(87).

En cuanto a la dinámica celular, las células T CD4+ específicas del SARS-CoV-2 comienzan a detectarse entre 2 y 4 días tras el inicio de los síntomas (85,88,89). La inducción rápida de estas células en la infección aguda se asocia con una enfermedad leve y un aclaramiento viral acelerado(88). Por el contrario, la ausencia prolongada de estas células se asocia con un perfil de enfermedad grave o mortal(85,87,88)

Las células T CD4+ se diferencian en una serie de células auxiliares y efectoras, con diferentes funciones como interactuar con las células B y con las células T CD8+, reclutar células del sistema inmune innato, realizar funciones antivirales directas y colaborar en la reparación de los tejidos. Las células T CD4+ específicas suelen diferenciarse en células Th1 y células T auxiliares foliculares (Tfh). Las células Th1 tienen funciones antivirales a través de la producción de IFN $\gamma$  y citocinas mientras que las células Tfh se especializan en ayudar a las células B y son imprescindibles para el funcionamiento de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes, de las células B de memoria y de la inmunidad humoral a largo plazo (90). Aunque los títulos de anticuerpos neutralizantes no se han asociado con la disminución de la gravedad de la infección(91,92), la cantidad de células Tfh se ha asociado con una menor severidad de la infección(85).

Otra de las funciones de las células T CD4+ es la acción antiviral directa, previa diferenciación a células efectoras como las células Th1. La citocina predominante producida por las células T CD4+ específicas del SARS-CoV-2 es el IFN $\gamma$ (84–87). Una de las funciones de las células T CD4+ es reclutar a otras células efectoras dirigidas hacia antígenos virales del SARS-CoV-2, mediante la expresión genética de las quimiocinas CCL3/4/5 (MIP-1 s) y XCL1 (93).

Las células T CD4+ de la mucosa específicas del SARS-CoV-2 expresan de forma robusta IL-22(84,85). Esta interleuquina se asocia fuertemente a la reparación de tejidos, especialmente de las células del epitelio pulmonar y del intestino(94), lo que sugiere que la respuesta de las células T CD4+ en la infección por SARS-CoV-2 puede ayudar en la reparación del tejido pulmonar dañado. Además, las células T CD4+ de memoria parecen conservar la capacidad de producción de IL-22(85)

Los pacientes con infección por SARS-CoV-2 especialmente aquellos con un fenotipo grave muestran una linfopenia T característica(22), no habiéndose encontrado diferencias entre Th y Tc (95). Esta linfopenia circulante se correlaciona con el aumento de los niveles de IL-6 y con una respuesta desregulada de las células T que se observa predominantemente en los pacientes de mayor gravedad (95). Similar a lo encontrado en las células NK, los linfocitos T colaboradores tienen una capacidad de desgranular y de liberar diversas citocinas menor, y de manera más acentuada en relación a la gravedad del paciente. En estos pacientes las células T expresan más PD-1, una señal inhibitoria que se relaciona con la capacidad del virus de suprimir la capacidad inmune de los linfocitos Tc(52).

### **1.1.3.2 Linfocitos B**

Los linfocitos B son los encargados de la defensa específica frente a microorganismos extracelulares como bacterias o virus en su fase lítica mediante la

producción de inmunoglobulinas. Dichos linfocitos precisan entre 5 y 14 días para diferenciarse y producir anticuerpos, mientras la inmunidad innata frena la infección. Las células B comienzan a activarse al entrar en contacto con partículas virales, reconocidas mediante las inmunoglobulinas IgM e IgD que poseen en su membrana. Estos linfocitos se sitúan en zonas foliculares y extrafoliculares de órganos linfoides secundarios y de los tejidos linfoides difusos. Tras el reconocimiento de las partículas virales se produce la activación de los dos tipos de células B, que presentan funciones diferenciadas. Los linfocitos B de las zonas extrafoliculares se activan y se diferencian rápidamente y se encargan inicialmente de estimular la producción de una importante cantidad de linfocitos B plasmáticos que secretan IgM. En algunos ambientes inflamatorios y de forma excepcional estos linfocitos son capaces de diferenciarse a linfocitos con capacidad de producir IgG. Este tipo de linfocito B es de rápida activación, con una vida media corta y poco específico, sin capacidad para cambiar el isotipo, y de realizar la hipermutación somática (proceso por el cual produce una mejora génica de sus inmunoglobulinas). Tampoco tiene capacidad de producir memoria antigénica y produce una respuesta inmune independiente que no precisa de la cooperación de las células T. Estos mecanismos tienen la misión de intentar contener la replicación viral y eliminar el virus, mediante la activación del complemento, la neutralización o la fagocitosis. Por otra parte, linfocitos B activados en cooperación con linfocitos T migran a la región folicular donde van a sufrir un proceso lento y complejo mediante el que se van a diferenciar a células B plasmáticas. Mediante este proceso van a cambiar el isotipo de IgM a IgA, IgG o IgE dependiendo de las citocinas que le muestren los linfocitos Th, van a realizar una hipermutación somática y a formar a los linfocitos B memoria. Estos nuevos anticuerpos presentan mejoras con respecto a los previos en afinidad por los antígenos virales, y se van a encargar de las funciones de opsonización, neutralización y señalización para los mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos y de desgranulación(96).

El SARS-CoV-2 se une a los receptores ACE-2 de la superficie celular para su entrada en la célula huésped a través de su unión con la proteína Spike viral. Los individuos inmunocompetentes van a presentar una respuesta inmunitaria adaptativa tras de la infección, desencadenando respuestas inmunitarias humorales y celulares antivirales a través de la inmunidad mediada por células B y T(84), respectivamente. La respuesta humoral se produce mediante anticuerpos que reconocen las proteínas virales S y N. La proteína S presenta dos subunidades, S1 y S2. La S1 presenta el dominio de unión al receptor o RBD que media la unión del virus a las células huésped y es el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes(92).

Existe una relación compleja entre la gravedad de la COVID-19, los anticuerpos neutralizantes y las células Tfh. Títulos elevados de anticuerpos se han asociado con una infección severa y con una mayor respuesta de células B extrafoliculares (92,97), mientras que para las células Tfh se han encontrado diversas asociaciones según los distintos estudios(85,93,98). Además, es posible un retraso en la activación de la la respuesta de las células T y una respuesta B folicular inadecuada debido a la acción del SARS-CoV-2 sobre el sistema inmune innato que produciendo la desregulación en la cooperación entre los linfocitos T y B. (82,85,99).

Un porcentaje elevado de individuos con COVID-19 generan anticuerpos detectables frente al virus, con tasas de seroconversión que en algunos estudios han llegado a ser de más del 95% a los 9-10 meses de la infección(100). Sin embargo, un estudio poblacional con más de 7000 pacientes muestra una tasa de seroconversión inferior a otras investigaciones, con un porcentaje de aproximadamente un 75%, mostrando dicho estudio como predictores de no respuesta una carga viral baja (cycle threshold-CT-elevado), la ausencia de síntomas, la mayor edad, y no trabajar en la atención sanitaria con relación directa con el paciente(101).

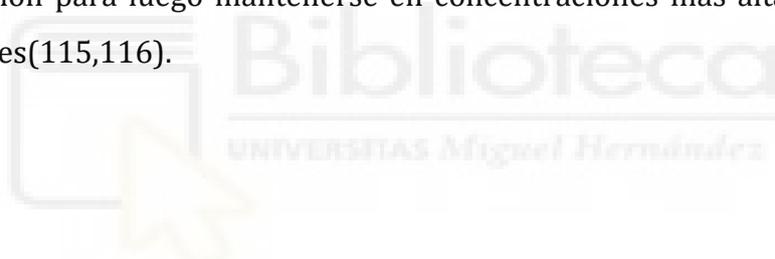
Los anticuerpos IgG frente a las proteínas S y N, pueden persistir detectables durante varios meses tras la infección en la mayoría de los sujetos, pero se desconoce la duración(91,102). Los individuos con mayor gravedad parecen

desarrollar una respuesta de anticuerpos más potente, logrando títulos de anticuerpos más elevados y duraderos que aquellos que desarrollan una infección leve(103). De la misma manera se ha visto también la pérdida de anticuerpos temprana en algunos pacientes con enfermedad leve . La persistencia de anticuerpos varía según los estudios donde se ha detectado que aproximadamente entre el 5 % y el 20 % de los individuos no presentan anticuerpos IgG detectables tras la infección(104). Asimismo, se ha detectado la ausencia de producción de anticuerpos neutralizantes en pacientes con enfermedad leve o asintomática (105). A pesar de todo ello parece que la respuesta inmunitaria humoral permanece intacta incluso con la pérdida de anticuerpos específicos con el tiempo, debido a la persistencia de las células B de memoria(106).

Parece haber diversos factores que se relacionan con el grado de respuesta inmunitaria que se produce tras la infección por SARS-CoV-2. Tanto el título de anticuerpos de unión como de anticuerpos neutralizantes aumentan más rápidamente y alcanzan un pico más alto en las personas con COVID-19 más grave (107,108). Los pacientes con sintomáticos y aquellos hospitalizados tienden a presentar títulos de anticuerpos más elevados que las personas asintomáticas y que aquellos que son tratados de forma ambulatoria(107–110). Los estudios también indican una correlación entre el valor del umbral de ciclo (Ct) y el título de anticuerpos, de tal manera que valores de Ct más bajos se asocian con títulos de anticuerpos más elevado(101,107).

La mayor parte de los estudios no han encontrado relación entre el sexo y el título de anticuerpos neutralizantes. El aumento de la edad se ha asociado a una menor seroconversión, pero con títulos más elevados de anticuerpos entre los individuos seroconvertidores(101). También se han notificado tasas más bajas de seroconversión en personas con neoplasias hematológicas o que reciben ciertos medicamentos inmunosupresores(111,112) como rituximab o ibrutinib.

Los títulos de anticuerpos alcanzan su punto máximo entre 3 y 5 semanas después de la infección y luego comienzan a disminuir de una manera que varía según el individuo, el antígeno objetivo y el isotipo del anticuerpo(113). Los anticuerpos frente a la proteína de la nucleocápside parecen disminuir más rápidamente, seguidos por los anticuerpos anti-RBD y luego por los anti-S(113). Estudios con un seguimiento más prolongado muestran que el título de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y N del SARS-CoV-2 sigue una tendencia lineal que alcanza aproximadamente el 90% de positividad a los 21 días del inicio de la infección. Sin embargo, mientras que la presencia de anticuerpos frente a la proteína N disminuyó a un ritmo más brusco, descendiendo al 68% tras 293 días, la detección de anticuerpos frente a la proteína S se mantuvo en torno a un 87% tras 300 días(114). En el caso de los anticuerpos neutralizantes la disminución parece ser bifásica con una vida media inicial de 2 a 3 meses, seguida de una disminución más lenta(109). En cuanto a los linfocitos B dirigidos al SARS-CoV-2 aumentan durante el primer mes tras la infección para luego mantenerse en concentraciones más altas durante al menos 8 meses(115,116).



#### **1.1.4 Respuesta inmune desregulada. Síndrome de tormenta citocínica.**

El sistema inmunitario es vital en la lucha del huésped frente a una agresión viral, sin embargo, un exceso en dicha respuesta inmune puede desembocar en un daño tisular (117). Una vez el virus ha entrado en contacto con el sistema inmune se van a producir una serie de respuestas que en determinados individuos pueden conducir a una “tormenta de citocinas” y, finalmente, al síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Estudios hasta la fecha demuestran concentraciones más elevadas de citocinas proinflamatorias en el plasma de los pacientes críticos que en aquellos con enfermedad leve o moderada, lo que sugiere que la “tormenta citocínica” se relaciona con la severidad de la infección. Parece que los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes con liberación excesiva de citocinas están causadas por la activación de cuatro cascadas diferentes: el sistema del

complemento, de la cinina, de la coagulación y de la fibrinólisis(118). Además, en se produce una liberación excesiva de varias citocinas en la fase inicial entre ellos el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la IL-1(119).

A través del estudio de algunas enfermedades como la linfocitosis hemofagocítica (HLH), se ha establecido el concepto de que una respuesta inmunitaria desregulada y/o excesiva puede inducir un daño en el organismo y causar un rápido deterioro clínico(120). La HLH es una enfermedad típicamente acompañada de tormenta de citocinas (121). Esta tormenta causada por trastornos autoinmunes se denomina clásicamente síndrome de activación de macrófagos(122), y el síndrome de liberación de citocinas se refiere inicialmente a la tormenta de citocinas que se produce tras de la terapia de células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR-T)(123). La sepsis también es una causa que puede derivar en la tormenta de citocinas, pero no es fácil diferenciar entre la tormenta de citocinas y la evolución de una sepsis grave en sí (124).

Varias citocinas se encuentran relacionadas con el desarrollo de la tormenta de citocinas como son la IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , e interferón (IFN)- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  es una citocina clave en el HLH primario(125) y la IL-6, una molécula inflamatoria clave en la tormenta de citocinas. Un hallazgo característico en la tormenta de citocinas es la linfopenia, que se encuentra asociada a la severidad de la misma. Algunos estudios han revelado que las células T se redistribuyen rápidamente a los órganos linfoides secundarios quedando atrapadas con una movilidad reducida(126).

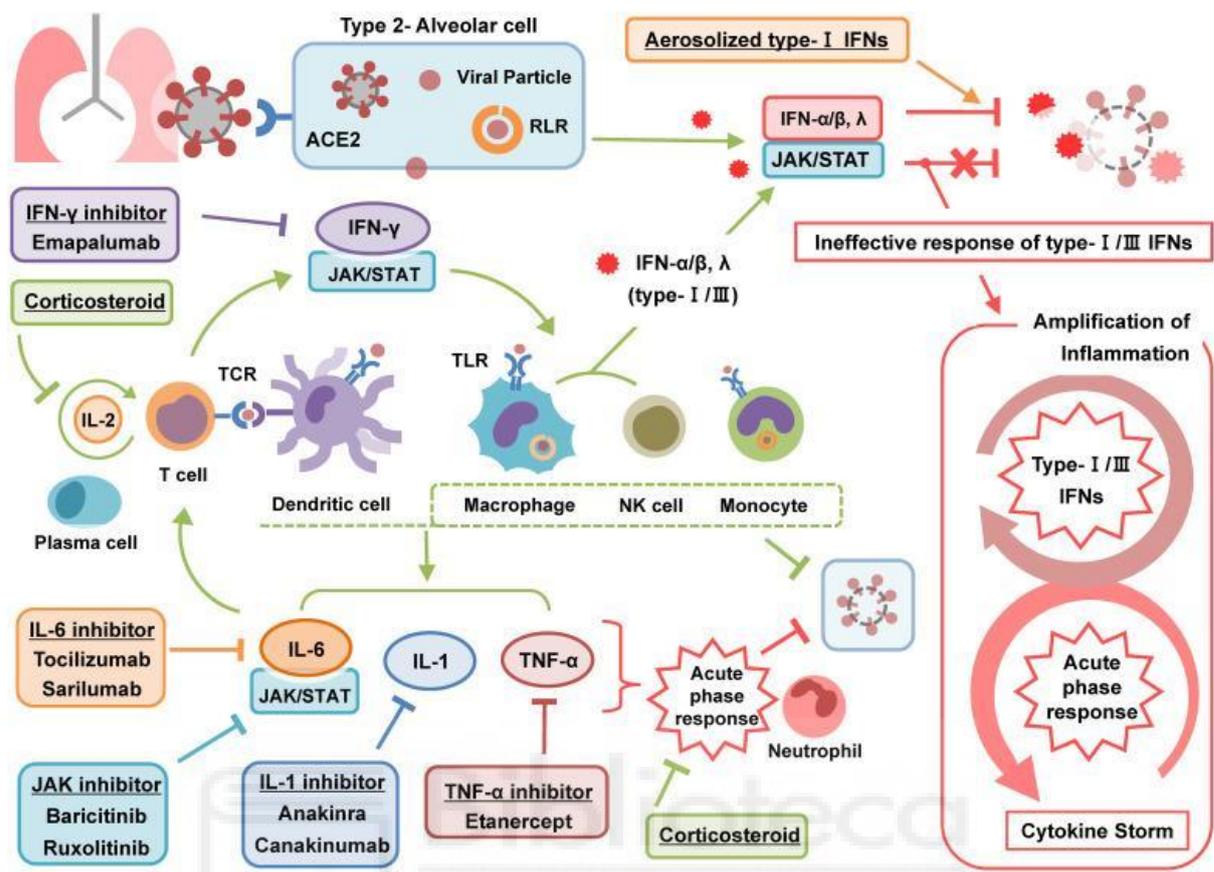
Entre las diversas citocinas relacionadas con la tormenta de citocinas, las que mayor relevancia son la IL-1 y la IL-6. Se trata de citocinas proinflamatorias que, junto con el TNF- $\alpha$ , están involucradas en la respuesta de fase aguda de la inflamación. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como el receptor tipo Toll (TLR) o el receptor tipo gen-1 inducible por ácido retinoico (RLR), se encuentran en el citoplasma o en la membrana celular y se encargan de reconocer la infección o el

daño tisular mediante los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) derivado de microorganismos o los patrones moleculares asociados a daños (DAMP). La IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  son liberados por células dendríticas y macrófagos en el lugar de la infección, activados por los PRR, y desencadenan una serie de reacciones inflamatorias mediante activación de la inmunidad innata(127). Sin embargo, la IL-6, junto con el IFN- $\gamma$ , también juega un papel importante en la inmunidad adaptativa mediada por células T (128). Por lo tanto, una activación desregulada de las células T puede ser un mecanismo patológico importante en la patogenia de la tormenta de citocinas en la que la IL-6 y el IFN- $\gamma$  son citocinas clave.

Algunos estudios relacionan la tormenta de citocinas con el deterioro clínico de los individuos con infección por SARS-CoV-2 así como con la mortalidad en la infección grave(129). Pacientes graves que precisan ingreso en unidades de críticos presentan niveles elevados de citocinas como IL-2, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$  y otras(129). Además, se han encontrado mayores niveles de IL-6 en los pacientes que fallecen en comparación con los que sobreviven (130).

Otros experimentos que investigan los efectos del virus sobre las citocinas han demostrado que se produce una secreción retardada de IFN de tipo I y III en la fase inicial de la infección y posteriormente una secreción desmedida de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos(131). Otros estudios evidencian una alteración en la respuesta de IFN de tipo 1, con un bajo nivel de actividad y una disregulación a la baja de los genes estimulados por el IFN (132). Estos estudios parecen indicar que una alteración en la respuesta inicial de INF de tipo I y III al SARS-CoV-2 desencadena una respuesta inmune tardía excesiva conduciendo a formas graves de la COVID-19 (Figura 4). (133)

Figura 4. Fisiopatología de la tormenta de citocinas.



\*Tomada de Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpirt W, Kronbichler A, Shin JI. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. Theranostics. 2021 Jan 1;11(1):316-329.

La heterogeneidad en la evolución de la infección en los diferentes individuos hace pensar que hay determinados individuos que son más vulnerables a la tormenta de citocinas en la infección por SARS-CoV-2. En el HLH primario se ha descrito una predisposición genética a dicha tormenta. Esta predisposición se debe a defectos genéticos en una vía dependiente de la perforina y la granzima en la acción de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos(134) Por tanto se sospecha que podría existir una predisposición genética determinante en la vulnerabilidad de unas personas con respecto a otras a la tormenta de citocinas, y por ende a presentar infecciones por SARS-CoV-2 de mayor gravedad.(133)



## **2 JUSTIFICACIÓN**

---



## 2. JUSTIFICACION

---

La COVID-19 ha surgido como una pandemia en rápida expansión que se ha extendido a los 5 continentes. En el momento de iniciar este trabajo, a pesar de haberse generado una cantidad de conocimientos sin precedentes sobre este nuevo coronavirus aún quedaban por caracterizar bien varios aspectos de la infección que en el momento actual continúan en estudio. En particular, disponíamos de poca información sobre la relación de la replicación viral y la respuesta inmunitaria, y la durabilidad de la respuesta inmune tras la infección

Se considera que la respuesta inmunitaria humoral es crucial para la eliminación del virus mediante la producción de inmunoglobulinas específicas que neutralizan la entrada de los viriones libres en las células sanas, opsonizan el virus para su inactivación por las proteínas del complemento o para su eliminación por las células inmunitarias fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, a través de procesos de citotoxicidad mediados por anticuerpos(73). Además de la eliminación viral, la respuesta de los anticuerpos es necesaria para la inmunidad frente a la reinfección (135). Por otro lado, la intensidad de la replicación viral puede estar implicada en la magnitud de la respuesta inmunitaria a la infección. Las cargas virales elevadas podrían inducir una activación inmediata de las células B extrafoliculares que conduce a una producción temprana e intensa de anticuerpos (136). En algunas infecciones, como la producida por el virus sincitial respiratorio, la carga viral se correlaciona con la fuerza de la respuesta inmunitaria innata(137).

La respuesta inmunitaria del huésped difiere entre la población infectada por el SARS-CoV-2. Una parte de los pacientes presenta una respuesta inmunitaria innata desregulada con una secreción excesiva de citocinas proinflamatorias que provocan daños graves en los órganos y enfermedad grave (138), mientras que otros permanecen asintomáticos. Asimismo, la respuesta inmunitaria humoral al SARS-

CoV-2 varía desde una liberación temprana e intensa de anticuerpos hasta una producción más débil o ausente (139–141). De hecho, un porcentaje que oscila entre el 10% y el 20% de los pacientes con infección por el SARS-CoV-2 presentan títulos negativos de inmunoglobulina G (IgG)(139,142). Aunque la respuesta de los anticuerpos se ha asociado a la severidad de la infección por SARS-CoV2(139,140,143), de forma similar a lo descrito en el SARS (144), aún no se han definido los factores adicionales que contribuyen a explicar tales diferencias, especialmente los efectos recíprocos de la respuesta inmunitaria y la dinámica viral.

Otra cuestión a estudio es la durabilidad de inmunidad tras la infección, así como la dinámica de los anticuerpos generados. La infección provoca en la mayor parte de los individuos una sólida respuesta de anticuerpos específicos frente a la proteína viral de la nucleocápside y la proteína S(139). La proteína S es el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes, que pueden impedir la entrada del virus y la infección de las células del huésped(145). La respuesta inicial se desarrolla en un plazo de 1 a 2 meses(115,146), aunque la magnitud de los anticuerpos entre los individuos infectados es heterogénea, con niveles máximos que pueden llegar a variar en más de 200 veces(115). Existe controversia en la duración de la respuesta de anticuerpos donde algunos estudios parecen indicar que los niveles de anticuerpos se reducen entre 5 y 10 veces en comparación con el pico a los 5 meses (115,146–148) y otros estudios sugieren una respuesta detectable de anticuerpos durante 5-12 meses (115,148–153), 13-14 meses (154,155) y 18-20 meses,(156,157) en ausencia de vacunación y reinfección.



## **3 HIPÓTESIS**

---



### 3. HIPÓTESIS

---

1. Cargas virales más elevadas de SARS-CoV-2 se asocian con una respuesta de anticuerpos más temprana y se pueden identificar predictores adicionales de una respuesta de anticuerpos más precoz o de mayor intensidad.
2. La duración de la respuesta de anticuerpos tras la infección varía en función de factores como la gravedad de la infección o el pico de anticuerpos.







## **4 OBJETIVOS**

---



## 4. OBJETIVOS

---

### **Objetivo general:**

Caracterizar la respuesta de anticuerpos en pacientes ingresados por COVID-19 y sus determinantes.

### **Objetivos específicos:**

1. Describir la proporción de pacientes que desarrolla respuesta de anticuerpos y la de los que no seroconvierten en una cohorte de pacientes con COVID-19 que precisan ingreso hospitalario.
2. Caracterizar el tiempo hasta la aparición de anticuerpos y la intensidad de la respuesta serológica en pacientes que ingresan por COVID-19 así como la relación de la carga viral con la intensidad y el tiempo transcurrido hasta la respuesta serológica.
3. Identificar las variables asociadas con el tiempo hasta la seropositividad, los predictores de la intensidad de la respuesta de anticuerpos, y los predictores de la ausencia de seroconversión, incluyendo variables demográficas, clínicas, niveles de biomarcadores, tratamiento recibido y evolución.
4. Evaluar la dinámica de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 durante los 12 meses siguientes a la infección y analizar los predictores de descenso de los títulos de anticuerpos y de serorreversión.





## **5 METODOLOGÍA**

---



## 5. METODOLOGIA

---

El estudio se realizó en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche (Alicante).

### 5.1.1 Diseño

Estudio observacional prospectivo en pacientes ingresados con diagnóstico de COVID-19 según los criterios del European Centre for Disease Prevention and Control entre el 10 de marzo y el 19 de mayo de 2020 durante la primera ola de la pandemia.

### 5.1.2 Sujetos del estudio

Se incluyeron todos los ingresos hospitalarios por COVID-19 con infección por SARS-CoV-2 confirmada microbiológicamente hospitalizados durante la primera ola de COVID-19. La confirmación microbiológica se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) a partir de un frotis nasofaríngeo o un aspirado bronquial y en algún caso de una muestra de heces.

### 5.1.3 Criterios de inclusión

Todos los pacientes hospitalizados en el Hospital General Universitario de Elche entre el 10 de marzo y el 19 de mayo de 2020 con diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 según los criterios del European Centre for Disease Prevention and Control:

- Criterios clínicos: Cualquier persona que presente al menos uno de los siguientes síntomas: tos, fiebre, dificultad respiratoria y/o aparición repentina de anosmia, ageusia o disgeusia.
- Criterios de diagnóstico por imagen: pruebas radiológicas que muestren lesiones compatibles con COVID-19

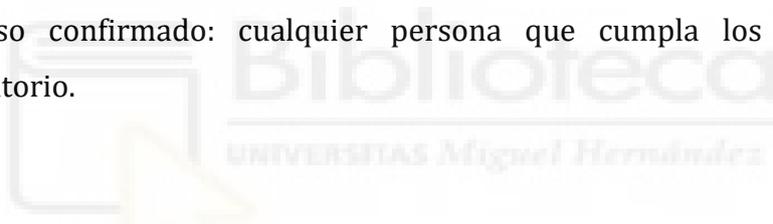
- Criterios de laboratorio: detección de ácido nucleico o antígeno del SARS-CoV-2 en una muestra clínica.
- Criterios epidemiológicos: al menos uno de los dos vínculos epidemiológicos siguientes: contacto estrecho con un caso confirmado de COVID-19 en los 14 días anteriores a la aparición de los síntomas y/o haber sido residente o miembro del personal, en los 14 días anteriores a la aparición de los síntomas, en una institución residencial para personas vulnerables en la que se haya confirmado la transmisión en curso de COVID-19.

#### Clasificación de los casos

A. Caso posible: cualquier persona que cumpla los criterios clínicos.

B. Caso probable: cualquier persona que cumpla los criterios clínicos con un vínculo epidemiológico o cualquier persona que cumpla los criterios de diagnóstico por imagen.

C. Caso confirmado: cualquier persona que cumpla los criterios de laboratorio.



#### **5.1.4 Criterios de exclusión**

Ausencia de resultado positivo de la PCR para SARS-CoV-2 en alguna muestra.

Ausencia de muestras para realización de test serológico.

Para el análisis de los pacientes con seguimiento a 12 meses y del tiempo hasta serorreversión se excluyeron aquellos pacientes de los que no se disponía de muestras serológicas consecutivas hasta el año tras la infección.

#### **5.1.5 Protocolo**

Los pacientes fueron tratados según un protocolo predefinido que incluía procedimientos diagnósticos y terapéuticos durante la estancia hospitalaria. El protocolo se describe en la figura suplementaria 1. Las muestras de sangre para las pruebas de laboratorio de rutina y la determinación de los biomarcadores del síndrome de liberación de citocinas, las pruebas serológicas y las muestras

nasofaríngeas para el SARS-CoV-2 se obtuvieron en serie en diferentes momentos durante la estancia hospitalaria. Se recolectaron muestras de suero para la medición de los niveles de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Elche como parte del estudio COVID-19 @ España.

La terapia para COVID-19 se administró siguiendo las pautas institucionales en ese momento. Los pacientes recibieron terapia antimicrobiana y / o inmunomoduladora que contenía lopinavir / ritonavir (LPV/r), hidroxiclороquina, azitromicina, interferón- $\beta$ -1b o remdesivir  $\pm$  metilprednisolona. De acuerdo con las pautas, se agregaron tocilizumab y metilprednisolona intravenosa al tratamiento inicial al ingreso si se cumplía alguno de los criterios de gravedad preestablecidos (CURB-65  $\geq 2$ , saturación de oxígeno  $< 93\%$ , frecuencia respiratoria  $> 30$  por min, radiografía de tórax con infiltrados multilobares bilaterales; dímero D  $\geq 0,7$   $\mu\text{g/L}$ , interleucina-6  $\geq 40$ , pg/ml, recuento de linfocitos  $< 800 \times 10^9/\text{L}$ , ferritina  $\geq 700$   $\mu\text{g/L}$ , fibrinógeno  $> 700$  mg / dl, proteína C reactiva  $> 25$  mg/L.)

### **1. Extracción de ARN y análisis RT-PCR del SARS-CoV-2**

La extracción de ARN y el análisis de RT-PCR para SARS-CoV-2, se realizó en muestras de exudado nasofaríngeo o muestras nasales y orofaríngeas obtenidas con hisopos de alginato y transportadas en 3 mL de medio de transporte (VICUM®, Deltalab, Rubí, España). Se extrajo ARN viral de 350  $\mu\text{l}$  del medio usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se diluyó en una muestra final de elución de ácido nucleico de 50  $\mu\text{l}$ . Se utilizaron 8  $\mu\text{l}$  de ARN para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, con un kit disponible comercialmente (Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene, Seúl, Corea) que se dirigió a los genes E, RdRP y N. Se realizaron mediciones de la carga viral de las muestras ( $\log_{10}$  copias / muestra) con una curva estándar de diluciones seriadas ( $\times 10$ ) a partir de un transcrito de ARN in vitro (Macrogen, Seúl, Corea). El

procedimiento se realizó según el protocolo del fabricante, en un termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, California, EE. UU.). El éxito de la extracción de ARN y la PCR se evaluó mediante el control interno incluido en el kit y se utilizaron controles negativos y positivos en cada ensayo.

## **2. IgG frente a la proteína spike y la nucleocápside interna del SARS-CoV-2**

Se obtuvieron muestras de sangre secuencialmente durante la estancia en el hospital, y a los 1, 2, 6 y 12 meses después del alta de los pacientes para medir las concentraciones de anticuerpos. Tanto los anticuerpos totales (incluidos IgG, IgA e IgM) frente al dominio S1 de la proteína spike (S) como los anticuerpos IgG frente a la proteína de la nucleocápside (N) interna (N-IgG) y el dominio S1 de la proteína S (S-IgG) se midieron en muestras de plasma con EDTA utilizando técnicas comerciales. Los anticuerpos totales se detectaron mediante una técnica inmunométrica (VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack usado en combinación con el VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Calibrator, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, EE. UU.) en un sistema automatizado (VITROS XT 7600 Integrated System) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detectaron N-IgG (ELISA Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG, Euroimmun, Lubeck, Alemania) y S-IgG (ELISA Anti-SARS-CoV-2 IgG, Euroimmun, Lubeck, Alemania) mediante inmunoensayo enzimático semicuantitativo comercial en un sistema automatizado (sistema Dynex DS2 ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de anticuerpos se evaluaron calculando la relación de la densidad óptica (DO) de la muestra del paciente sobre la DO del calibrador ( $DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del calibrador} = S/CO$  [*signal-to-cut-off ratio*]). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: el cociente  $\leq 1,1$  se definió como negativo y el cociente  $> 1,1$  como positivo.

### **5.1.6 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de la cohorte no se realizó una estimación formal del tamaño muestral. Debido a la naturaleza de la pandemia COVID-19 realizamos un estudio en una muestra de conveniencia, que incluyó todos los pacientes atendidos durante la primera ola de la pandemia.

Las variables continuas se expresan como mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75 (Q1, Q3) y las variables categóricas como porcentajes. Para la comparación de variables continuas se utilizó la prueba de Wilcoxon y la prueba de la t de Student, y para la comparación de variables categóricas se utilizó la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Las pruebas de Pearson y Spearman, en su caso, se utilizaron para analizar las correlaciones entre el tiempo hasta la seropositividad, la carga viral y el tiempo hasta la eliminación viral.

Los predictores del tiempo hasta la seropositividad se investigaron mediante regresión lineal multivariante. Se realizó un análisis multivariante mediante un modelo mixto lineal generalizado para analizar los factores asociados con los niveles de S-IgG como variable dependiente del tiempo. Se utilizó una regresión logística para analizar las variables asociadas con la seroconversión y no seroconversión. Se incluyeron en los modelos multivariantes las covariables con un valor de  $p < 0,05$  en los análisis univariantes. Se realizó una regresión lineal para analizar los factores asociados a la disminución de los títulos de anticuerpos S-IgG y N-IgG tras los niveles máximos, y una regresión logística para analizar los factores asociados a la serorreversión. El análisis estadístico se realizó utilizando R, versión 3.6.2

### **5.1.7 Periodo de estudio**

El periodo de estudio se inició en marzo de 2020, durante la primera ola de la pandemia por la COVID-19. Se recogieron muestras y datos clínicos de los pacientes durante el ingreso hospitalario entre los meses de marzo de 2020 y mayo de 2020. Los pacientes posteriormente fueron seguidos en consultas externas, con toma de muestras microbiológicas, muestras sanguíneas y recogida de datos clínicos. Los pacientes con

seguimiento hasta 12 meses fueron seguidos en consultar externas al mes, a los 3 meses a los 6 meses y al año del alta hospitalaria. Posteriormente a partir de octubre de 2020 se realizó el análisis estadístico.

### **5.1.8 Variables**

#### **a) Variables resultado**

Tiempo hasta la seroconversión (variable continua)

Pico S-IgG, S / CO (variable continua)

Pico de N-IgG, S / CO (variable continua)

Seroconversión (valores positivos de IgG para SARS-CoV-2) (variable categórica)

Serorreversión a los 12 meses (variable categórica).

#### **b) Variables predictoras**

Sexo

Edad

Tabaquismo activo

Índice de comorbilidad de Charlson

Comorbilidades:

- Diabetes
- Insuficiencia cardíaca congestiva
- Infarto agudo de miocardio (IAM) previo
- Ictus previo
- Enfermedad respiratoria
- Enfermedad renal
- Enfermedad arterial periférica

- Estado clínico
- Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso
- Puntuación en la escala de valoración secuencial del fracaso de órganos o Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) al ingreso
- Mediana de seguimiento
- Saturación de oxígeno / fracción inspirada de oxígeno (SpO2 / FIO2) al ingreso
- Infiltrados pulmonares bilaterales en la radiografía
- Puntuación más elevada en la escala de la organización mundial de la salud (OMS)

#### Datos microbiológicos

- SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas y orofaríngeas
- SARS-CoV-2 detectado únicamente en muestras fecales
- Umbral de ciclo (E gen)
- Pico de ARN del SARS-CoV-2, copias / muestra
- Ciclo umbral (E gen) <35
- Ciclo umbral (E gen) 35-38
- Ciclo umbral (E gen) >38
- Ciclo umbral inicial, N-gen
- Ciclo umbral inicial, E-gen
- Tiempo hasta el aclaramiento viral
- Días hasta seroconversión S-IgG
- Días hasta seroconversión N-IgG

## Biomarcadores

- Interleucina-6
- Ferritina.
- Proteína C reactiva
- Fibrinógeno
- LDH
- Linfocitos
- Neutrófilos
- Neutrófilos / linfocitos
- Dímero D
- NT-proBNP

## Evolución clínica

- Muerte
- Ingreso en unidad de cuidados intensivos (UCI)
- Hospitalización, días

## Tratamiento frente a COVID-19: Fármacos antimicrobianos / inmunomoduladores:

- Hidroxicloroquina
- Azitromicina
- Lopinavir / ritonavir
- Remdesivir
- Interferón- $\beta$ -1b

- Tocilizumab
- Metilprednisolona







## **6 RESULTADOS**

---



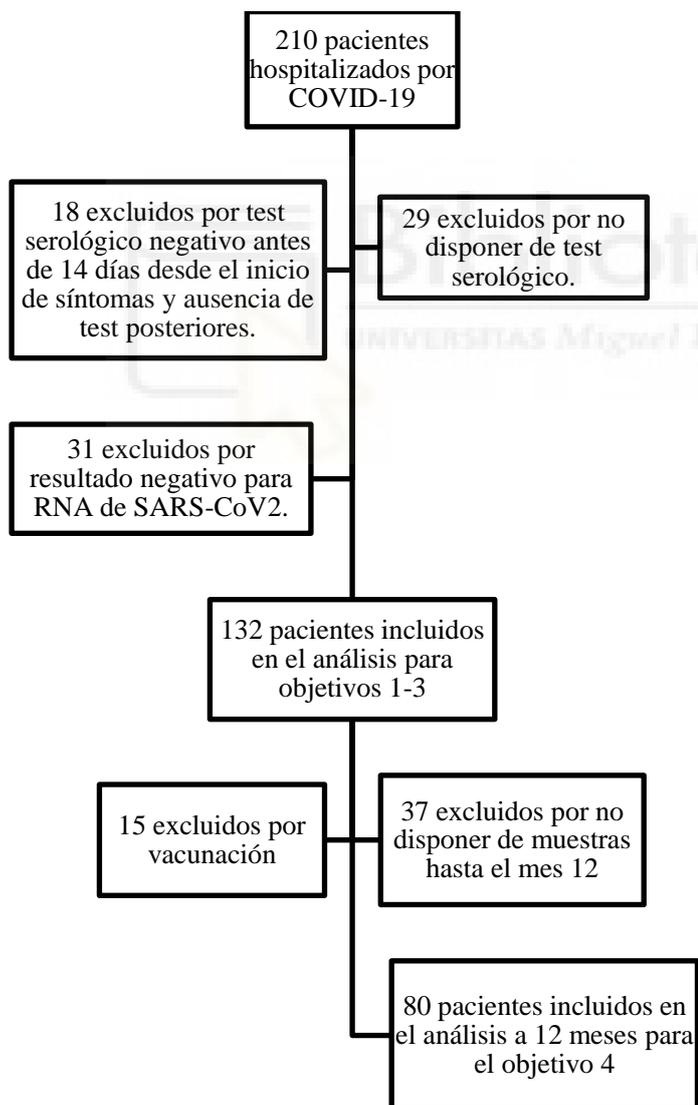
## 6. RESULTADOS:

---

### 6.1.1 Características basales de los pacientes

De 210 pacientes adultos ingresados con diagnóstico de COVID-19 durante el periodo de estudio, 132 pacientes con PCR confirmada en muestra nasofaríngea (94%) y/o fecal (6%) y con muestras serológicas seriadas tomadas después de de al menos 14 días desde el inicio de los síntomas se incluyeron en el estudio. El diagrama de flujo de los pacientes se muestra en la figura 5.

Figura 5. Diagrama de flujo.



La mediana (Q1-Q3) de edad era de 63,5 (54,0-76,0) años, el 61,4% eran varones, el 59,5% eran fumadores activos, y las comorbilidades más frecuentes eran diabetes mellitus (22%), enfermedades respiratorias (13,6%) y enfermedades renales (9,8%), con una mediana (Q1-Q3) del índice de comorbilidad de Charlson de 3 (1-5) (Tabla 1). La mediana (Q1-Q3) del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso fue de 6,0 (2,0-11,0) días, y la mediana (Q1-Q3) de la puntuación SOFA de 2,0 (2,0-3,0). De la muestra, 73 (67%) pacientes presentaban infiltrados pulmonares bilaterales en el momento del ingreso.

**Tabla 1. Datos clínicos de los pacientes ingresados con COVID-19 confirmado mediante RT-PCR (n=132)**

<b>Variable</b>	<b>N (%) o Mediana (Q1–Q3)</b>
Sexo, hombre	81 (61,4)
Edad, años	63,5 (54-76)
Fumador activo	72 (59,5)
Índice comorbilidad Charlson	3 (1-5)
<b>Comorbilidades</b>	
Diabetes	29 (22)
Insuficiencia cardíaca congestiva	7 (5,3)
IAM previo	11 (8,3)
Ictus previo	10 (7,6)
Enfermedad respiratoria	18 (13,6)
Enfermedad renal	13 (9,8)
Enfermedad arterial periférica	4 (3)

<b>Estatus clínico</b>	
Días desde inicio de síntomas hasta ingreso	6,0 (2,0-11,0)
Escala SOFA al ingreso	2 (2-3)
Mediana de seguimiento, días	74,5 (63-87)
SpO2/FIO2 al ingreso	350 (339,3-452,4)
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	73 (67)
<b>Datos microbiológicos</b>	
SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas y orofaríngeas	124 (94)
SARS-CoV-2 detectado únicamente en muestra fecal.	8 (6)
Umbral de ciclo (E gen)	32,7 (27,6-39)
Pico RNA SARS-CoV-2, copias/muestra	3,3 (0,0-4,4)
Umbral de ciclo (E gen) <35	72 (54,5)
Umbral de ciclo (E gen) 35-38	9 (6,8)
Umbral de ciclo (E gen) >38	42 (31,8)
Tiempo hasta aclaramiento viral, días	34 (12-56,5)
Tiempo hasta seroconversión, días	11 (8-14)
Pico S-IgG, S/CO	5,159 (0,1265-6,89)
Pico N-IgG, S/CO	4,582 (4,037-5,870)
<b>Biomarcadores</b>	
Interleucina-6, pg/mL	24,2 (12,6-80,6)

Ferritina, ng/mL	302,8 (143,2-497,2)
Proteína C reactiva, mg/L	48,5 (18,1-87,2)
Fibrinógeno, mg/dL	551 (357,9-750,8)
LDH	231 (190-297,5)
Linfocitos, x103/ $\mu$ L	1,2 (0,9-1,5)
Neutrófilos	4 (2,9-6,5)
Neutrófilos/linfocitos	4,7 (3,5-6,6)
Dímero-D, $\mu$ g/mL	0,7 (0,4-1,4)
NT-proBNP, pg/mL	66 (27-199,7)

### **Evolución**

<b>Muerte</b>	4 (3)
Ingreso UCI	14 (10,6)
Estancia hospitalaria, días	12 (9-17)

### **Medicación**

**antimicrobiana/inmunomoduladora  
concomitante, no. (%)**

Hidroxicloroquina	161 (98,8)
Azitromicina	151 (92,6)
Lopinavir/ritonavir	146 (89,6)
Remdesivir	1 (0,6)
Interferón- $\beta$ -1b	28 (17,2)
Tocilizumab	75 (56,8)
Metilprednisolona	25 (18,9)

Variables categóricas expresadas como no. y %, y variables continuas como mediana (Q1-Q3). IAM, infarto agudo de miocardio; SOFA, *Sequential Organ Failure*

*Assessment* (valoración secuencial del fracaso de órganos); SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, saturación de oxígeno en sangre periférica/fracción inspirada de oxígeno; LDH, lactato deshidrogenasa; NT-proBNP, *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral); UCI, unidad de cuidados intensivos. S/CO, *signal-to-cut-off ratio* (cociente de la señal en la muestra respecto al calibrador)

La mediana del valor del umbral de ciclo (Ct) para el gen E del ARN del SARS-CoV-2 (Q1-Q3) fue de 32,7 (27,6-39,0), y la carga viral máxima fue de 3,3 (0,0-4,4) log<sub>10</sub> copias/muestra. La mediana del tiempo hasta la eliminación del virus (Q1-Q3) fue de 34,0 (12,0-56,5) días. Encontramos una correlación positiva de la carga viral del SARS-CoV-2 con la ferritina (P = 0,005), la LDH (lactato deshidrogenasa; P = 0,004), y el fibrinógeno (P = 0,001), una tendencia a una correlación positiva con los niveles de proteína C reactiva (PCR; P = 0,087), y una asociación inversa con los recuentos de linfocitos (P = 0,011) y neutrófilos (P = 0,037) en sangre y con el cociente neutrófilos/linfocitos (P = 0,037).

La mayoría de los pacientes fueron tratados con hidroxiclороquina, azitromicina o LPV/r, 75 (56,8%) pacientes recibieron tocilizumab y 25 (18,9%) recibieron metilprednisolona. La mediana (Q1-Q3) de la estancia hospitalaria fue de 12,0 (9,0-17,0) días, 14 (10,6%) pacientes fueron ingresados en la UCI y 4 (3%) fallecieron durante el periodo de estudio. La mediana (Q1-Q3) de la duración del seguimiento de los pacientes fue de 74,5 (63,0-87,0) días.

De los pacientes incluidos inicialmente en el estudio se seleccionaron 95 pacientes con muestras de sangre disponibles hasta el mes 12, de los cuales se analizaron 80 tras excluir a 15 pacientes vacunados durante el seguimiento. La mediana (Q1-Q3) de edad en este grupo fue de 59,5 (52-69) años, 49 (61,2%) eran hombres y 49 (61,2%) presentaban comorbilidades. La mediana (Q1-Q3) del umbral de ciclo de la RT-PCR del SARS-CoV-2 inicial fue de 30,1 (26,8-34,6) para el gen E y 32,6 (29,5-35,5) para el gen N, y la detección del ARN duró una mediana (Q1-Q3) de 20 (6-47)

días. En el momento del ingreso, los pacientes mostraron una mediana de la escala ordinal de 7 puntos de la OMS de 4, y 13 (16,3%) pacientes requirieron ventilación mecánica no invasiva o invasiva (puntuación >4 puntos). La mediana (Q1-Q3) del tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la seropositividad fue de 15 (12-21) días para la S-IgG y de 13 (9-17) días para la N-IgG. El pico de S-IgG fue de 6,9 (5,9-11,8) S/CO y el de N-IgG de 4,6 (4-6,8) S/CO.

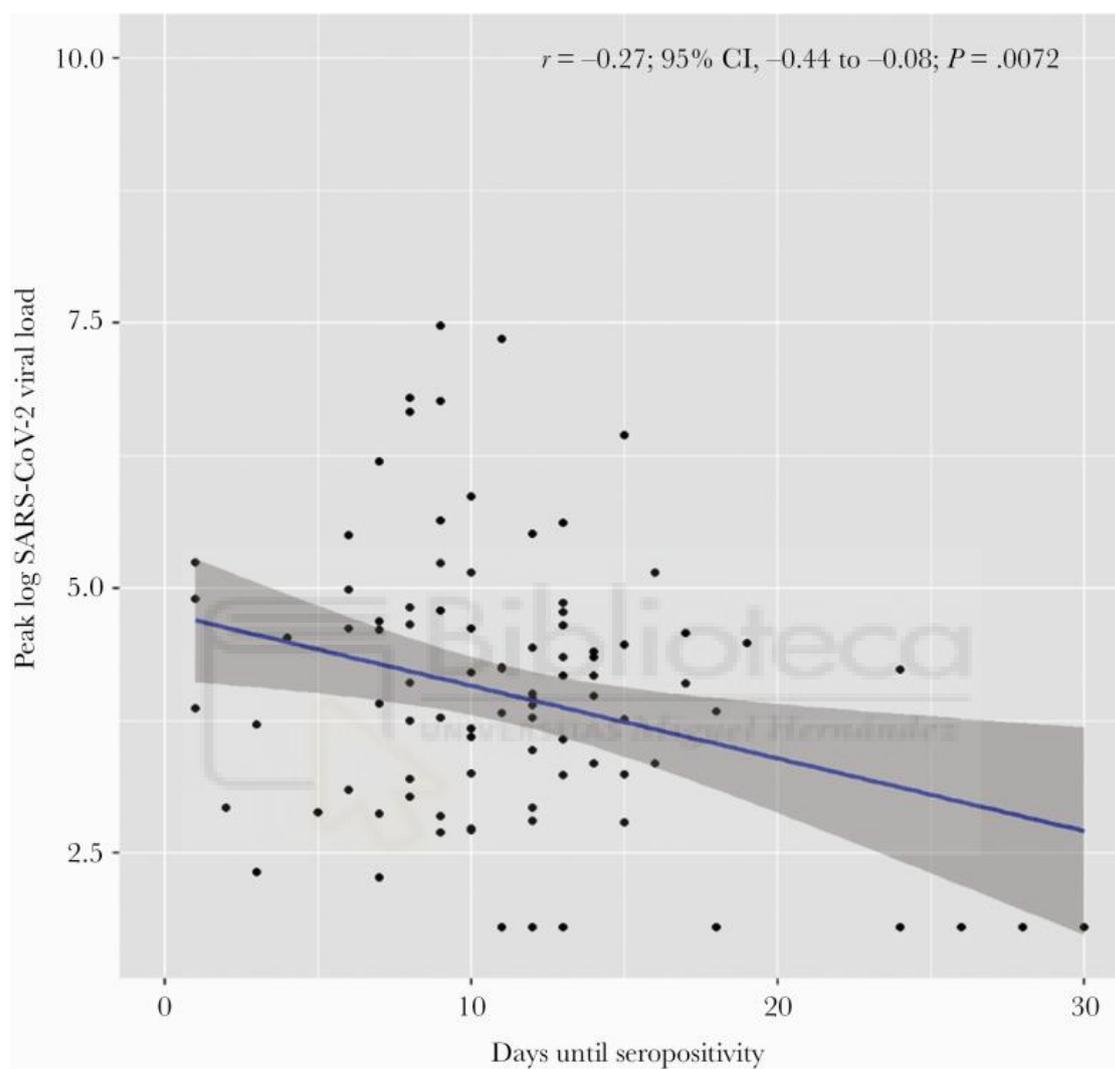
### **6.1.2 Predictores del tiempo hasta la seropositividad**

Noventa y nueve (75%) pacientes presentaron serología positiva durante el seguimiento. La mediana (Q1-Q3) del tiempo hasta la seropositividad fue de 11 (8-14) días.

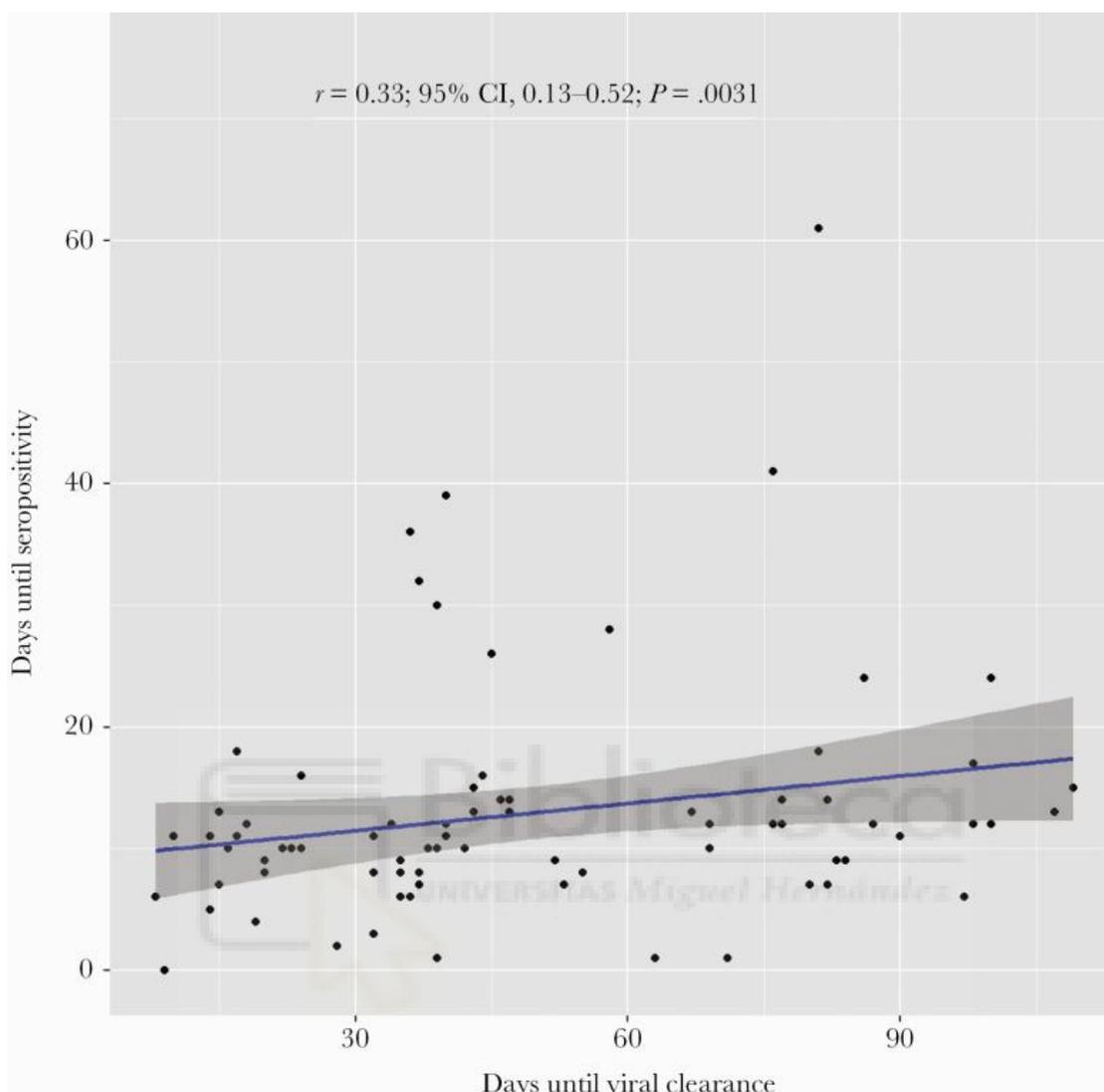
En el análisis univariante se observó que el tiempo hasta la seropositividad se asoció de forma inversa con el pico de carga viral ( $P = 0,007$ ) (Figura 6) y de forma positiva con el tiempo hasta la eliminación del virus ( $P = 0,029$ ) (Figura 7).



**Figura 6. Correlación entre pico de carga viral y tiempo hasta seropositividad.**



**Figura 7. Correlación entre tiempo hasta seropositividad y tiempo hasta aclaramiento viral.**



Otros factores asociados con el tiempo hasta la seropositividad fueron la edad ( $P = 0,037$ ), el índice de comorbilidad de Charlson ( $P = 0,011$ ), el recuento de neutrófilos ( $P = 0,019$ ) y el cociente neutrófilos-linfocitos ( $P = 0,043$ ), todos los cuales tuvieron una correlación negativa (Tabla 2). Sin embargo, no se encontró asociación con otros factores estudiados como marcadores de inflamación (PCR, LDH, ferritina, IL6), o la variable resultado muerte.

En el modelo multivariable ajustado que incluyó las variables pico de carga viral, tiempo hasta aclaramiento viral, edad, índice de comorbilidad de Charlson, neutrófilos y ratio neutrófilos/linfocitos encontramos que un mayor tiempo hasta el aclaramiento viral ( $p = 0,004$ ) y una menor carga viral máxima del SARS-CoV-2 ( $p =$

0,009) se comportan como predictores independientes de mayor tiempo hasta la seropositividad. (Tabla 2).

**Tabla 2. Modelos univariante y multivariante para predictores de tiempo hasta seropositividad y pico de título de anticuerpos**

Variable	Tiempo hasta seropositividad			Pico de título S-IgG		
	Coeficiente	P	P ajustada*	Coeficiente	P	P ajustada*
Sexo, hombre	0,082	0,226		2,262	0,003	0,8472
Edad, años	-0,005	0,037	0,408	-0,018	0,507	
Fumador activo	-0,085	0,255		-0,270	0,746	
Índice comorbilidad Charlson	-0,040	0,011	0,149	-0,243	0,182	
Escala de SOFA al ingreso	-0,016	0,555		-0,223	0,497	
SpO2/FiO2 al ingreso	0,000	0,776		0,005	0,383	
Infiltrados pulmonares bilaterales	0,06952	0,423		2,450	0,004	0,011
<b>Datos microbiológicos</b>						

Pico del logaritmo de RNA SARS-CoV-2, copias/muestra	-0,048	0,00	0,009	-0,075	0,727	
		9				
Log SARS-CoV-2 RNA				0,054	<0,00	<0,001
					1	
Cumulative RNA AUC	0,000	0,89		0,003	0,548	
		1				
Tiempo aclaramiento viral, días	hasta 0,003	0,04	0,007	0,031	0,070	<0,001
		2				
Tiempo seroconversión, días	hasta -			0,062	0,157	
<b>Biomarcadores</b>						
Interleucina-6, pg/mL	0,000	0,58		0,004	0,298	
		1				
Ferritina, ng/mL	0,000	0,85		0,001	0,616	
		8				
Proteína C reactiva, mg/L	0,000	0,89		0,013	0,011	0,213
		3				
LDH	0,000	0,63		0,013	0,005	0,150
		0				
Fibrinógeno, mg/dL	0,000	0,09		0,001	0,573	
		3				
Linfocitos, x103/ $\mu$ L	0,079	0,22		-2,069	0,005	0,290
		8				
Neutrófilos	-0,030	0,04	0,2674	0,083	0,634	
		3				

Neutrófilos/linfocitos	0,007	0,59	0,081	0,262
		5		
Dímero-D, $\mu\text{g/mL}$	-0,045	0,12	-0,097	0,779
		6		
NT-proBNP, $\text{pg/mL}$	0,000	0,21	-0,004	0,129
		3		
<b>Resultado</b>				
Muerte	-0,007	0,97	-2,016	0,460
		6		
Ingreso UCI	0,323	0,00	0,734	0,519
		1		

\*Ajuste realizado mediante regresión logística. Variables categóricas expresadas como no. y %, y variables continuas como mediana (Q1-Q3). IAM, infarto agudo de miocardio; SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment* (valoración secuencial del fracaso de órganos); AUC, area under the curve (área bajo la curva); SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, saturación de oxígeno en sangre periférica/fracción inspirada de oxígeno; LDH, lactato deshidrogenasa; NT-proBNP, *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral); UCI, unidad de cuidados intensivos.

### 6.1.3 Predictores de la intensidad de la respuesta de los anticuerpos

Los factores asociados a los títulos máximos de anticuerpos se muestran en la Tabla 2. Los niveles máximos de IgG-S se asociaron con el sexo masculino ( $P = 0,003$ ), los infiltrados pulmonares bilaterales ( $P = 0,004$ ), los niveles más altos de PCR ( $P = 0,011$ ) y LDH ( $P = 0,005$ ), y un menor recuento de linfocitos ( $P = 0,005$ ). Además, se encontró una discreta asociación con un mayor tiempo hasta el aclaramiento viral ( $P = 0,070$ ). Cuando se analizó como una variable dependiente del tiempo, el título de anticuerpos se asoció con el ARN del SARS-CoV-2 más cercana en el tiempo ( $P < 0,001$ ) y con el área bajo la curva de la carga viral ( $P < 0,001$ ).

En un modelo mixto lineal generalizado ajustado por las variables significativas del análisis univariante las variables infiltrados pulmonares bilaterales al ingreso ( $P =$

0,011), el ARN del SARS-CoV-2 dependiente del tiempo ( $P < 0,001$ ), el área bajo la curva de la carga viral para cada título de anticuerpos ( $P = 0,001$ ) y el tiempo hasta el aclaramiento viral ( $P < 0,001$ ) se comportaron como variables independientes de la intensidad de la respuesta de anticuerpos medida como niveles máximos de IgG-S,

#### **6.1.4 Predictores de no seroconversión**

De los 132 pacientes incluidos en el análisis encontramos 33 (25%) pacientes que no seroconvirtieron. Las características de los pacientes según el estado serológico se muestran en la Tabla 3. La mayoría eran hombres con una mediana de índice de Charlson de 5 (3-7). La mediana de días desde el inicio de los síntomas hasta el inicio del tratamiento fue de 3 (2-10). Presentaban un score SOFA de 3 (1,0-3,2) puntos y un SpO<sub>2</sub>/FI<sub>O2</sub> de 381 (343-462). La mediana de Ct al ingreso fue de 38 (37-38,7). La mediana de tiempo hasta el aclaramiento viral fue de 3 (1-12) días. Entre los marcadores inflamatorios que presentaban estos pacientes destaca una mediana de PCR de 35,3 mg/L (6,1-66,2), de IL6 de 20,7 pg/mL (10-41,8), de ferritina de 132,0 mg/L (68,1-369) así como de fibrinógeno de 420,8 mg/dL (263-554). Dos (6,1%) pacientes fallecieron durante el periodo del estudio y uno (3%) fue ingresado en la unidad de cuidados intensivos. En cuanto a los tratamientos recibidos 33 (100%) recibieron HCQ, 31 (93,9%) azitromicina, 22 (66,7%) lopinavir/r y 5 (15,2%) tocilizumab. Ningún paciente recibió remdesivir.

Los pacientes que no seroconvirtieron eran de mayor edad ( $p = 0,023$ ) y tenían más comorbilidades, con una puntuación en el índice de comorbilidad de Charlson significativamente mayor ( $p < 0,001$ ). La frecuencia de infiltrados pulmonares bilaterales fue menor ( $P = 0,006$ ) y su estancia en el hospital más corta ( $P = 0,010$ ). La probabilidad de que el ARN del SRAS-CoV-2 sólo se detectara en las muestras fecales fue mayor ( $P < 0,001$ ). La mediana del tiempo hasta el aclaramiento viral (Q1-Q3) fue de 3,0 (1,0-12,0) días en los pacientes seronegativos y de 41,0 (32,0-76,0) días en los pacientes que seroconvirtieron ( $P < 0,001$ ). La mediana del valor

de Ct fue de 38,0 (37,0-38,7) en los pacientes que no seroconvirtieron y de 28,04 (25,5-30,5) en los que seroconvirtieron ( $P < 0,001$ ). En cuanto a los tratamientos empleados, los pacientes que no seroconvirtieron fueron tratados con menor frecuencia con LPV/r ( $P < 0,001$ ), interferón beta 1 b ( $P < 0,001$ ), tocilizumab ( $P < 0,001$ ) y esteroides ( $P = 0,038$ ). Los niveles de varios biomarcadores inflamatorios al ingreso fueron significativamente más bajos en los pacientes seronegativos, incluyendo la ferritina ( $P < 0,001$ ), el fibrinógeno ( $P = 0,001$ ), la PCR ( $P = 0,023$ ) y la LDH ( $P < 0,001$ ), y tenían recuentos más altos de linfocitos ( $P = 0,032$ ) y neutrófilos ( $P = 0,001$ ).

En la regresión logística multivariante ajustada que incluía las variables significativas de interés del análisis univariante, con la excepción de la edad debido a la multicolinealidad con el índice de Charlson y las comorbilidades significativas que también estaban contenidas en dicho índice, los predictores de no seroconversión en los pacientes con COVID-19 fueron un mayor Ct de RT-PCR (odds ratio [OR], 1,87; IC del 95%, 1,09-3,21;  $P = 0,023$ ), un mayor índice de comorbilidad de Charlson (OR, 1,35; IC del 95%, 1,04-1,76;  $P = 0,027$ ), una mayor saturación de oxígeno en sangre periférica/ fracción de oxígeno inspirada (SpO2/FIO2) (OR, 1,014; IC del 95%, 1,00-1,02;  $P = 0,036$ ), un mayor recuento de neutrófilos (OR, 1,38; IC del 95%, 0,96-1,97;  $P = 0,081$ ) y unos niveles de fibrinógeno más bajos (OR, 0,99; IC del 95%, 0,99-1;  $P = 0,032$ ).

**Tabla 3. Factores asociados con no-seroconversión en pacientes con COVID-19**

<b>Variable</b>	<b>No-Seroconversor (n=33)</b>	<b>Seroconversor (n=99)</b>	<b>P</b>	<b>OR ajustado* (95% CI)</b>	<b>P*</b>
Sexo, hombre	22 (66,7)	59 (59,6)	0,539		

Edad, años	71,0 (62,0-77,0)	60,0 (53,0-74,0)	0,023	-		
Fumador activo	14 (45,2)	58 (64,4)	0,089			
Índice de comorbilidad de Charlson	5,0 (3,0-7,0)	2,0 (1,0-4,0)	<0,001	1,35 (1,04-1,76)	0,027	
<b>Estatus clínico</b>						
Días desde inicio de síntomas hasta ingreso	3,0 (1,0-8,0)	7,0 (4,5-10,0)	0,004	-		
Días desde inicio de síntomas hasta inicio de tratamiento	3,0 (2,0-10,0)	10,0 (6,5-14,0)	<0,001	-		
Escala SOFA al ingreso	3,0 (1,0-3,2)	2,0 (2,0-3,0)	0,705			
Mediana de seguimiento	63,0 (40,0-72,0)	80,0 (71,0-89,0)	<0,001	-		
SpO2/FIO2 al ingreso	380,8 (343-462)	350,0 (339-380)	0,051	1,01 (1,00-1,02)	0,036	
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	9 (27,3)	54 (56,2)	0,006	1,20 (5,23)	0,809	
<b>Datos microbiológicos</b>						
SARS-CoV-2 detectado únicamente en muestra fecal	8 (24)	0	0,001			

Días desde inicio de síntomas hasta primera muestra serológica	6 (2-17)	10,0 (8,0-13,0)	0,055			
Umbral de ciclo (Egen)	38 (37-38,7)	28,0 (25,5 to 30,5)	<0,001	1,87 (1,09-3,21)	0,023	
Tiempo hasta aclaramiento viral	3 (1-12)	41,0 (32,0-76,0)	<0,001			
<b>Biomarcadores</b>						
Interleucina-6, pg/mL	20,7 (10-41,8)	25,6 (12,9-88,6)	0,189			
Ferritina, ng/mL	132,0 (68,1-369)	377,5 (235-584)	<0,002	0,99 (0,99-1)	0,173	
Proteína C-reactiva, mg/L	35,3 (6,1-66,2)	50,3 (24,4-99,1)	0,023	1,10 (0,73-1,66)	0,002	
LDH	188,2 (159-228)	249,5 (211-301)	<0,001	1,00 (0,99-1)	0,769	
Fibrinógeno, mg/dL	420,8 (263-554)	613,0 (440-782)	0,001	0,99 (0,99-1)	0,032	
Linfocitos, x10 <sup>3</sup> /μL	1,4 (1,1-2,1)	1,2 (0,9-1,4)	0,032	0,99 (0,88-1,12)	0,951	
Neutrófilos	5,9 (4,9-8,6)	4,2 (3,3-6,2)	0,001	1,38 (0,96-1,97)	0,081	
Neutrófilos/linfocitos	4,2 (3,3-6,2)	4,7 (3,5-6,6)	0,001			
Dímero-D, μg/mL	1,0 (0,4-2,1)	0,6 (0,4-1,2)	0,121			
NT-proBNP, pg/mL	42,0 (7,4-161)	75 (41,2-200)	0,068			

<b>Resultado</b>			
Muerte	2 (6,1)	2 (2,0)	0,260
Ingreso en UCI	1 (3)	13 (13,1)	0,188
Estancia hospitalaria	10 (6,5-14)	13,0 (10,0-19,0)	0,010
<b>Tratamiento frente a COVID-19</b>			
Combinaciones basadas en hidroxicloroquina	33 (100,0)	97 (98,0)	1,00
Azitromicina	31 (93,9)	92 (92,9)	1,00
Lopinavir/ritonavir	22 (66,7)	98 (99,0)	<0,00
Remdesivir		1 (1)	1,00
Interferón-β-1b		28 (28,3)	<0,00
Tocilizumab	5 (15,2)	70 (70,7)	<0,00
Metilprednisolona	2 (6,1)	23 (23,2)	0,038

\*Ajuste realizado mediante regresión logística. Variables categóricas expresadas como no. y %, y variables continuas como mediana (Q1-Q3). OR, odds ratio; IAM, infarto agudo de miocardio; SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment* (valoración secuencial del fracaso de órganos); SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, saturación de oxígeno en sangre periférica/fracción inspirada de oxígeno; LDH, lactato deshidrogenasa; NT-proBNP, *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral): UCI, unidad de cuidados intensivos.

### 6.1.5 Pacientes con seguimiento a 12 meses

Se analizaron los 80 pacientes de los cuales disponíamos de muestras hasta el mes 12. En dicho grupo no se encontró ninguna correlación entre el umbral inicial del ciclo del SARS-CoV-2 en la RT-PCR y el pico de la concentración de anticuerpos; para la S-IgG, la r (Pearson) fue de -0,005 (intervalo de confianza [IC] del 95%, -0,246-0,235) para el gen E y de -0,031 (IC del 95%, -0,269-0,210) para el gen N; para la N-IgG, la r fue de -0,135 (IC del 95%, -0,364-0,108) para el gen E y de -0,126 (IC del 95%, -0,355-0,117) para el gen N. Tampoco se observó una correlación entre los valores de la escala ordinal de 7 puntos de la OMS y los niveles máximos de S-IgG ( $r = 0,123$ ; IC del 95%, -0,100-0,335; 0,278) o de N-IgG ( $r = 0,197$ ; IC del 95%, 0,024-0,401;  $p = 0,080$ ). Los niveles máximos de anticuerpos según los valores de la escala ordinal de 7 puntos se muestran en la Tabla 4. Los pacientes con alguna comorbilidad tendían a tener una respuesta de anticuerpos S-IgG más débil (pico de S-IgG 6,4 [5,8-9,8] S/CO y 7,1 [6,4-13,8] S/CO) en pacientes con o sin comorbilidades, respectivamente [ $p = 0,052$ ]), sin diferencias en la respuesta de N-IgG (pico de N-IgG 4,5 [3,7-6,5] y 4,7 [4,1-7,6] en pacientes con o sin comorbilidades, respectivamente [ $p = 0,45$ ]) (Tabla 4).

**Tabla 4. Pico del título de anticuerpos de acuerdo a las variables de interés.**

	Comorbilidad			Escala ordinal de 7 puntos OMS al ingreso					Ct SARS-CoV-2 RNA al ingreso, E gen				
	Si	No	P	3	4	5	6	P	1 <sup>er</sup> cuartil	2 <sup>o</sup> cuartil	3 <sup>er</sup> cuartil	4 <sup>o</sup> cuartil	P
<b>Pico S-IgG, S/CO</b>	6,4 (5,8-9,8)	7,1 (6,4-13,8)	0,05 2	6,5 (5,3-7,9)	6,6 (5,8-12,4)	7,0 (7,0-7,0)	7,3 (6,4-12,1)	0,64 1	6,5 (6,1-7,3)	7,6 (5,8-14,4)	6,5 (5,4-7,4)	6,6 (5,8-9,5)	0,6 31
<b>Pico N-IgG, S/CO</b>	4,5 (3,7-6,5)	4,7 (4,1-7,6)	0,45 9	4,5 (3,7-5,4)	4,5	9,6	4,9	0,19 5	4,6 (3,4-6,9)	4,4 (4,1-5,3)	5,1 (4,8-8,5)	4,4 (3,5-4,7)	0,2 72

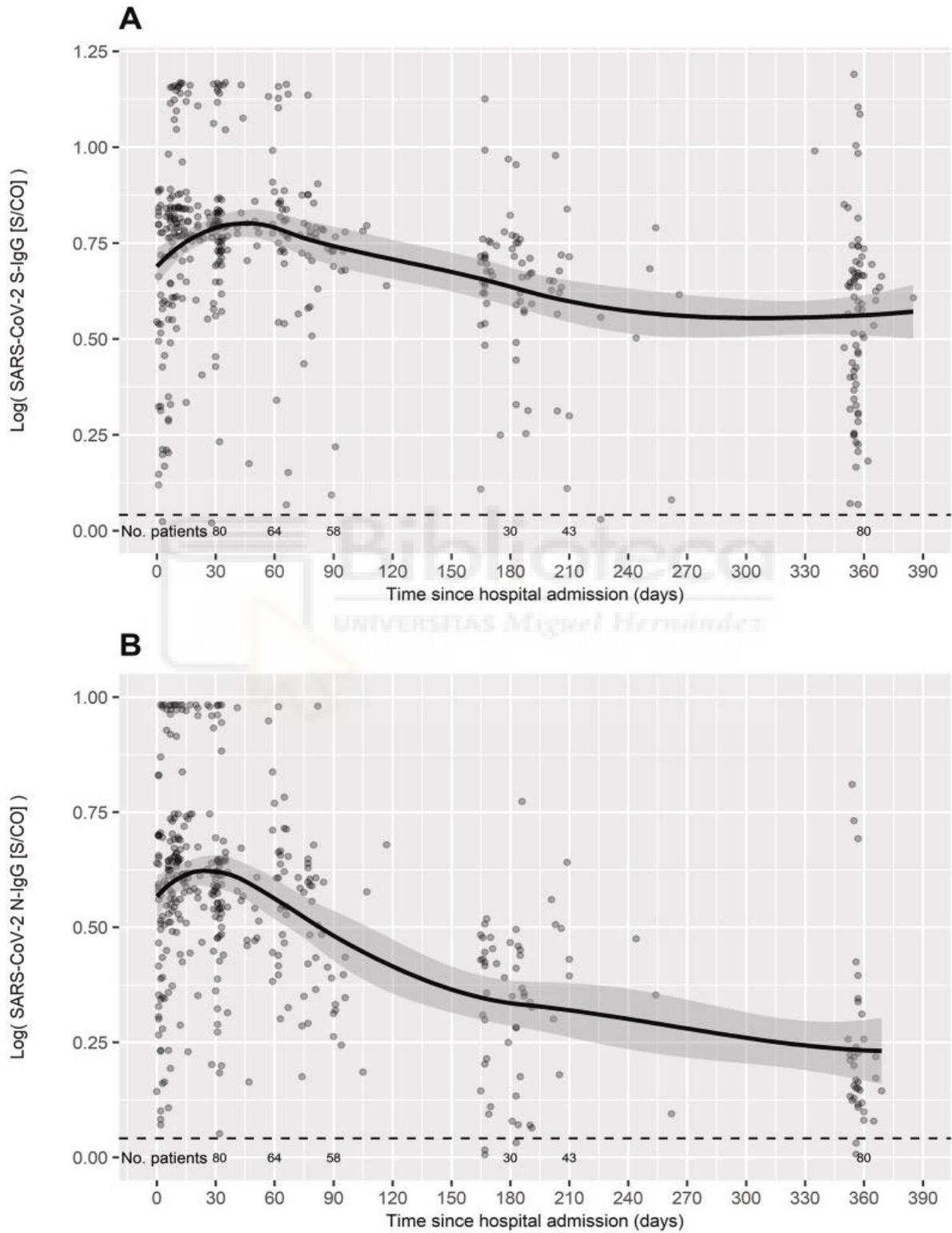
---

(3,6-	(9,6-	(4,6-
5,6)	9,6)	8,4)

---

Al año del diagnóstico de COVID-19, 73 (91,2%) pacientes presentaban títulos detectables de S-IgG y 35 (43,8%) de N-IgG (Tabla 5). La Figura 8 muestra la cinética de los anticuerpos S-IgG y N-IgG, donde se observa una disminución gradual de los títulos de anticuerpos durante los 12 meses de seguimiento. La regresión lineal que incluía la edad, el sexo, la puntuación de gravedad de la OMS y el tratamiento con esteroides y/o tocilizumab mostró que el descenso de S-IgG se asociaba positivamente con los títulos máximos de anticuerpos (coeficiente [IC 95%] 0,059 [0,05-0,067],  $p < 0,001$ ), e inversamente con la puntuación de gravedad de la OMS (coeficiente [IC 95%] -0,042 [-0,079/-0,004],  $p = 0,033$ ), y hubo una asociación positiva trivial con la edad (coeficiente [IC 95%] 0,002 [0-0,005],  $p = 0,10$ ); la disminución de N-IgG se asoció positivamente con los títulos máximos de anticuerpos (coeficiente [IC 95%] 0,091 [0,078-0,105],  $p < 0,001$ ).

**Figura 8. Cinética de anticuerpos frente a SARS-CoV. A, título anticuerpos anti-spike IgG; B, título anticuerpos anti-nucleocapside IgG.**



S/CO, absorbancia/cutoff; positiva S/CO  $\geq 1.1$

### 6.1.6 Tiempo hasta serorreversión

La mediana (Q1-Q3) del tiempo hasta la serorreversión fue de 158 (109,5-201) días para la S-IgG y de 249 (180-351) días para la N-IgG. La Tabla 5 muestra los factores asociados a la serorreversión para la S-IgG y la N-IgG. La serorreversión para la S-IgG se asoció de forma inversa con el pico de S-IgG ( $p < 0,001$ ) y el pico de N-IgG ( $p = 0,008$ ), y hubo una tendencia a la asociación con una mayor estancia hospitalaria ( $p = 0,055$ ). La regresión logística mostró que un pico más bajo de S-IgG predecía la serorreversión de S-IgG con una OR = 0,19; IC 95% = 0,04-0,45; y  $p = 0,004$  (Tabla 5). Los factores asociados a la serorreversión de la N-IgG en el análisis univariante fueron una edad más joven ( $p = 0,047$ ), un mayor umbral de ciclo inicial de la RT-PCR para el gen N ( $p = 0,019$ ) y el gen E ( $p = 0,016$ ), un menor pico de N-IgG ( $p < 0,001$ ) y una estancia hospitalaria más larga ( $p = 0,015$ ).

En la regresión logística, incluyendo las variables estadísticamente significativas, se encontró una asociación inversa de la serorreversión con el pico de N-IgG (OR 0,71; IC 95%, 0,53-0,90;  $p = 0,009$ ), y una asociación positiva marginal con el umbral de ciclo de la RT-PCR (OR 1,14; IC 95%, 1,00-1,33;  $p = 0,062$ ).

**Tabla 5. Características de los pacientes según presentaron o no serorreversión de anticuerpos IgG-S e IgG-N a los 12 meses.**

	Anticuerpos IgG frente a la espícula				Anticuerpos IgG frente a nucleocápside			
	12 meses serorreversión	no-12-meses serorreversión	P	OR ajustado (95% CI)	12 meses serorreversión	non-12-meses serorreversión	P	OR ajustado (95% CI)
	N=73	N=7			N=35	N=45		
<b>Sexo, hombre</b>	44 (60,3)	5 (71,4)	0,700		19 (54,3)	30 (66,7)	0,355	
<b>Edad</b>	60 (53-69)	52 (38-66,5)	0,247		60 (58-71,5)	57 (46-67)	0,047	0,96 (0,91-1,02)
<b>Comorbilidad</b>	43 (58,9)	6 (85,7)	0,239		22 (62,9)	27 (60,0)	0,821	

<b>Máxima puntuación en escala de gravedad de la OMS (rango)</b>	4 (4-6)	4 (3-6)	0,261		4 (4-6)	4 (3-6)	0,584		
<b>Ingreso en UCI</b>	13 (17,8)	0	0,592		6 (17,1)	7 (15,6)	1,0		
<b>Estancia hospitalaria, días</b>	12 (9-17)	6 (4-9,5)	0,055	1,08 (0,86-1,44)	13 (9,5-16)	10,5 (6-13)	0,015	0,96 (1,09)	(0,85-1,09)
<b>Pico RNA SARS-CoV-2, copias/muestra</b>	5,957 (1,265-37,229)	13,015 (2,580-27,723)	0,861		12,857 (5,445-41,256)	2,989 (830-27,723)	0,024		
<b>Ct inicial, N-gen</b>	32,6 (29,5-35,4)	32,6 (29,8-35,7)	0,965		30,5 (28,8-34,1)	33,8 (30,8-36,4)	0,019	1,14 (1,33)	(1,00-1,33)
<b>Ct inicial, E-gen</b>	30,1 (26,9-33,4)	30,4 (27,2-38,0)	0,982		28,8 (26-30,7)	32 (28,2-40)	0,016		
<b>Días hasta aclaramiento viral</b>	20 (6-48)	35 (4-46)	0,862		20 (11-56)	20,5 (4-37,8)	0,303		
<b>Días hasta seroconversión S-IgG</b>	15 (12-20)	19 (12-67)	0,335		16 (12-22)	15 (12-19)	0,652		
<b>Días hasta seroconversión N-IgG</b>	12 (9-17)	17 (5,5-36)	0,623		11,5 (9-14,8)	13 (10-18)	0,238		
<b>Pico S-IgG, S/CO</b>	6,9 (6,2-12,4)	1,7 (1,6-3,3)	<0,001	0,19 (0,04-0,45)	7,1 (5,9-13,5)	6,6 (5,9-7,6)	0,150		
<b>Pico N-IgG, S/CO</b>	4,7 (4,1-6,7)	2,3 (1,6-3,8)	0,008	0,72 (0,30-1,31)	5,4 (4,4-9,4)	4,3 (3,5-4,9)	<0,001	0,71 (0,90)	(0,53-0,90)
<b>Terapia inmune frente a COVID-19</b>									
<b>Esteroides</b>	15 (20,5)	1 (14,3)	1,0		8 (22,9)	8 (17,8)	0,587		
<b>Tocilizumab</b>	49 (67,1)	3 (42,9)	0,232		23 (65,7)	29 (64,4)	1,0		

Variables continuas expresadas como mediana (rango intercuartílico) y categóricas como número (%), salvo las indicadas. OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza; UCI, unidad de cuidados intensivos; Ct, umbral de ciclo de RT-PCR de SARS-

CoV-2; S-IgG, Anticuerpos IgG frente a espícula; N-IgG, Anticuerpos IgG frente a nucleocápside; S/CO, *signal-to-cut-off ratio* (cociente de la señal en la muestra respecto al calibrador)





## **7 DISCUSIÓN**

---



## 7. DISCUSIÓN

---

En este trabajo hemos analizado las interacciones entre la replicación viral y la respuesta inmunitaria humoral del huésped a la infección aguda y en los meses posteriores a la misma encontrando datos que sugiere un papel central de la carga viral del SARS-CoV-2 en la respuesta de anticuerpos. Cargas virales más altas se asociaron con una respuesta de anticuerpos más temprana y, en el extremo contrario, los pacientes que no seroconvirtieron mostraron cargas virales más bajas. Por otra parte, la cinética de la respuesta inmunitaria humoral predijo la velocidad de eliminación viral, de modo que una respuesta de anticuerpos más temprana se asoció con una eliminación viral más rápida.

Actualmente se continúa investigando la dinámica de la respuesta de los anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Con el fin de caracterizar los determinantes virales de la respuesta de anticuerpos, analizamos una cohorte de pacientes consecutivos y no seleccionados hospitalizados por COVID-19 durante la pandemia, con un amplio espectro de gravedad. Los pacientes fueron evaluados exhaustivamente con muestras nasofaríngeas y sanguíneas seriadas para evaluar las respuestas virológicas y serológicas. Entre las inmunoglobulinas, optamos por el análisis de los niveles de IgG para evaluar el grado de activación de la respuesta inmunitaria humoral(158) y nos centramos en la S-IgG, ya que es potencialmente capaz de neutralizar el virus y podría proteger contra la reinfección(159). Encontramos que la cantidad de ARN del SARS-CoV-2 era un factor importante implicado en la respuesta inmunitaria humoral contra el virus. Hubo una correlación entre la carga viral y el tiempo hasta la seropositividad, y los picos de carga viral más elevados se

asociaron con una liberación más temprana de anticuerpos, mientras que se observaron niveles iniciales muy bajos de ARN del SARS-CoV-2 en pacientes que no mostraron respuesta de la S-IgG, lo que sugiere que la inducción de la respuesta inmunitaria humoral adaptativa podría depender de la intensidad de la replicación viral. Además, la carga viral se correlacionó positivamente con varios otros biomarcadores de la respuesta del huésped, como demuestra la asociación con moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria y la activación de los macrófagos, como la ferritina o la PCR, con la linfopenia como probable reflejo de la liberación de citocinas(160), o con otros reactantes de fase aguda como el fibrinógeno o la LDH, esta última reflejo del daño tisular y asociada a la mortalidad(161).

Se sabe que la duración de la excreción viral en los pacientes con COVID-19 es variable, pero los factores que determinan esas diferencias no son todavía bien conocidos. La edad avanzada, las comorbilidades, el tratamiento inmunomodulador para la COVID-19 y la gravedad de la enfermedad se han relacionado con una excreción viral prolongada(162–164). Nuestro estudio muestra una correlación positiva entre el tiempo de respuesta de anticuerpos y el tiempo de eliminación viral, lo que apoyaría la implicación de la respuesta inmune humoral en duración de la excreción viral. Por lo tanto, un retraso en la respuesta adaptativa de anticuerpos podría contribuir a explicar la prolongada excreción viral observada en una parte de los pacientes. Por otra parte, la excreción viral prolongada se asoció con niveles más elevados de IgG, lo que probablemente refleja una mayor producción de anticuerpos debido a la exposición prolongada al virus(162). Además de la replicación vírica, encontramos otros factores que se asociaron a la intensidad de la respuesta de anticuerpos. Así, una mayor gravedad de la enfermedad, reflejada por una afectación pulmonar más extensa, una mayor duración de la estancia hospitalaria y niveles más altos de biomarcadores inflamatorios se asociaron positivamente con niveles más altos de S-IgG.

Se identificó una proporción de pacientes con COVID-19 que no desarrollaron anticuerpos contra el virus utilizando dos pruebas diferentes para detectar tanto anticuerpos totales (incluyendo IgG, IgA e IgM) contra el dominio S1 de la proteína S del SARS-CoV-2 como anticuerpos IgG contra la nucleocápside y el dominio S1 de la proteína S. Los análisis serológicos se obtuvieron una mediana de 6 días después del inicio de los síntomas, y hasta 63 días después, lo que supone un intervalo lo suficientemente amplio como para detectar la seroconversión. Encontramos que estos pacientes no seroconvertidos presentaban un perfil clínico, biológico y virológico diferenciado. Un hallazgo interesante fue que todos los no seroconvertidos, excepto uno, mostraron valores de umbral de ciclo de RT-PCR elevados. Esto sugeriría que una baja carga viral de SARS-CoV-2 podría ser insuficiente para estimular la inmunidad humoral adaptativa y generar la respuesta de anticuerpos. Otros estudios han encontrado hallazgos similares mostrando una disminución de la probabilidad de seroconversión con valores de Ct más elevados(165). Las razones por las que algunos pacientes de COVID-19 muestran cargas virales tan bajas siguen siendo desconocidas y podrían incluir hipotéticamente factores genéticos relacionados con la susceptibilidad y/o la respuesta inmunitaria al virus. Los factores genéticos podrían conducir a una regulación a la baja de los receptores ACE-2, lo que dificultaría la entrada del virus en las células(166). Algunos estudios han demostrado la asociación entre la carga viral elevada y la edad, así como con la gravedad de la infección, por lo que la inmunosenescencia podría jugar un papel importante en la respuesta inicial al virus y en la mortalidad asociada(167,168). En una proporción de nuestros pacientes, el ARN del SARS-CoV-2 sólo pudo detectarse en las heces, lo que podría denotar una barrera para la entrada del virus en las células del tracto respiratorio. Los no seroconvertidos eran de mayor edad y tenían una mayor frecuencia de comorbilidades. Aunque probablemente no sea lo más relevante, ambos factores podrían haber contribuido parcialmente a los títulos de anticuerpos indetectables, ya que se ha descrito una disminución de la respuesta humoral con la edad y las comorbilidades(169,170). Una explicación alternativa para el estado seronegativo en los pacientes con infección por SARS-CoV2 podría ser la intervención temprana de las células inmunitarias innatas como los neutrófilos, el interferón o las células

natural killer para la eliminación del virus(73), antes de que la respuesta inmunitaria adaptativa alcanzara un nivel significativo. Los pacientes que no generaron anticuerpos mostraron mayores niveles de neutrófilos. Una respuesta inmunitaria innata temprana y eficiente podría haber dado lugar, hipotéticamente, a los bajos niveles de diseminación viral y a la baja gravedad de la enfermedad observada en los pacientes seronegativos. No obstante, la importancia clínica de la no seroconversión no está clara. Las personas que no seroconvierten pueden tener una respuesta humoral sólida con la exposición repetida al virus debido a la memoria inmunológica como señala algún estudio(171).

En cuanto a la duración de la respuesta inmune, el estudio puso de manifiesto que los anticuerpos IgG frente a la proteína S siguen siendo detectables un año después de la infección aguda en la mayoría de los pacientes hospitalizados con COVID-19. Por el contrario, más de la mitad de los pacientes perdieron los anticuerpos IgG anti-nucleocápside durante el periodo de seguimiento. La persistencia a largo plazo de los anticuerpos se asoció con un pico de anticuerpos más elevado y, marginalmente, con valores iniciales de umbral de ciclo de la RT-PCR del SARS-CoV-2 más bajos. Una mayor gravedad de la enfermedad predijo una disminución más lenta de los anticuerpos frente a la proteína S.

La durabilidad de la respuesta de anticuerpos tiene implicaciones significativas en la pandemia de COVID-19. Trabajos previos pusieron de manifiesto que las IgM e IgA anti-RBD contribuyen a la neutralización del SARS-CoV-2 en la fase temprana de la infección, mientras que las IgG anti-RBD realizan su actividad neutralizadora en la última fase de la infección y durante la fase de convalecencia(172,173). Algunos estudios con seguimiento a 6 y 9 meses indican que la presencia de anticuerpos IgG frente a la proteína S se asocia con una reducción sustancial del riesgo de reinfección(174). Nuestro estudio demuestra una respuesta duradera de anticuerpos IgG frente a la proteína S, de al menos 12 meses tras el alta hospitalaria, en la mayoría de los pacientes con COVID-19 moderada/grave, lo que podría implicar teóricamente que la reducción del riesgo de reinfección podría extenderse

también a ese periodo de tiempo, como parecen apoyar otros estudios con seguimiento prolongado(154). La duración prolongada de la respuesta de anticuerpos puede ser importante a la hora de la vacunación ya que las células B memoria que expresan anticuerpos anti-S elevados y potentes tienen una duración de al menos un año tras la infección, y aumentan tras la vacuna(153).

En el momento actual no hay suficiente evidencia sobre el valor de las pruebas de anticuerpos para guiar las decisiones clínicas, sin embargo se están realizando estudios longitudinales para estimar el riesgo de reinfección en personas con anticuerpos desarrollados por la infección en comparación con aquellos desarrollados por la vacuna. Castilla et al. han estudiado en una amplia cohorte la reinfección en relación con la infección previa o la vacunación encontrando que en individuos con anticuerpos anti-N, la incidencia de COVID-19 se reduce de forma importante, mientras que los anticuerpos anti-S no modifican este riesgo durante el periodo de circulación de las variantes Omicron BA.4 y BA.5(175). Dado que los anticuerpos anti-N son inducidos por la infección, pero no en respuesta a la vacunación, se puede deducir que las personas que no han estado expuestas al virus siguen siendo susceptibles a la infección si se exponen a las variantes Omicron mencionadas. El estudio UK SIREN (SARS-CoV-2 Immunity and Reinfection Evaluation), actualmente en desarrollo, en el que se ha incluido a más de 40.000 individuos, responderá a esta pregunta y se espera que aporte información valiosa para la toma de decisiones futuras(176).

Encontramos una asociación entre la serorreversión y un pico de anticuerpos más bajo tras la infección, lo que apoya el papel central de la magnitud de la respuesta de anticuerpos en la durabilidad de los niveles detectables(177). A pesar del mayor descenso vinculado a los mayores niveles pico de anticuerpos en nuestro estudio, los títulos más altos también predijeron una mayor probabilidad de persistencia de anticuerpos detectables hasta un año. Aunque los anticuerpos representan sólo una parte de la respuesta inmunitaria, esto sugiere que los pacientes seropositivos desarrollan una respuesta inmunitaria humoral robusta que podría reducir el riesgo

de reinfección por SARS-CoV-2 en este plazo. Dan et al. estudiaron las células B memoria, encontrando que la ligera caída de los anticuerpos en los individuos tras la infección no implica una disminución de la inmunidad humoral verdadera, sino una contracción de la respuesta inmune, durante el tiempo en que se produce la maduración los anticuerpos y la memoria anti-S(178). En la misma línea, Wang et al. encontraron que los linfocitos B memoria se mantienen al menos un año después de la infección mostrando anticuerpos anti-S abundantes y que dichos linfocitos son expandidos tras la vacunación lo que sugiere que duración de la protección podría durar años, observación que resulta muy esperanzadora en cuanto a la durabilidad de la respuesta humoral tras la infección y la vacuna(179).

La gravedad de la enfermedad fue otro factor implicado en la tasa de disminución de los niveles de anticuerpos IgG frente a la proteína S en nuestra cohorte, con una asociación inversa. En la mayoría de los estudios a largo plazo realizados en SARS-CoV y MERS-CoV se observó que la IgG disminuía con el tiempo normalmente detectable hasta al menos un año. La cinética de los anticuerpos en estas infecciones varía según la gravedad, permaneciendo más tiempo detectables en relación con la gravedad de los síntomas(180,181). Algunos estudios de provocación con HCoV realizados en humanos muestran que las respuestas inmunitarias en suero y mucosas desarrollan protección frente a la infección y la enfermedad, aunque es posible la reinfección un año después generalmente de menor gravedad(182). Existe reactividad cruzada entre los VCo alfaCOV y los VCo betaCOV, pero es mínima(183–185). Mientras que los HCoV endémicos apenas inducen la producción de anticuerpos con reactividad cruzada contra los HCoV emergentes, el SARS-CoV y el MERS-CoV estimulan anticuerpos inducidos previamente por otras infecciones por HCoV(186,187).

En nuestro estudio encontramos una tendencia a una disminución más rápida de dichos anticuerpos en pacientes de edad avanzada. El envejecimiento se ha asociado con la reducción de la producción de células B naive en la médula ósea, y la reducción del crecimiento y la supervivencia de los linfocitos pro-B, así como de los progenitores linfocíticos comunes(188). A diferencia de otros estudios donde se han

observado diferencias en las respuestas inmunitarias en función del sexo, que podrían explicarse por factores como las concentraciones de esteroides sexuales, nuestro análisis no es congruente con dichos resultados(189). Por último, un mayor umbral de ciclo de la RT-PCR del SARS-CoV-2 se asoció marginalmente con la serorreversión, a lo que podría haber contribuido una respuesta inmunitaria coexistente más débil.







## **8 LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

---



## 8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

---

No han sido incluidos en el estudio los pacientes con infección por SARS-CoV-2 leve, que probablemente presentan una respuesta inmune diferente.

Las mediciones del ARN del SARS-CoV-2 se realizaron en muestras del tracto respiratorio superior, que pueden presentar en algunos casos una sensibilidad menor que las muestras del tracto inferior. Actualmente podríamos estudiar la replicación vírica sistémica con otros métodos como la PCR en sangre.

El estudio se realizó durante la primera ola de la pandemia. Inicialmente no se conocía adecuadamente el curso de la enfermedad ni la forma de hacer frente al virus, utilizando tratamientos múltiples muy heterogéneos. Todos los pacientes recibieron fármacos con efectos potenciales sobre la dinámica viral, y la mayoría de ellos también recibieron inmunomoduladores, que podrían tener un efecto sobre la respuesta inmunitaria.

A pesar de disponer de muestras seriadas de los pacientes, los métodos serológicos no estaban estandarizados, por lo que pudimos observar la dinámica de los anticuerpos, pero dificulta la comparación con estudios que utilizan métodos diferentes.

Debido a la ausencia de métodos estandarizados no pudimos estudiar la respuesta inmune celular en esta muestra de pacientes.

Aunque se incluyeron todos los pacientes que requirieron ingreso hospitalario el tamaño muestral final es pequeño, especialmente a la hora de caracterizar

determinados fenotipos asociados con una respuesta de anticuerpos y en particular la seroconversión y serorreversión.

No estudiamos la eficacia protectora de la respuesta inmune para evitar reinfecciones.





## **9 FORTALEZAS**

---



## 9. FORTALEZAS

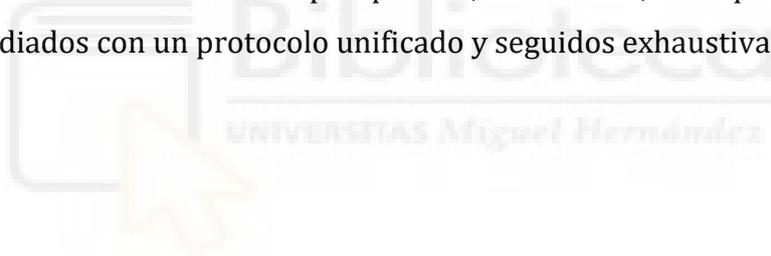
---

Es uno de los primeros estudios en describir las interdependencias entre la replicación viral y la respuesta humoral, y en caracterizar la historia natural de la respuesta de anticuerpos tras la infección describiendo los fenotipos de no seroconversores y serorreversores.

Hemos tenido la oportunidad de observar la dinámica de la respuesta de anticuerpos sin el efecto de la vacunación o de inmunidad previa a la infección.

A diferencia de otros trabajos cuantificamos directamente la carga viral.

Se trata de un estudio con un diseño prospectivo, unicéntrico, en el que los pacientes han sido estudiados con un protocolo unificado y seguidos exhaustivamente.







## **10 CONCLUSIONES**

---



## 10. CONCLUSIONES

---

1. En los pacientes con COVID-19, la replicación viral determina la magnitud de la respuesta inmunitaria humoral.
2. Cargas virales elevadas de SARS-CoV2 predicen una respuesta de anticuerpos temprana mientras que cargas virales bajas se asocian a una ausencia de seroconversión.
3. La cinética de la respuesta inmunitaria humoral predice la velocidad de eliminación del virus.
4. En pacientes hospitalizados por COVID-19 la respuesta de anticuerpos IgG frente a la proteína S se mantiene al menos un año tras el diagnóstico en la mayoría de los pacientes.
5. Títulos elevados de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad se asocian con una mayor probabilidad de anticuerpos detectables a largo plazo.





## **11 TRABAJOS PUBLICADOS**

---



# SARS-CoV-2 Seroconversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized With COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response

Mar Masía,<sup>1,a</sup> Guillermo Telenti,<sup>2,a</sup> Marta Fernández,<sup>2</sup> José A. García,<sup>3,○</sup> Vanesa Agulló,<sup>2</sup> Sergio Padilla,<sup>2</sup> Javier García-Abellán,<sup>2,○</sup> Lucía Guillén,<sup>2</sup> Paula Mascarell,<sup>2</sup> José C. Asenjo,<sup>2</sup> and Félix Gutiérrez<sup>1,○</sup>

<sup>1</sup>Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain, <sup>2</sup>Hospital General Universitario de Elche, Elche, Alicante, Spain, and <sup>3</sup>Operational Research Center, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain

**Background.** The interdependencies of viral replication and the host immune response in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) remain to be defined. We investigated the viral determinants of antibody response, the predictors of nonseroconversion, and the role of antibodies on viral dynamics.

**Methods.** This was a prospective study in patients hospitalized with COVID-19 that was microbiologically confirmed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Serial nasopharyngeal and oropharyngeal swabs and plasma samples were obtained for measuring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA and antibodies (total and S-IgG/N-IgG), respectively.

**Results.** Of 132 patients included, 99 (75%) showed positive antibody titers after a median (Q1–Q3) of 11 (8–14) days. The median (Q1–Q3) follow-up was 74.5 (63.0–87.0) days. In an adjusted linear regression model, time to seropositivity was inversely associated with peak log SARS-CoV-2 viral load ( $P = .009$ ) and positively with time to viral clearance ( $P = .004$ ). Adjusted predictors of S-IgG levels were time to viral clearance ( $P < .001$ ), bilateral lung infiltrates on admission ( $P = .011$ ), and the time-dependent SARS-CoV-2 RNA ( $P < .001$ ) and SARS-CoV-2 RNA area under the curve ( $P = .001$ ). Thirty-three (25%) patients showed undetectable antibody titers. Patients who did not seroconvert had higher cycle threshold values of RT-PCR (38.0 vs 28.0;  $P < .001$ ), had shorter time to viral clearance (3.0 vs 41.0;  $P < .001$ ), and were more likely to have SARS-CoV-2 only detected on fecal samples ( $P < .001$ ). Nonseroconvertors had also lower levels of blood inflammatory biomarkers on admission and lower disease severity.

**Conclusions.** Viral replication determines the magnitude of antibody response to SARS-CoV-2, which, in turn, contributes to viral clearance. COVID-19 patients who do not seroconvert exhibit a differential virological and clinical profile.

**Key words.** coronavirus; COVID-19; SARS-CoV-2; viral load; seroconversion; antibody responses; viral clearance.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) disease (COVID-19) has emerged as a rapidly escalating pandemic that has spread to the 5 continents. While an unprecedented amount of knowledge has been generated about this novel coronavirus during the few months that have elapsed since its emergence, several aspects of the natural history of SARS-CoV-2 infection remain to be well characterized. Particularly, little information is available about the interdependencies of viral replication and the immune response. Humoral immune response is crucial for viral clearance by

production of virus-specific antibodies that neutralize the entry of free virions into uninfected cells, opsonize virus for inactivation by complement proteins or for elimination by phagocytic immune cells such as macrophages and neutrophils, and inactivate virions or initiate killing of infected cells by triggering the complement cascade and through antibody-mediated cytotoxicity processes [1]. Besides viral elimination, antibody response is necessary for protective immunity against reinfection [2]. On the other hand, the intensity of viral replication might be a determining factor in the magnitude of the host immune response to infection. High viral loads are capable of inducing an immediate activation of extrafollicular B cells that leads to early and intense antibody production [3]. In infections caused by respiratory syncytial virus, the viral load was found to correlate with the strength of the innate immune response [4].

The host immune response differs among the SARS-CoV-2-infected population. A proportion of patients exhibit a dysregulated innate immune response with excessive secretion of proinflammatory cytokines that lead to severe organ damage [5], while others remain asymptomatic. Likewise, the humoral immune response to SARS-CoV-2 varies from

Received 2 November 2020; editorial decision 29 December 2020; accepted 4 January 2021.

<sup>a</sup>Equal contribution

Correspondence: Félix Gutiérrez, MD, Infectious Diseases, Hospital General de Elche & Universidad Miguel Hernández, Camí de la Almazara S/N, 03203 Elche, Alicante, Spain (gutierrez\_fel@gva.es).

Open Forum Infectious Diseases® 2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com DOI: 10.1093/ofid/ofab005

early and strong antibody release to weaker or absent antibody production [6–8]. In fact, a percentage ranging between 10% and 20% of patients with polymerase chain reaction (PCR)–confirmed SARS-CoV-2 [6, 9] infection show negative immunoglobulin G (IgG) titers. While antibody response has been associated with disease severity in patients with COVID-19 [6, 7, 10], similar to what was described in SARS [11], the additional factors contributing to explain such differences, especially the reciprocal effects of immune response and viral dynamics, have not yet been defined. We aimed to identify the virological and clinical predictors of antibody responses in patients with COVID-19, the predictors of nonseroconversion, and the role of antibodies in viral dynamics.

## METHODS

This prospective observational study was carried out at the University Hospital of Elche, Spain. Patients enrolled in the study were all those admitted for COVID-19 between March 10 and May 19, 2020, who were confirmed to be infected with SARS-CoV-2 upon hospital admission through real-time PCR (RT-PCR), mostly from nasopharyngeal smear samples and rarely from fecal samples.

Patients were managed according to a predefined protocol that included diagnostic and therapeutic procedures during the hospital stay. Blood samples for routine lab tests and biomarkers of cytokine release syndrome, serologic tests, and nasopharyngeal samples for SARS-CoV-2 were serially obtained at different time points during the hospital stay. Serum samples for the measurement of levels of antibodies to SARS-CoV-2 were collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital General Universitario de Elche (Spain) as part of the COVID-19@Spain study.

Therapy for COVID-19 was given following institutional guidelines. Patients received antimicrobial and/or immunomodulatory therapy containing lopinavir/ritonavir (LPV/r), hydroxychloroquine, azithromycin, interferon- $\beta$ -1b or remdesivir  $\pm$  methylprednisolone. According to guidelines, tocilizumab and intravenous methylprednisolone were added to initial therapy on admission if any of the pre-established severity criteria were met.

### SARS-CoV-2 RNA Measurements

For RNA extraction and RT-PCR analysis for SARS-CoV-2, nasopharyngeal and oropharyngeal flock swabs were placed together into 3 mL of transport medium (VICUM, Deltalab, Rubí, Spain). Viral RNA was extracted from 350  $\mu\text{L}$  of the medium using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted in a final 50- $\mu\text{L}$  nucleic acid elution sample. Eight microliters of RNA was used for detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR with

a commercially available kit (Allplex<sup>TM</sup> 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, Korea), which targeted the E, RdRP, and N genes. Viral load measurements of nasal/throat samples (log<sub>10</sub> copies/sample) were performed with a standard curve of 10-fold serial dilutions from an in vitro RNA transcript (Macrogen, Seoul, Korea). The lower limit of detection was 64 copies/sample. The assay procedure was carried out in accordance with the manufacturer's protocol in a CFX96 real-time thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The success of RNA extraction and PCR were assessed by the internal control included in the kit, and negative and positive controls were used in each assay.

### SARS-CoV-2 Antibody Testing

Both total antibodies (including IgG, IgA, and IgM) against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike (S) protein and IgG antibodies against the internal nucleocapsid (N) protein (N-IgG) and surface S1 domain of the S protein (S-IgG) were measured in EDTA plasma samples using commercial techniques. Total antibodies were detected by an immunometric technique (VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent pack used in combination with the VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Calibrator, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA) in an automated instrument (VITROS XT 7600 Integrated System) following the manufacturer's instructions. N-IgG (Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Germany) and S-IgG (Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Germany) were detected using commercial semiquantitative enzyme immunoassay kits in an automated instrument (Dynex DS2 ELISA system) following the manufacturer's instructions. Antibody levels were evaluated by calculating the ratio of the optical density (OD) of the patient sample over the OD of the calibrator (sample OD/calibrator OD = S/CO [absorbance/cutoff]). Results were interpreted according to the following criteria: ratio  $\leq 1.1$  was defined as negative and ratio  $> 1.1$  as positive.

### Statistical Analyses

Continuous variables are expressed as median  $\pm$  25th and 75th percentiles (Q1, Q3), and categorical variables as percentages. The Wilcoxon test and Student *t* test were used to compare continuous variables, and the chi-square test or Fisher exact test for the comparison of categorical variables. The Pearson and Spearman tests, where appropriate, were used to analyze the correlations between time to seropositivity, viral load, and time to viral clearance. Predictors of time to seropositivity were investigated through multivariate linear regression. Generalized linear mixed-model analysis was performed to analyze factors associated with the levels of S-IgG as a time-dependent variable, and logistic regression was used to analyze variables associated with the categorized IgG variable, and with nonseroconversion. Covariates with a

*P* value <.05 in the univariate analyses were included in the models. Statistical analysis was performed using R, version 3.6.2.

## RESULTS

Of 210 adult patients admitted with COVID-19 during the pandemic, 132 patients with serial available serological samples taken on >14 days since the initiation of symptoms and with confirmed PCR on nasopharyngeal (94%) and/or fecal (6%) samples were included in the study. A flowchart of the patients is shown in [Supplementary Figure 1](#). The median (Q1–Q3) age was 63.5 (54.0–76.0) years, 61.4% were male, 59.5% were active smokers, and the most frequent comorbidities were diabetes (22%), respiratory disease (13.6%), and renal disease (9.8%), with median (Q1–Q3) Charlson comorbidity index of 3 (1–5) ([Table 1](#)). The median (Q1–Q3) time from symptom onset to admission was 6.0 (2.0–11.0) days, the median (Q1–Q3) SOFA score was 2.0 (2.0–3.0), and 73 (67%) patients had bilateral lung infiltrates on admission. The median cycle threshold (Ct) value for the E gene of SARS-CoV-2 RNA (Q1–Q3) was 32.7 (27.6–39.0), and the peak viral load was 3.3 (0.0–4.4) log<sub>10</sub> copies/sample. The median time to viral clearance (Q1–Q3) was 34.0 (12.0–56.5) days. There was a positive correlation of SARS-CoV-2 viral load with ferritin (*P* = .005), LDH (lactate dehydrogenase; *P* = .004), and fibrinogen (*P* = .001), a trend to a positive relationship with the levels of C-reactive protein (CRP; *P* = .087), and an inverse association with the blood lymphocyte (*P* = .011) and neutrophil (*P* = .037) counts and with the neutrophil-to-lymphocyte ratio (*P* = .037).

The majority of patients were treated with hydroxychloroquine, azithromycin, or LPV/r, 75 (56.8%) patients received tocilizumab, and 25 (18.9%) received methylprednisolone. The median (Q1–Q3) length of hospital stay was 12.0 (9.0–17.0) days, 14 (10.6%) patients were admitted to the ICU, and 4 (3%) died. The median (Q1–Q3) follow-up duration of the patients was 74.5 (63.0–87.0) days.

### Predictors of Time to Seropositivity

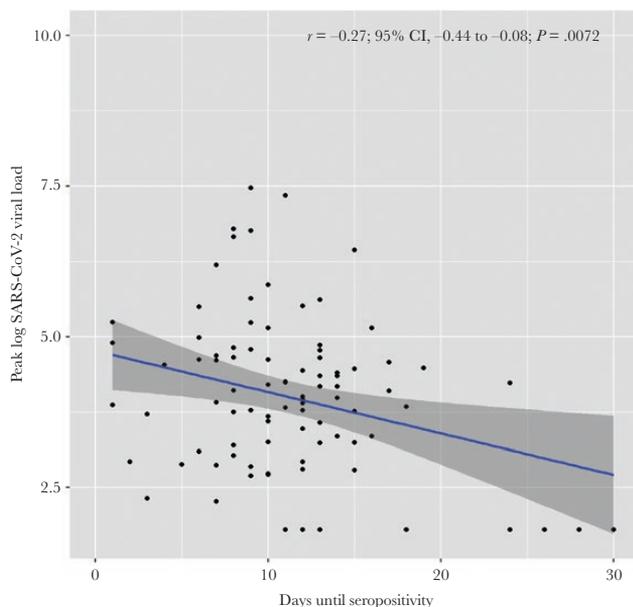
The number of patients with positive serological tests during follow-up was 99 (75%). The median (Q1–Q3) time to seropositivity was 11 (8–14) days. Time to seropositivity was inversely associated with peak viral load (*P* = .007) ([Figure 1](#)) and positively associated with time to viral clearance (*P* = .029) ([Figure 2](#)). Additional factors associated with time to seropositivity included age (*P* = .037), the Charlson comorbidity index (*P* = .011), neutrophil count (*P* = .019), and neutrophil-to-lymphocyte ratio (*P* = .043), all of which had a negative correlation ([Table 2](#)).

In a multivariable model adjusted for the significant (*P* < .05) variables of the univariate analysis, time to antibody production was inversely associated with peak log SARS-CoV-2 viral load

**Table 1. Clinical Data of Patients Admitted With COVID-19 Confirmed With Real-time Polymerase Chain Reaction**

Variable	No. (%) or Median (Q1–Q3)
Sex, male	81 (61.4)
Age, y	63.5 (54–76)
Active smoking	72 (59.5)
Charlson comorbidity index	3 (1–5)
<b>Comorbidities</b>	
Diabetes	29 (22)
Congestive heart failure	7 (5.3)
Previous AMI	11 (8.3)
Previous stroke	10 (7.6)
Respiratory disease	18 (13.6)
Renal disease	13 (9.8)
Peripheral arterial disease	4 (3)
<b>Clinical status</b>	
Days from symptom onset to admission	6.0 (2.0–11.0)
SOFA score on admission	2 (2–3)
Median follow-up, d	74.5 (63–87)
SpO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> on admission	350 (339.3–452.4)
Bilateral lung infiltrates on x-ray	73 (67)
<b>Microbiological data</b>	
SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and oropharyngeal samples	124 (94)
SARS-CoV-2 detected only in fecal samples	8 (6)
Cycle threshold (E gene)	32.7 (27.6–39)
Peak SARS-CoV-2 RNA, copies/sample	3.3 (0.0–4.4)
Cycle threshold (E gene) <35	72 (54.5)
Cycle threshold (E gene) 35–38	9 (6.8)
Cycle threshold (E gene) >38	42 (31.8)
Time to viral clearance, d	34 (12–56.5)
Time to seroconversion, d	11 (8–14)
Peak S-IgG, S/CO	26 (18–39.5)
Peak N-IgG, S/CO	19 (14–27)
<b>Biomarkers</b>	12 (9–17)
Interleukin-6, pg/mL	24.2 (12.6–80.6)
Ferritin, ng/mL	302.8 (143.2–497.2)
C-reactive protein, mg/L	48.5 (18.1–87.2)
Fibrinogen, mg/dL	551 (357.9–750.8)
LDH	231 (190–297.5)
Lymphocytes, ×10 <sup>3</sup> /μL	1.2 (0.9–1.5)
Neutrophil	4 (2.9–6.5)
Neutrophil/lymphocytes	4.7 (3.5–6.6)
D-dimer, μg/mL	0.7 (0.4–1.4)
NT-proBNP, pg/mL	66 (27–199.7)
<b>Outcomes</b>	
Death	4 (3)
ICU admission	14 (10.6)
Hospital stay, d	12 (9–17)
<b>Concomitant antimicrobial/immunomodulatory drugs, No. (%)</b>	
Hydroxychloroquine	161 (98.8)
Azithromycin	151 (92.6)
Lopinavir/ritonavir	146 (89.6)
Remdesivir	1 (0.6)
Interferon-β-1b	28 (17.2)
Tocilizumab	75 (56.8)
Methylprednisolone	25 (18.9)

Categorical variables are expressed as No. (%) and continuous variables as median (Q1–Q3). Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; LDH, lactate dehydrogenase; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; S/CO, absorbance/cutoff; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate.

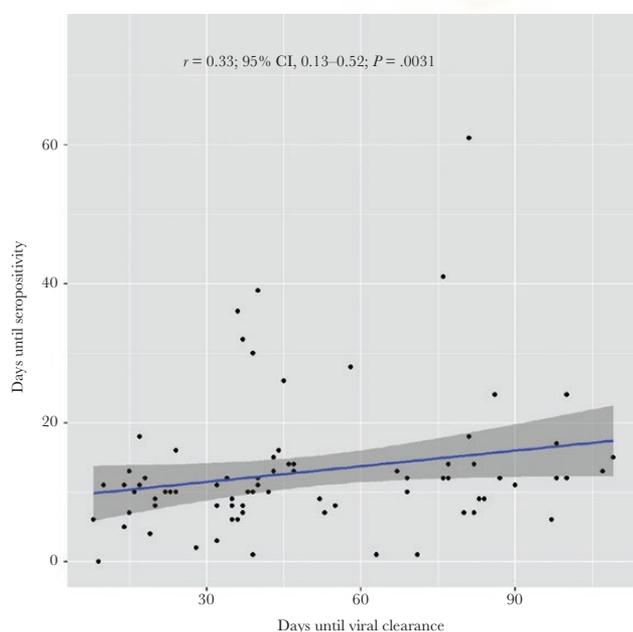


**Figure 1.** Correlation between peak viral load and time to seropositivity.

( $P = .009$ ) and positively associated with time to viral clearance ( $P = .004$ ) (Table 2).

#### Predictors of the Intensity of Antibody Response

Factors associated with peak antibody titers are shown in Table 2. Peak levels of S-IgG were associated with male sex ( $P = .003$ ), bilateral lung infiltrates ( $P = .004$ ), higher levels of CRP ( $P = .011$ ) and LDH ( $P = .005$ ), and lower lymphocyte count ( $P = .005$ ); there was a mild association with longer time to viral



**Figure 2.** Correlation between time to seropositivity and time to viral clearance.

clearance ( $P = .070$ ). When analyzed as a time-dependent variable, the titer of the antibodies was associated with the closest SARS-CoV-2 RNA ( $P < .001$ ) and with the area under the curve for the viral load ( $P < .001$ ).

In a generalized linear mixed-model analysis adjusted for the significant variables of the univariate analysis, levels of S-IgG were associated with bilateral lung infiltrates on admission ( $P = .011$ ), time-dependent SARS-CoV-2 RNA ( $P < .001$ ), the area under the curve for the viral load for each antibody titer ( $P = .001$ ), and time to viral clearance ( $P < .001$ ).

#### Predictors of Nonseroconversion

There were 33 (25%) patients who did not seroconvert. Patients' characteristics according to serostatus are shown in Table 3. Patients who did not seroconvert were older ( $P = .023$ ) and had more comorbidities, with a significantly higher Charlson comorbidity index score ( $P < .001$ ). The frequency of bilateral lung infiltrates was lower ( $P = .006$ ), and they had a shorter hospital stay ( $P = .010$ ). They were more likely to have SARS-CoV-2 RNA only detected in fecal samples ( $P < .001$ ). The median time to viral clearance (Q1–Q3) was 3.0 (1.0–12.0) days in seronegative patients and 41.0 (32.0–76.0) days in patients who seroconverted ( $P < .001$ ). The median Ct value was 38.0 (37.0–38.7) in patients who did not seroconvert and 28.04 (25.5–30.5) in those who seroconverted ( $P < .001$ ). Regarding COVID-19 therapy, patients who did not seroconvert were less frequently treated with LPV/r ( $P < .001$ ), interferon beta 1 b ( $P < .001$ ), tocilizumab ( $P < .001$ ), and steroids ( $P = .038$ ). The levels of several inflammatory biomarkers on admission were significantly lower in seronegative patients, including ferritin ( $P < .001$ ), fibrinogen ( $P = .001$ ), CRP ( $P = .023$ ), and LDH ( $P < .001$ ), and they had higher blood lymphocyte ( $P = .032$ ) and neutrophil ( $P = .001$ ) counts.

In the adjusted multivariate logistic regression including the significant variables of interest, with the exception of age because of multicollinearity with the Charlson index and the significant comorbidities that were also contained in the Charlson index, the predictors of nonseroconversion in patients with COVID-19 were a higher Ct of RT-PCR (odds ratio [OR], 1.87; 95% CI, 1.09–3.21;  $P = .023$ ), higher Charlson comorbidity index (OR, 1.35; 95% CI, 1.04–1.76;  $P = .027$ ), higher peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate ( $SpO_2/FiO_2$ ; OR, 1.014; 95% CI, 1.00–1.02;  $P = .036$ ), higher neutrophil count (OR, 1.38; 95% CI, 0.96–1.97;  $P = .081$ ), and lower fibrinogen levels (OR, 0.99; 95% CI, 0.99–1;  $P = .032$ ).

#### DISCUSSION

The reciprocal interactions between viral replication and the host immune response in patients with COVID-19 have not yet been characterized. Our study suggests a central role for SARS-CoV-2 viral load in the humoral immune response. Higher viral loads were associated with earlier antibody response, and, at the

**Table 2. Univariate and Multivariate Models for Predictors of Time to Seropositivity and Peak Antibody Titer**

Variable	Time to Seropositivity			Peak S-IgG titer		
	Coefficient	<i>P</i>	Adjusted <i>P</i> <sup>a</sup>	Coefficient	<i>P</i>	Adjusted <i>P</i> <sup>a</sup>
Sex, male	0.082	.226		2.262	.003	.8472
Age, y	-0.005	.037	.408	-0.018	.507	
Active smoking	0.085	.255		-0.270	.746	
Charlson comorbidity index	-0.040	.011	.149	-0.243	.182	
SOFA score on admission	-0.016	.555		-0.223	.497	
SpO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> on admission	0.000	.776		0.005	.383	
Bilateral lung infiltrates on x-ray	0.06952	.423		2.450	.004	.011
Microbiological data						
Peak log SARS-CoV-2 RNA, copies/sample	-0.048	.009	.009	-0.075	.727	
Log SARS-CoV-2 RNA				0.054	<.001	<.001
Cumulative RNA AUC	0.000	.891		0.003	.548	
Time to viral clearance	0.003	.042	.007	0.031	.070	<.001
Days to seroconversion	-			0.062	.157	
Biomarkers						
Interleukin-6, pg/mL	0.000	.581		0.004	.298	
Ferritin, ng/mL	0.000	.858		0.001	.616	
C-reactive protein, mg/L	0.000	.893		0.013	.011	.213
LDH	0.000	.630		0.013	.005	.150
Fibrinogen, mg/dL	0.000	.093		0.001	.573	
Lymphocytes, ×10 <sup>3</sup> /μL	0.079	.228		-2.069	.005	.290
Neutrophil	-0.030	.043	.2674	0.083	.634	
Neutrophil/lymphocytes	0.007	.595		0.081	.262	
D-dimer, μg/mL	-0.045	.126		-0.097	.779	
NT-proBNP, pg/mL	0.000	.213		-0.004	.129	
Outcomes						
Death	-0.007	.976		-2.016	.460	
ICU admission	0.323	.001		0.734	.519	

<sup>a</sup>Adjustment was performed by logistic regression.

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; AUC, area under the curve; COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; LDH, lactic dehydrogenase; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate.

other end of the spectrum, patients who did not seroconvert showed the lowest viral loads. On the other hand, the kinetics of the humoral immune response predicted the speed of viral elimination, so that earlier antibody response was associated with faster viral clearance.

The dynamics of the antibody response against SARS-CoV-2 are currently under investigation. In order to characterize the viral determinants of the antibody response, we analyzed a cohort of consecutive, unselected patients hospitalized for COVID-19 during the pandemic, with a wide spectrum of severity. Patients were thoroughly evaluated with serial nasopharyngeal and blood samples to assess virological and serological responses. Among the immunoglobulins, we opted for the analysis of IgG levels in order to assess the degree of activation of the humoral immune response [12] and focused on S-IgG, as it is potentially capable of eliminating the virus and might protect against reinfection [13]. We found that the amount of SARS-CoV-2 RNA was an important factor implicated in the humoral immune response against the virus. There was a correlation between viral load and time to seropositivity, and higher peak viral

loads were associated with earlier antibody release, whereas very low initial SARS-CoV-2 RNA levels were observed in patients who tested negative for S-IgG, suggesting that the induction of the adaptive humoral immune response might be dependent on the intensity of viral replication. In addition, viral load positively correlated with several other biomarkers of host response, as shown by the association with macrophage-induced molecules like ferritin or CRP, with lymphopenia as a likely reflection of the cytokine release [14], or the acute phase inflammation molecule fibrinogen or LDH, the latter reflecting tissue damage and associated with mortality [15].

Duration of viral shedding varies among COVID-19 patients, and the factors determining such differences need to be further disclosed. Older age, comorbidities, immunomodulatory therapy for COVID-19, and severity of disease have been linked with prolonged viral shedding [16–18]. Our study shows a positive correlation between time to antibody response and time to viral clearance, which would support the implication of the humoral immune response in viral elimination. Therefore, a delay in mounting the adaptive antibody response might contribute

**Table 3. Factors Associated With Nonseroconversion in Patients With COVID-19**

Variable	Nonseroconverter	Seroconverter	P	Adjusted <sup>a</sup> OR (95% CI)	P <sup>b</sup>
Sex, male	22 (66.7)	59 (59.6)	.539		
Age, y	71.0 (62.0–77.0)	60.0 (53.0–74.0)	.023	-	
Active smoking	14 (45.2)	58 (64.4)	.089		
Charlson comorbidity index	5.0 (3.0–7.0)	2.0 (1.0–4.0)	<.001	1.35 (1.04–1.76)	.027
Clinical status					
Days from symptom onset to admission	3.0 (1.0–8.0)	7.0 (4.5–10.0)	.004	-	
Days from symptom onset to treatment initiation	3.0 (2.0–10.0)	10.0 (6.5–14.0)	<.001	-	
SOFA score on admission	3.0 (1.0–3.2)	2.0 (2.0–3.0)	.705		
Median follow-up	63.0 (40.0–72.0)	80.0 (71.0–89.0)	<.001	-	
SpO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> on admission	380.8 (343–462)	350.0 (339–380)	.051	1.01 (1.00–1.02)	.036
Bilateral lung infiltrates on x-ray	9 (27.3)	54 (56.2)	.006	1.20 (0.28–5.23)	.809
Microbiological data					
SARS-CoV-2 detected only in fecal samples	8 (24)	0	.001		
Days from onset to first serological sample	6 (2–17)	10.0 (8.0–13.0)	.055		
Cycle threshold (E gen)	38 (37–38.7)	28.0 (25.5–30.5)	<.001	1.87 (1.09–3.21)	.023
Time to viral clearance	3 (1–12)	41.0 (32.0–76.0)	<.001		
Biomarkers					
Interleukin-6, pg/mL	20.7 (10–41.8)	25.6 (12.9–88.6)	.189		
Ferritin, ng/mL	132.0 (68.1–369)	377.5 (235–584)	<.002	0.99 (0.99–1)	.173
C-reactive protein, mg/L	35.3 (6.1–66.2)	50.3 (24.4–99.1)	.023	1.10 (0.73–1.66)	.002
LDH	188.2 (159–228)	249.5 (211–301)	<.001	1.00 (0.99–1)	.769
Fibrinogen, mg/dL	420.8 (263–554)	613.0 (440–782)	.001	0.99 (0.99–1)	.032
Lymphocytes, ×10 <sup>3</sup> /μL	1.4 (1.1–2.1)	1.2 (0.9–1.4)	.032	0.99 (0.88–1.12)	.951
Neutrophil	5.9 (4.9–8.6)	4.2 (3.3–6.2)	.001	1.38 (0.96–1.97)	.081
Neutrophil/lymphocytes	4.2 (3.3–6.2)	4.7 (3.5–6.6)	.001		
D-dimer, μg/mL	1.0 (0.4–2.1)	0.6 (0.4–1.2)	.121		
NT-proBNP, pg/mL	42.0 (7.4–161)	75 (41.2–200)	.068		
Outcomes					
Death	2 (6.1)	2 (2.0)	.260		
ICU admission	1 (3)	13 (13.1)	.188		
Hospital stay, d	10 (6.5–14)	13.0 (10.0–19.0)	.010		
Anti-COVID-19 therapy					
HCQ-based combinations	33 (100.0)	97 (98.0)	1.00		
Azithromycin	31 (93.9)	92 (92.9)	1.00		
Lopinavir/ritonavir	22 (66.7)	98 (99.0)	<.001		
Remdesivir		1 (1)	1.00		
Interferon-β-1b		28 (28.3)	<.001		
Tocilizumab	5 (15.2)	70 (70.7)	<.001		
Methylprednisolone <sup>b</sup>	2 (6.1)	23 (23.2)	.038		

<sup>a</sup>Adjustment was performed by logistic regression. Categorical variables are expressed as No. (%), and continuous variables as median (Q1–Q3).

<sup>b</sup>1 to 3 bolus of 125–250 mg of methylprednisolone.

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; LDH, lactic dehydrogenase; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; OR, odds ratio; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SpO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>, peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate.

to explaining the elongated viral shedding observed in a proportion of patients. Prolonged viral shedding was otherwise associated with higher levels of IgG, probably reflecting a higher release of antibodies due to prolonged exposure to the virus [16]. In addition to the virological, other factors were associated with the intensity of the antibody response. We found that greater severity of disease, as reflected by more extensive lung involvement, longer duration of hospital stay, and higher levels of inflammatory biomarkers, was positively associated with higher levels of S-IgG.

We identified a proportion of patients with COVID-19 who did not develop antibodies against the virus using 2 different assays to detect both total antibodies (including IgG, IgA, and IgM) against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the S protein and IgG antibodies against the internal nucleocapsid protein and surface S1 domain of the S protein. Serological analyses were obtained a median of 6 days after the onset of symptoms, and up to 63 days afterwards, which entails a wide enough interval as to detect seroconversion. To date, no studies have characterized patients with COVID-19 failing to generate the antibody response.

We found that these patients exhibited a differential clinical, biological, and virological profile. An interesting finding was that all but 1 of the nonseroconverters showed high cycle threshold values of RT-PCR. This would suggest that low SARS-CoV-2 viral load might be insufficient to stimulate adaptive humoral immunity and generate the antibody response. The reasons why some COVID-19 patients show such low viral loads remain unknown and might hypothetically include genetic factors related to susceptibility and/or immune response to the virus. Genetic factors could potentially lead to downregulation of ACE-2 receptors, which would hamper the entry of the virus into the cells [19]. In a proportion of these patients, SARS-CoV-2 RNA could only be detected in the feces, which could denote a barrier for viral entry in the respiratory tract cells. Nonseroconverters were older and had a higher frequency of comorbidities. Although not probably the most relevant, both factors might have partially contributed to the undetectable antibody titers, as a decline in the humoral response has been described with age and comorbidities [20, 21]. An alternative explanation for the seronegative status in COVID-19 patients might be the earlier intervention of the innate immune cells like neutrophils, interferon, or natural killer cells for viral clearance [1], before the adaptive immune response reached a significant level. Patients who did not generate antibodies showed higher levels of neutrophils. An early and efficient innate immune response might hypothetically have resulted in the low levels of viral shedding and low severity of disease observed in seronegative patients.

Limitations of the study include that SARS-CoV-2 RNA measurements were performed in upper respiratory tract samples, which may exhibit in some cases lower sensitivity than lower tract specimens. All patients received antiviral agents with potential effects on viral dynamics, and a majority of them also received immunomodulators, which might have a detrimental effect in the immune response; however, seronegative patients were less frequently treated with these drugs than those who seroconverted.

In conclusion, in patients with COVID-19, viral replication determines the magnitude of the humoral immune response. High viral load predicts an earlier antibody response, while nonseroconversion is linked with very low replication. In addition, the kinetics of the humoral immune response predicts the speed of viral elimination. Further investigation is warranted to deepen our understanding of host–virus interactions in patients with COVID-19 and to assess the outcomes of nonseroconverters after re-exposure to SARS-CoV-2.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at Open Forum Infectious Diseases online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

### Acknowledgments

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and the medical and nursing staff who were involved in their care (COVID19-Elx Group).

**Members of the COVID19-Elx Group.** Félix Gutiérrez, Mar Masía, Eduardo García, Antonia Mora, Sergio Padilla, Guillermo Telenti, Lucia Guillen, Cristina Bas, María Andreo, Fernando Lidón, Vladimir Ospino, Francisco López, Oscar Torregrosa, José López, Fernando Bonilla, Clara Escolano, Marta Fernández, Vanesa Agulló, Gabriel Estañ, María José Soler, Justo Grau, Lucía Zamora, Carlos Baeza, Antonio Ramón, Vicente Cantó, Ricardo Mora, Rafael Julio Simón, Irene Pascual, Javier García, Alejandro de la Torre, Cristina Martínez, Leticia Alonso, Joan Sanchis, Ángela Botella, Paula Mascarell, María Selene Falcón, Jose Carlos Asenjo, Carolina Ding, Lucía Gómez, María Fernández, Marian Fernández, Lucia Madero, Roberto Morales, Luis Marhuenda, Enrique Valdeolivas, and Carolina Garrido on behalf of COVID-19 ward nursing team.

**Financial support.** This work was supported by the RD16/0025/0038 project as a part of the Plan Nacional Research + Development + Innovation (R+D+I) and cofinanced by Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [grant numbers PI16/01740; PI18/01861; COV20-00005]).

**Potential conflicts of interest.** The authors: no potential conflicts of interest. The authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

**Author contributions.** M.M., G.T., and E.G. conceived the study and wrote the first draft; M.F. and V.A. performed the laboratory analyses; S.P., J.G.A., G.T., L.G., and P.M. participated in data acquisition; J.A.G. analyzed the data; all authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

**Patient consent.** The patients' written consent was obtained. The design of the work was approved by the Ethical Committee of the Hospital General Universitario de Elche (Spain).

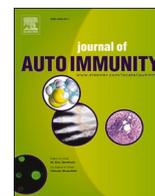
### References

- Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol* **2016**; 38:471–82.
- Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res* **2014**; 59:118–28.
- Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med* **2011**; 208:1377–88.
- Piedra FA, Mei M, Avadhanula V, et al. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS One* **2017**; 12:e0172953.
- McKechnie JL, Blish CA. The innate immune system: fighting on the front lines or fanning the flames of COVID-19? *Cell Host Microbe* **2020**; 27:863–9.
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. **2020**; 71:2027–34.
- Wang Y, Zhang L, Sang L, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest*. **2020**; 130:5235–44.
- Long Q, Tang X, Shi Q, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. **2020**; 26:1200–04.
- Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. **2020**; 71:1930–4.
- Liu X, Wang J, Xu X, Liao G, Chen Y, Hu CH. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* **2020**; 9:1269–74.
- Lee N, Chan PK, Ip M, et al. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *J Clin Virol* **2006**; 35:179–84.
- Xiao DAT, Gao DC, Zhang DS. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: the first report. *J Infect* **2020**; 81:147–78.
- Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**; 101:9804–9.

14. Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei EX, Rashidian M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: what it shows and what can be learned. *Immunol Lett* **2020**; 225:31–32.
15. Yan L, Zhang H, Goncalves J, et al. An interpretable mortality prediction model for COVID-19 patients. *Nat Mach Intell* **2020**; 2:283–8.
16. Jin C, Zhu L, Gao C, Zhang S. Correlation between viral RNA shedding and serum antibodies in individuals with coronavirus disease 2019. *Clin Microbiol Infect*. **In press**.
17. Qi L, Yang Y, Jiang D, et al. Factors associated with the duration of viral shedding in adults with COVID-19 outside of Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Int J Infect Dis* **2020**; 96:531–7.
18. Li TZ, Cao ZH, Chen Y, et al. Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding and factors associated with prolonged viral shedding in patients with COVID-19 [published online ahead of print July 9, 2020]. *J Med Virol*. **2020**; doi:[10.1002/jmv.26280](https://doi.org/10.1002/jmv.26280)
19. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ Res* **2020**; 126:1456–74.
20. Fulton RB, Varga SM. Effects of aging on the adaptive immune response to respiratory virus infections. *Aging Health* **2009**; 5:775.
21. Kwetkat A, Heppner HJ. Comorbidities in the elderly and their possible influence on vaccine response. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr* **2020**; 43:73–85.







## Durable antibody response one year after hospitalization for COVID-19: A longitudinal cohort study

Mar Masiá<sup>a,b,\*</sup>, Marta Fernández-González<sup>a</sup>, Guillermo Telenti<sup>a</sup>, Vanesa Agulló<sup>a</sup>, José A. García<sup>a</sup>, Sergio Padilla<sup>a,b</sup>, Javier García-Abellán<sup>a</sup>, Antonio Galiana<sup>c</sup>, Nieves Gonzalo-Jiménez<sup>c</sup>, Félix Gutiérrez<sup>a,b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

<sup>c</sup> Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

COVID-19  
SARS-CoV-2  
Antibody responses  
Anti-spike antibodies  
S-IgG  
Anti-nucleocapsid antibodies  
One year  
Humoral immune response  
Antibody titers  
Post-infection immunity

### ABSTRACT

**Objectives:** Durability of the humoral immune response to SARS-CoV-2 has yet to be defined. We longitudinally evaluated during a 12-month period the antibody responses to SARS-CoV-2, and analysed predictors of antibody titres decline and seroreversion.

**Methods:** Prospective study conducted in a cohort of patients hospitalized for microbiologically-confirmed COVID-19. Blood and nasopharyngeal samples were sequentially obtained during hospital stay and at 1, 2, 6 and 12 months after patients' discharge for measuring anti-spike (S) and anti-nucleocapsid (N) IgG antibody levels and SARS-CoV-2 RNA, respectively.

**Results:** 80 non-vaccinated patients were analysed. At month 12 after discharge, 73 (91.2%) patients exhibited detectable S-IgG and 35 (43.8%) N-IgG antibody titres. A gradual wane was observed in S-IgG and N-IgG antibody titres. Linear regression showed that S-IgG decline was positively associated with peak antibody titres (coefficient [95% CI] 0.059 [0.05–0.067],  $p < 0.001$ ), inversely with WHO severity score (coefficient [95% CI]  $-0.042$  [ $-0.079$ – $-0.004$ ],  $p = 0.033$ ), and there was a trivial positive association with age (coefficient [95% CI] 0.002 [0–0.005],  $p = 0.10$ ); N-IgG decline was positively associated with peak antibody titres (coefficient [95% CI] 0.091 [0.078–0.105],  $p < 0.001$ ). Logistic regression showed that seroreversion for S-IgG was inversely associated with peak S-IgG (OR 0.19; 95% CI, 0.04–0.45;  $p = 0.004$ ); seroreversion for N-IgG was inversely associated with peak N-IgG (OR 0.71; 95% 0.53–0.90;  $p = 0.009$ ) and positively with cycle threshold of RT-PCR (OR 1.14; 95% CI, 1.00–1.33;  $p = 0.062$ ).

**Conclusion:** Anti-spike IgG antibodies remain detectable one year after hospitalization for COVID-19. Higher peak antibody titres and disease severity were associated with increased durability of detectable antibodies.

### 1. Introduction

Characterization of postinfection immunity is essential when planning strategies to face the COVID-19 pandemic. The majority of individuals infected with SARS-CoV-2 develop antibodies against the nucleocapsid (N) and the spike (S) proteins [1]. The S-protein is a primary target for neutralizing antibodies, which can block viral entry and infection of host cells [2]. While existing information is still limited,

experimental and clinical data support that postinfection humoral immunity may protect against SARS-CoV-2 reinfection [3–6]. However, durability of the humoral immune response has yet to be defined. To date, the longest observation period assessing the longevity of the antibody response has been of 6–8 months [7–9].

We longitudinally evaluated the antibody responses to SARS-CoV-2 during a 12-month period in a cohort of patients hospitalized with COVID-19, and analysed predictors of antibody titres decline and

\* Corresponding author. Infectious Diseases Unit, Hospital General de Elche & Universidad Miguel Hernández, Camí de la Almazara S/N, Elche, Alicante, 03203, Spain.

\*\* Corresponding author. Infectious Diseases Unit, Hospital General de Elche & Universidad Miguel Hernández, Camí de la Almazara S/N, Elche, Alicante, 03203, Spain.

E-mail addresses: [mmasia@umh.es](mailto:mmasia@umh.es) (M. Masiá), [gutierrez\\_fel@gva.es](mailto:gutierrez_fel@gva.es) (F. Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102703>

Received 4 June 2021; Received in revised form 9 July 2021; Accepted 10 July 2021

Available online 20 July 2021

0896-8411/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**

Characteristics of patients according to seroreversion of anti-spike and anti-nucleocapsid IgG antibodies.

	Anti-spike IgG antibodies			Adjusted OR (95% CI)	Anti-nucleocapsid IgG antibodies			Adjusted OR (95% CI)
	12 month non-seroreversion N = 73	12-month seroreversion N = 7	P		12 month non-seroreversion N = 35	12-month seroreversion N = 45	P	
Sex, men	44 (60.3)	5 (71.4)	0.700		19 (54.3)	30 (66.7)	0.355	
Age	60 (53–69)	52 (38–66.5)	0.247		60 (58–71.5)	57 (46–67)	0.047	0.96 (0.91–1.02)
Comorbidity	43 (58.9)	6 (85.7)	0.239		22 (62.9)	27 (60.0)	0.821	
Highest WHO severity score (range)	4 (4–6)	4 (3–6)	0.261		4 (4–6)	4 (3–6)	0.584	
ICU admission	13 (17.8)	0	0.592		6 (17.1)	7 (15.6)	1.0	
Hospital stay, days	12 (9–17)	6 (4–9.5)	0.055	1.08 (0.86–1.44)	13 (9.5–16)	10.5 (6–13)	0.015	0.96 (0.85–1.09)
Peak SARS-CoV-2 RNA, copies/sample	5957 (1265–37,229)	13,015 (2580–27,723)	0.861		12,857 (5445–41,256)	2989 (830–27,723)	0.024	
Initial Ct, N-gen	32.6 (29.5–35.4)	32.6 (29.8–35.7)	0.965		30.5 (28.8–34.1)	33.8 (30.8–36.4)	0.019	1.14 (1.00–1.33)
Initial Ct, E-gen	30.1 (26.9–33.4)	30.4 (27.2–38.0)	0.982		28.8 (26–30.7)	32 (28.2–40)	0.016	
Days to viral clearance	20 (6–48)	35 (4–46)	0.862		20 (11–56)	20.5 (4–37.8)	0.303	
Days to seroconversion S-IgG	15 (12–20)	19 (12–67)	0.335		16 (12–22)	15 (12–19)	0.652	
Days to seroconversion N-IgG	12 (9–17)	17 (5.5–36)	0.623		11.5 (9–14.8)	13 (10–18)	0.238	
Peak S-IgG, S/CO	6.9 (6.2–12.4)	1.7 (1.6–3.3)	<0.001	0.19 (0.04–0.45)	7.1 (5.9–13.5)	6.6 (5.9–7.6)	0.150	
Peak N-IgG, S/CO	4.7 (4.1–6.7)	2.3 (1.6–3.8)	0.008	0.72 (0.30–1.31)	5.4 (4.4–9.4)	4.3 (3.5–4.9)	<0.001	0.71 (0.53–0.90)
COVID-19 immune therapy								
Steroids	15 (20.5)	1 (14.3)	1.0		8 (22.9)	8 (17.8)	0.587	
Tocilizumab	49 (67.1)	3 (42.9)	0.232		23 (65.7)	29 (64.4)	1.0	

Continuous variables are expressed as median (interquartile range) and categorical as number (%), unless indicated.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit; Ct, cycle threshold of SARS-CoV-2 RT-PCR; S-IgG, anti-spike-IgG; N-IgG, anti-nucleocapsid-IgG; S/CO, absorbance/cutoff.

seroreversion.

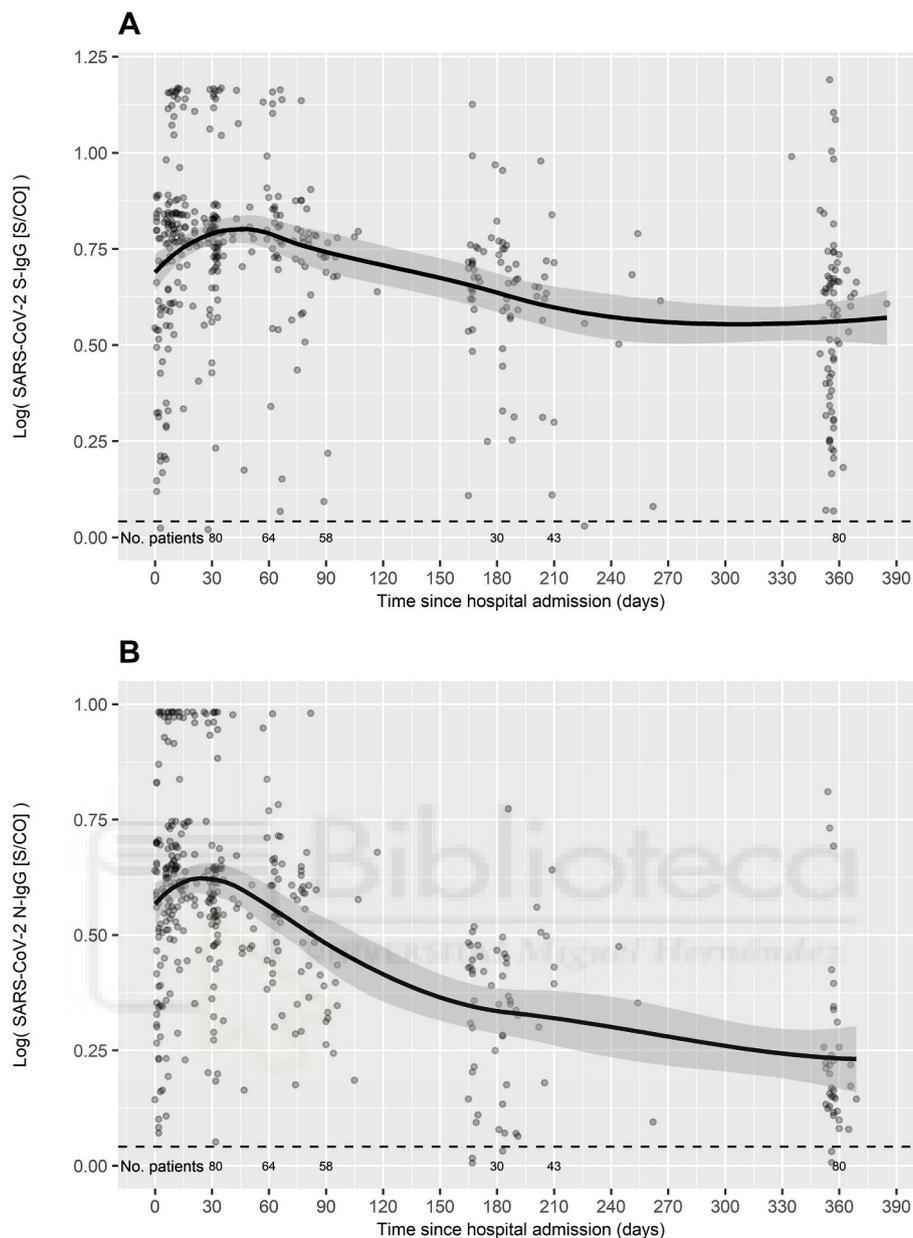
## 2. Methods

A prospective study was conducted in a cohort of patients hospitalized for microbiologically-confirmed COVID-19 with a positive SARS-CoV-2 RNA test in a nasopharyngeal sample in the first wave, who were longitudinally followed-up during 12 months; details of the cohort with preliminary, short-term results are provided elsewhere [6,10]. The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital General Universitario de Elche (Spain). Blood samples were sequentially obtained during hospital stay, and at 1, 2, 6 and 12 months after patients' discharge for measuring antibody levels. Nasopharyngeal samples to analyse SARS-CoV-2 RNA were also sequentially obtained until 6 months post-discharge. SARS-CoV-2-specific antibodies were measured in EDTA plasma samples. S-IgG and N-IgG were detected using commercial semiquantitative enzyme immunoassay kits (Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Germany) in an automated instrument (Dynex DS2 ELISA system) following the manufacturer's instructions. Antibody levels were evaluated by calculating the ratio of the optical density (OD) of the patient sample over the OD of the calibrator (sample OD/calibrator OD = S/CO [absorbance/cut-off]). Ratio <1.1 was defined as negative and ≥1.1 as positive. SARS-CoV-2 RNA was detected by RT-PCR targeting the E, and N genes (Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, Korea). Linear regression was performed to analyse factors associated with S-IgG and N-IgG antibody percent titres decline following peak levels, and logistic regression to analyse factors associated with seroreversion.

## 3. Results

Of 95 patients admitted for COVID-19 with subsequent detectable antibody titres and available blood samples until month 12, 80 were analysed after excluding 15 patients vaccinated during follow-up. Median (Q1-Q3) age was 59.5 (52–69) years, 49 (61.2%) were male, and 49 (61.2%) had coexisting comorbid diseases. Median (Q1-Q3) initial SARS-CoV-2 cycle threshold of RT-PCR was 30.1 (26.8–34.6) for E gen, 32.6 (29.5–35.5) for N gen, and RNA shedding lasted a median (Q1-Q3) of 20 (6–47) days. On admission, patients showed a median WHO 7-point ordinal scale value of 4, and 13 (16.3%) patients required non-invasive or invasive mechanical ventilation (score >4 points) (Suppl. Table 1). Median (Q1-Q3) time from symptom onset to seropositivity was 15 (12–21) days for S-IgG and 13 (9–17) days for N-IgG. Peak S-IgG was 6.9 (5.9–11.8) S/CO and peak N-IgG 4.6 (4–6.8) S/CO. No correlation was found between initial SARS-CoV-2 cycle threshold and peak antibody levels; for S-IgG,  $r$  (Pearson) was  $-0.005$  (95% confidence interval [CI],  $-0.246$ – $0.235$ ) for E gen and  $r = -0.031$  (95% CI,  $-0.269$ – $0.210$ ) for N gen; for N-IgG,  $r = -0.135$  (95% CI,  $-0.364$ – $0.108$ ) for E gen and  $r = -0.126$  (95% CI,  $-0.355$ – $0.117$ ) for N gen. We neither observed a correlation between WHO 7-point ordinal scale values and peak S-IgG levels ( $r = 0.123$ ; 95% CI,  $-0.100$ – $0.335$ ; 0.278) or N-IgG levels ( $r = 0.197$ ; 95% CI, 0.024–0.401;  $p = 0.080$ ). Peak antibody levels according to 7-point ordinal scale values are shown in supplementary Table 1. Patients with comorbidities tended to have a weaker S-IgG antibody response (peak S-IgG 6.4 [5.8–9.8] S/CO and 7.1 [6.4–13.8] S/CO in patients with or without comorbidities, respectively [ $p = 0.052$ ]), with no differences in N-IgG response (peak N-IgG 4.5 [3.7–6.5] and 4.7 [4.1–7.6] in patients with or without comorbidities, respectively [ $p = 0.45$ ]) (Suppl. Table 1).

At month 12 after COVID-19 diagnosis, 73 (91.2%) patients



**Fig. 1.** SARS-CoV-2 antibody kinetics. A, anti-spike IgG antibody titres; B, anti-nucleocapsid IgG antibody titres. S/CO, absorbance/cutoff; positive S/CO  $\geq$  1.1.

exhibited detectable S-IgG and 35 (43.8%) N-IgG antibody titres (Table 1). Fig. 1 shows the S-IgG and N-IgG antibody kinetics, where a gradual wane was observed in antibody titres during the 12-month follow-up. Linear regression including age, sex, WHO severity score and therapy with steroids and/or tocilizumab showed that S-IgG decline was positively associated with peak antibody titres (coefficient [95% CI] 0.059 [0.05–0.067],  $p < 0.001$ ), inversely with WHO severity score (coefficient [95% CI]  $-0.042 [-0.079/-0.004]$ ,  $p = 0.033$ ), and there was a trivial positive association with age (coefficient [95% CI] 0.002 [0–0.005],  $p = 0.10$ ); N-IgG decline was positively associated with peak antibody titres (coefficient [95% CI] 0.091 [0.078–0.105],  $p < 0.001$ ).

Median (Q1–Q3) time to seroreversion was 158 (109.5–201) days for S-IgG and 249 (180–351) days for N-IgG. Table 1 shows the factors associated with seroreversion for S-IgG and N-IgG. Seroreversion for S-IgG was inversely associated with peak S-IgG ( $p < 0.001$ ) and peak N-IgG ( $p = 0.008$ ), and there was a trend to an association with longer hospital stay ( $p = 0.055$ ). Logistic regression showed that lower peak S-IgG predicted S-IgG seroreversion with an OR = 0.19; 95% CI = 0.04–0.45; and  $p = 0.004$  (Table 1). Factors associated with N-IgG

seroreversion in univariate analysis were younger age ( $p = 0.047$ ), higher initial cycle threshold of RT-PCR for N gen ( $p = 0.019$ ) and E gen ( $p = 0.016$ ), lower peak N-IgG ( $p < 0.001$ ) and longer hospital stay ( $p = 0.015$ ). Logistic regression including the statistically significant variables showed an inverse association of seroreversion with peak N-IgG (OR 0.71; 95% CI, 0.53–0.90;  $p = 0.009$ ), and a marginal positive association with cycle threshold of RT-PCR (OR 1.14; 95% CI, 1.00–1.33;  $p = 0.062$ ).

#### 4. Discussion

This longitudinal study shows that anti-spike IgG antibodies remain detectable one year after acute infection in the majority of patients hospitalized with COVID-19. Conversely, more than half of patients lost the anti-nucleocapsid IgG antibodies during the follow-up period. Long-term persistence of antibodies was associated with higher peak antibody titres and marginally with lower initial cycle threshold values of SARS-CoV-2 RT-PCR. Higher severity of disease predicted slower anti-spike antibodies decline.

Durability of the antibody response has significant implications in the COVID-19 pandemic. We observed that anti-spike and anti-nucleocapsid IgG antibodies exhibited distinct kinetics, evidenced by longer durability of the former. Anti-spike antibodies are capable of neutralizing viral entry and provide protective immunity. In a study conducted in healthcare workers with a 6-month follow-up, the presence of anti-spike IgG antibodies was associated with a substantial reduction in the risk of reinfection [11]. Our study demonstrates an enduring anti-spike antibody response, of at least 12 months after hospital discharge in the majority of patients with moderate/severe COVID-19, which could theoretically imply that reduction in the risk of reinfection might also be extended to that period of time. This long-lasting humoral immunity should have implications when establishing priorities for vaccination. Likewise, further investigation is needed to assess whether it might also be extrapolated to durability of vaccine and need for boosting doses.

Seroreversion was associated with lower peak postinfection antibody titres, which supports the central role of the magnitude of the antibody response in the durability of detectable levels [12]. Despite the higher decline linked with greater peak antibody levels in our study, the highest titres also predicted a higher probability of persistent detectable antibodies up to one year. Severity of disease was another factor involved in the rate of decline of anti-spike antibody levels in our cohort, with an inverse association, and we found a trend to faster anti-spike antibodies decrease with older age. Aging has been associated with reduced production of naïve B cells from the bone marrow, and reduced growth and survival of pro-B lymphocytes as well as common lymphoid progenitors [13]. Finally, higher cycle threshold of SARS-CoV-2 RT-PCR was marginally associated with seroreversion, to which a weaker coexistent immune response might have had a contributing role.

The study included hospitalized patients, and results might not be generalizable to other scenarios, which is a limitation. However, detectable antibody titres have been described in asymptomatic or mildly symptomatic outpatients up to 8 months after infection [7], suggesting that several factors are involved in antibody dynamics. We did not measure the neutralizing activity of antibodies; however, we have recently introduced a new test that quantifies neutralizing antibodies concentration, and have found a strong correlation (>95%) with S-IgG concentrations in another sample of patients. Strengths are the longitudinal design and sequential samples obtained in all patients during a long time period.

In conclusion, our results demonstrate a durable anti-spike IgG antibody response at least one year after diagnosis in the majority of patients hospitalized with COVID-19. Higher peak antibody titres and severity of disease were associated with a higher likelihood of long-term detectable antibodies. This information contributes to expand knowledge of SARS-CoV-2 immune response and has direct implications in the adoption of preventive strategies and public health policies.

## Funding

This work was supported by the RD16/0025/0038 project as a part of the Plan Nacional Research Development Innovation (R + D + I) and cofinanced by Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [grant number PI16/01740; PI18/01861; CM 19/00160, COV20-00005]).

## Author statement

Mar Masiá: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft preparation, Supervision Marta Fernández: Investigation, Writing – review & editing Guillermo Telenti: Data curation, Writing - Review Vanesa Agulló: Investigation, Writing - Review José A. García: Formal analysis, Writing – review & editing Sergio Padilla: Software, Formal analysis, Writing – review & editing Javier García-Abellán: Data curation, Writing – review & editing Antonio Galiana: Investigation, Writing – review & editing, Nieves Gonzalo-Jiménez: Investigation, Writing – review & editing Félix Gutiérrez: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft preparation, reviewing and editing, Funding acquisition, Supervision.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102703>.

## References

- [1] J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang, W. Liu, X. Liao, Y. Su, et al., Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019, *Clin. Infect. Dis.* 71 (2020) 2027–2034, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>.
- [2] B. Ju, Q. Zhang, J. Ge, R. Wang, J. Sun, X. Ge, et al., Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection, *Nature* 584 (2020) 115–119, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2380-z>.
- [3] A. Chandrashekar, J. Liu, A.J. Martinot, K. McMahan, N.B. Mercado, L. Peter, et al., SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques, *Science* 369 (2020) 812–817, <https://doi.org/10.1126/science.abc4776>.
- [4] W. Deng, L. Bao, J. Liu, C. Xiao, J. Liu, J. Xue, et al., Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques, *Science* 369 (2020) 818–823, <https://doi.org/10.1126/science.abc5343>.
- [5] A.A. Addetia, K.H.D. Crawford, A. Dingens, H. Zhu, P. Roychoudhury, M.L. Huang, et al., Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with a high attack rate, *J. Clin. Microbiol.* 58 (2020), <https://doi.org/10.1128/JCM.02107-20>. e02107-2120.
- [6] M. Masiá, S. Padilla, A. Galiana, M. Fernández-González, F. Gutiérrez, Incidence of delayed asymptomatic COVID-19 recurrences in a 6-month longitudinal study, *J. Infect.* 82 (2021) 276–316, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.03.020>.
- [7] P.G. Choe, K.H. Kim, C.K. Kang, H.J. Suh, E. Kang, S.-Y. Lee, et al., Antibody responses 8 Months after asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection, *Emerg. Infect. Dis.* 27 (2021) 928–931, <https://doi.org/10.3201/eid2703.204543>.
- [8] A. Bal, M.A. Traub, J.B. Fassier, M. Rabilloud, K. Saker, C. Langlois-Jacques, et al., Six-month antibody response to SARS-CoV-2 in healthcare workers assessed by virus neutralization and commercial assays, *Clin. Microbiol. Infect.* 27 (2021) 933–935, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.003>.
- [9] J.M. Dan, J. Mateus, Y. Kato, K.M. Hastie, E.D. Yu, C.E. Faliti, et al., Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection, *Science* 371 (2021), eabf4063, <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>.
- [10] M. Masiá, G. Telenti, M. Fernández, J.A. García, V. Agulló, S. Padilla, et al., SARS-CoV-2 seroconversion and viral clearance in patients hospitalized with COVID-19: viral load predicts antibody response, *Open Forum Infect. Dis.* 8 (2021), <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab005>.
- [11] S.F. Lumley, D. O'Donnell, N.E. Stoesser, P.C. Matthews, A. Howarth, S.B. Hatch, et al., Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers, *N. Engl. J. Med.* 384 (2021) 533–540, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034545>, 384.
- [12] J. Seow, C. Graham, B. Merrick, S. Acors, S. Pickering, K.J.A. Steel, et al., Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans, *Nature Microbiol.* 5 (2020) 1598–1607, <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>.
- [13] V. Bajaj, N. Gadi, A.P. Spihlman, S.C. Wu, C.H. Choi, V.R. Moulton, Aging, immunity, and COVID-19: how age influences the host immune response to coronavirus infections? *Front. Physiol.* 11 (2021) 571416, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.571416>.





## **12 BIBLIOGRAFÍA**

---



## 12. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Holmes K V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2003 Jun 6;111(11):1605.
2. No Title [Internet]. Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
3. (ICTV) «International Committee on Taxonomy of Viruses. No Title.
4. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020 Apr 1;5(4):562–9.
5. Kuiken T, Fouchier RAM, Schutten M, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Van Riel D, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003 Jul 26;362(9380):263–70.
6. Wang M, Yan M, Xu H, Liang W, Kan B, Zheng B, et al. SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1860–5.
7. Wevers BA, van der Hoek L. Recently discovered human coronaviruses. *Clin Lab Med*. 2009 Dec;29(4):715–24.
8. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(6):439–50.
9. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol*. 2020 Mar 17;94(7).
10. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar 12;579(7798):270–3.

11. Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*. 2021 Apr 1;49(2):199–213.
12. Bottino E, Ponce AA. [Pulmonary innate immune response in Sars-cov-2 infection]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2022 Mar 7;79(1):33–42.
13. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Apr 15;306(8).
14. Gracia-Hernandez M, Sotomayor EM, Villagra A. Targeting Macrophages as a Therapeutic Option in Coronavirus Disease 2019. *Front Pharmacol*. 2020;11:577571.
15. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):81–93.
16. Nakayama M. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. *Front Immunol*. 2018;9:103.
17. Roberts AW, Lee BL, Deguine J, John S, Shlomchik MJ, Barton GM. Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity*. 2017 Nov;47(5):913-927.e6.
18. Suzuki T, Trapnell BC. Pulmonary Alveolar Proteinosis Syndrome. *Clin Chest Med*. 2016 Sep;37(3):431–40.
19. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev*. 2018 Jul;98(3):1417–64.
20. Franken L, Schiwon M, Kurts C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell Microbiol*. 2016 Apr;18(4):475–87.
21. Allard B, Panariti A, Martin JG. Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front Immunol*. 2018;9:1777.

22. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):363–74.
23. Gómez-Rial J, Rivero-Calle I, Salas A, Martínón-Torres F. Role of Monocytes/Macrophages in Covid-19 Pathogenesis: Implications for Therapy. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2485–93.
24. Otsuka R, Seino KI. Macrophage activation syndrome and COVID-19. *Inflamm Regen.* 2020;40:19.
25. Tzotzos SJ, Fischer B, Fischer H, Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care.* 2020 Aug;24(1):516.
26. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020 Mar;395(10229):1054–62.
27. Ravelli A. Macrophage activation syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2002 Sep;14(5):548–52.
28. Lerkvaleekul B, Vilaiyuk S. Macrophage activation syndrome: early diagnosis is key. *Open Access Rheumatol.* 2018;10:117–28.
29. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. Vol. 8, *The Lancet. Respiratory medicine.* 2020. p. 420–2.
30. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
31. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953–64.
32. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine

- mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998 Feb;101(4):890-8.
33. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):787-95.
  34. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014;5:614.
  35. Feng Y, Sun ZL, Liu SY, Wu JJ, Zhao BH, Lv GZ, et al. Direct and Indirect Roles of Macrophages in Hypertrophic Scar Formation. *Front Physiol.* 2019;10:1101.
  36. Braune J, Weyer U, Hobusch C, Mauer J, Brüning JC, Bechmann I, et al. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol.* 2017 Apr;198(7):2927-34.
  37. Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, et al. Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Jul;26(7):1597-607.
  38. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr;496(7446):445-55.
  39. Chen L, Zhang Z, Barletta KE, Burdick MD, Mehrad B. Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes during pneumonia: contribution of chemokine receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 Nov;305(10):L702-11.
  40. Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, et al. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Jan;280(1):L58-68.
  41. Ferreira AC, Soares VC, de Azevedo-Quintanilha IG, Dias S da SG, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, et al. Correction: SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. Vol. 7, *Cell death discovery.* 2021. p. 116.

42. Boumaza A, Gay L, Mezouar S, Bestion E, Diallo AB, Michel M, et al. Monocytes and Macrophages, Targets of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Clue for Coronavirus Disease 2019 Immunoparalysis. *J Infect Dis.* 2021 Aug;224(3):395–406.
43. Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater.* 2017 Feb;4(1):55–68.
44. Tatum D, Taghavi S, Houghton A, Stover J, Toraih E, Duchesne J. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Outcomes in Louisiana COVID-19 Patients. *Shock.* 2020 Nov;54(5):652–8.
45. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine.* 2020 Aug;58:102925.
46. Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, Cavalier E, Henket M, d’Emal C, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med.* 2020 Dec;217(12).
47. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 2018 Aug;174(5):1054–66.
48. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):698–708.
49. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol.* 2013 Feb;13(2):75–87.
50. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol.* 2015 Nov;16(11):1114–23.
51. Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017 Nov;17(11):665–78.

52. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Vol. 17, Cellular & molecular immunology*. 2020. p. 533–5.
53. Wen W, Su W, Tang H, Le W, Zhang X, Zheng Y, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov*. 2020;6:31.
54. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*. 2020 Jun;27(6):992-1000.e3.
55. Xia C.Q., Xu L.L., Wang Z., Qin Z.Q., Tong Z.H., Huang K.W., Xiao B., Qi M., Jiang B.Z. WC. The Involvement of Natural Killer Cells in the Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2004 Apr;121(4):507–11.
56. García M, Kokkinou E, Carrasco García A, Parrot T, Palma Medina LM, Maleki KT, et al. Innate lymphoid cell composition associates with COVID-19 disease severity. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(12):e1224.
57. Bozzano F, Dentone C, Perrone C, Di Biagio A, Fenoglio D, Parodi A, et al. Extensive activation, tissue trafficking, turnover and functional impairment of NK cells in COVID-19 patients at disease onset associates with subsequent disease severity. *PLoS Pathog*. 2021 Apr;17(4):e1009448.
58. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003 Sep;1(9):1897–905.
59. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan;327(5963):291–5.
60. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol*. 2007 May;178(10):6017–22.
61. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):803–15.

62. Yadav H, Kor DJ. Platelets in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Nov;309(9):L915-23.
63. Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin JL, et al. Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Apr;191(7):804–19.
64. Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir Med*. 2020 Jul;8(7):681–6.
65. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, Song Y, Feng F, Feng J, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235458.
66. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*. 2020 Jun;7(6):1012–23.
67. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Mar;323(11):1061–9.
68. Zaid Y, Puhm F, Allaeyes I, Naya A, Oudghiri M, Khalki L, et al. Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. *Circ Res*. 2020 Sep;127(11):1404–18.
69. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*. 2020 Sep;136(11):1317–29.
70. Bongiovanni D, Klug M, Lazareva O, Weidlich S, Biasi M, Ursu S, et al. SARS-CoV-2 infection is associated with a pro-thrombotic platelet phenotype. *Cell Death Dis*. 2021 Jan;12(1):50.
71. Conigliaro P, Triggianese P, Perricone C, Chimenti MS, Perricone R. COVID-19: disCOVERing the role of complement system. Vol. 38, *Clinical and experimental rheumatology*. Italy; 2020. p. 587–91.

72. Holter JC, Pischke SE, de Boer E, Lind A, Jenum S, Holten AR, et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Oct;117(40):25018–25.
73. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2016 Jul;38(4):471–82.
74. Salam N, Rane S, Das R, Faulkner M, Gund R, Kandpal U, et al. T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res*. 2013 Nov;138(5):595–608.
75. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol*. 2017;8:1960.
76. Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3):S197-211.
77. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021 Feb;184(4):861–80.
78. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020 Nov;183(5):1354-1366.e13.
79. Galani IE, Rovina N, Lampropoulou V, Triantafyllia V, Manioudaki M, Pavlos E, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol*. 2021 Jan;22(1):32–40.
80. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jun;26(6):842–4.
81. Schurink B, Roos E, Radonic T, Barbe E, Bouman CSC, de Boer HH, et al. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe*. 2020 Nov;1(7):e290–9.

82. Oja AE, Saris A, Ghandour CA, Kragten NAM, Hogema BM, Nossent EJ, et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T- and B-cell responses in severe but not mild COVID-19 patients. *Eur J Immunol*. 2020 Dec;50(12):1998–2012.
83. Szabo PA, Dogra P, Gray JI, Wells SB, Connors TJ, Weisberg SP, et al. Analysis of respiratory and systemic immune responses in COVID-19 reveals mechanisms of disease pathogenesis. *medRxiv : the preprint server for health sciences*. 2020.
84. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020 Jun;181(7):1489-1501.e15.
85. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020 Nov;183(4):996-1012.e19.
86. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020 Oct;183(1):158-168.e14.
87. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020 Nov;587(7833):270–4.
88. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021 Feb;34(6):108728.
89. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 2020 Jun;5(48).

90. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019 May;50(5):1132–48.
91. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to eight months after infection. *bioRxiv : the preprint server for biology*. 2020.
92. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020 Nov;183(4):1024-1042.e21.
93. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4(+) T Cells in COVID-19. *Cell*. 2020 Nov;183(5):1340-1353.e16.
94. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MRM. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:747–85.
95. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res*. 2020 Jul;69(3):379–88.
96. Sanz JM, Gómez Lahoz AM, Martín RO. [Role of the immune system in SARS-CoV-2 infection: immunopathology of COVID-19]. *Medicine*. 2021 May;13(33):1917–31.
97. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol*. 2020 Dec;21(12):1506–16.
98. Juno JA, Tan HX, Lee WS, Reynaldi A, Kelly HG, Wragg K, et al. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 Sep;26(9):1428–34.
99. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science*. 2020 Sep;369(6508):1210–20.

100. Wang H, Yuan Y, Xiao M, Chen L, Zhao Y, Zhang H, et al. Dynamics of the SARS-CoV-2 antibody response up to 10 months after infection. Vol. 18, Cellular & molecular immunology. 2021. p. 1832–4.
101. Wei J, Matthews PC, Stoesser N, Maddox T, Lorenzi L, Studley R, et al. Anti-spike antibody response to natural SARS-CoV-2 infection in the general population. Nat Commun. 2021 Oct;12(1):6250.
102. Havervall S, Jernbom Falk A, Klingström J, Ng H, Greilert-Norin N, Gabrielsson L, et al. SARS-CoV-2 induces a durable and antigen specific humoral immunity after asymptomatic to mild COVID-19 infection. PLoS One. 2022;17(1):e0262169.
103. Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, van Looy B, van den Berge M, Veenemans J, et al. Differences in Antibody Kinetics and Functionality Between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections. J Infect Dis. 2020 Sep;222(8):1265–9.
104. Petersen LR, Sami S, Vuong N, Pathela P, Weiss D, Morgenthau BM, et al. Lack of Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a Large Cohort of Previously Infected Persons. Clin Infect Dis. 2021 Nov;73(9):e3066–73.
105. Payne DC, Smith-Jeffcoat SE, Nowak G, Chukwuma U, Geibe JR, Hawkins RJ, et al. SARS-CoV-2 Infections and Serologic Responses from a Sample of U.S. Navy Service Members - USS Theodore Roosevelt, April 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020 Jun;69(23):714–21.
106. Ogega CO, Skinner NE, Blair PW, Park HS, Littlefield K, Ganesan A, et al. Durable SARS-CoV-2 B cell immunity after mild or severe disease. J Clin Invest. 2021 Apr;131(7).
107. Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. Sci Immunol. 2020 Dec;5(54).

108. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020 Oct;383(18):1724–34.
109. Lumley SF, Wei J, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, et al. The Duration, Dynamics, and Determinants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Antibody Responses in Individual Healthcare Workers. *Clin Infect Dis*. 2021 Aug;73(3):e699–709.
110. He Z, Ren L, Yang J, Guo L, Feng L, Ma C, et al. Seroprevalence and humoral immune durability of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Wuhan, China: a longitudinal, population-level, cross-sectional study. *Lancet*. 2021 Mar;397(10279):1075–84.
111. Roeker LE, Knorr DA, Pessin MS, Ramanathan L V, Thompson MC, Leslie LA, et al. Anti-SARS-CoV-2 antibody response in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2020 Nov;34(11):3047–9.
112. Cattaneo C, Cancelli V, Imberti L, Dobbs K, Sottini A, Pagani C, et al. Production and persistence of specific antibodies in COVID-19 patients with hematologic malignancies: role of rituximab. *Blood Cancer J*. 2021 Sep;11(9):151.
113. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Mar 19];15(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33382764/>
114. Alfego D, Sullivan A, Poirier B, Williams J, Adcock D, Letovsky S. A population-based analysis of the longevity of SARS-CoV-2 antibody seropositivity in the United States. *EClinicalMedicine*. 2021 Jun;36:100902.
115. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021 Feb;371(6529).
116. Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, Czartoski J, Lai L, Mantus G, et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-

- CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med*. 2021 Jul;2(7):100354.
117. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*. 2020 Jun;80(6):607–13.
  118. Amaral MC, Alves JD. Pathogenesis of multi-organ failure in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2009 May;8(6):525–8.
  119. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006 Sep;355(10):1018–28.
  120. Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, Andersson B, Andersson U. Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1991 Dec;78(11):2918–22.
  121. Esteban YM, de Jong JLO, Teshler MS. An Overview of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Pediatr Ann*. 2017 Aug;46(8):e309–13.
  122. Carter SJ, Tattersall RS, Ramanan A V. Macrophage activation syndrome in adults: recent advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2019 Jan;58(1):5–17.
  123. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Apr;368(16):1509–18.
  124. Machowicz R, Janka G, Wiktor-Jedrzejczak W. Similar but not the same: Differential diagnosis of HLH and sepsis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jun;114:1–12.
  125. Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood*. 2004 Aug;104(3):735–43.

126. Müller N, van den Brandt J, Odoardi F, Tischner D, Herath J, Flügel A, et al. A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1405–16.
127. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J. *Kuby Immunology*. 8th ed. US: Freeman WH & Co publisher. 2018.
128. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep;6(10):a016295.
129. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Vol. 395, *Lancet* (London, England). 2020. p. 1033–4.
130. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. Vol. 46, *Intensive care medicine*. 2020. p. 846–8.
131. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020 May;181(5):1036-1045.e9.
132. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020 Aug;369(6504):718–24.
133. Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpir W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics*. 2021;11(1):316–29.
134. Jenkins MR, Rudd-Schmidt JA, Lopez JA, Ramsbottom KM, Mannering SI, Andrews DM, et al. Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time. *J Exp Med*. 2015 Mar;212(3):307–17.
135. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res*. 2014 Aug;59(1–3):118–28.

136. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med*. 2011 Jul;208(7):1377–88.
137. Piedra FA, Mei M, Avadhanula V, Mehta R, Aideyan L, Garofalo RP, et al. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172953.
138. McKechnie JL, Blish CA. The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19? *Cell Host Microbe*. 2020 Jun;27(6):863–9.
139. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov;71(16):2027–34.
140. Wang Y, Zhang L, Sang L, Ye F, Ruan S, Zhong B, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest*. 2020 Oct;130(10):5235–44.
141. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020 Aug;26(8):1200–4.
142. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov;71(8):1930–4.
143. Liu X, Wang J, Xu X, Liao G, Chen Y, Hu CH. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. Vol. 9, *Emerging microbes & infections*. 2020. p. 1269–74.
144. Lee N, Chan PKS, Ip M, Wong E, Ho J, Ho C, et al. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *J Clin Virol*. 2006 Feb;35(2):179–84.

145. Ju B, Zhang Q, Ge J, Wang R, Sun J, Ge X, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*. 2020 Aug;584(7819):115–9.
146. Sakharkar M, Rappazzo CG, Wieland-Alter WF, Hsieh CL, Wrapp D, Esterman ES, et al. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol*. 2021 Feb;6(56).
147. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*. 2021 Mar;591(7851):639–44.
148. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020 Dec;370(6521):1227–30.
149. Haddad NS, Nguyen DC, Kuruvilla ME, Morrison-Porter A, Anam F, Cashman KS, et al. One-Stop Serum Assay Identifies COVID-19 Disease Severity and Vaccination Responses. *Immunohorizons*. 2021 May;5(5):322–35.
150. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021 Jan;184(1):169-183.e17.
151. Anand SP, Prévost J, Nayrac M, Beaudoin-Bussièrès G, Benlarbi M, Gasser R, et al. Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. *Cell Rep Med*. 2021 Jun;2(6):100290.
152. Egbert ER, Xiao S, Colantuoni E, Caturegli P, Gadala A, Milstone AM, et al. Durability of Spike Immunoglobulin G Antibodies to SARS-CoV-2 Among Health Care Workers With Prior Infection. *JAMA Netw Open*. 2021 Aug;4(8):e2123256.
153. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. 2021 Jul;595(7867):426–31.

154. Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling MJ, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*. 2021 Sep;71:103561.
155. Dehgani-Mobaraki P, Zaidi AK, Yadav N, Floridi A, Floridi E. Longitudinal observation of antibody responses for 14 months after SARS-CoV-2 infection. *Clin Immunol*. 2021 Sep;230:108814.
156. Alejo JL, Mitchell J, Chang A, Chiang TPY, Massie AB, Segev DL, et al. Prevalence and Durability of SARS-CoV-2 Antibodies Among Unvaccinated US Adults by History of COVID-19. Vol. 327, *JAMA*. 2022. p. 1085–7.
157. Mobaraki PD, Wang C, Floridi A, Floridi A, Zaidi AK. Long-Term Persistence of IgG Antibodies in recovered COVID-19 individuals at 18 months and the impact of two-dose BNT162b2 (PfizerBioNTech) mRNA vaccination on the antibody response. 2022. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.18.22269>.
158. Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *J Infect* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Nov 20];81(1):147–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32209385/>
159. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Jun 29 [cited 2022 Nov 20];101(26):9804–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210961/>
160. Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei EX, Rashidian M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunol Lett* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Nov 20];225:31. Available from: </pmc/articles/PMC7305732/>
161. Yan L, Zhang HT, Goncalves J, Xiao Y, Wang M, Guo Y, et al. An interpretable mortality prediction model for COVID-19 patients. *Nat Mach Intell*. 2020 May 14;2(5):283–8.

162. Jin CC, Zhu L, Gao C, Zhang S. Correlation between viral RNA shedding and serum antibodies in individuals with coronavirus disease 2019. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Nov 20];26(9):1280. Available from: [/pmc/articles/PMC7245297/](#)
163. Qi L, Yang Y, Jiang D, Tu C, Wan L, Chen X, et al. Factors associated with the duration of viral shedding in adults with COVID-19 outside of Wuhan, China: a retrospective cohort study. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Nov 20];96:531. Available from: [/pmc/articles/PMC7231495/](#)
164. Li TZ, Cao ZH, Chen Y, Cai MT, Zhang LY, Xu H, et al. Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding and factors associated with prolonged viral shedding in patients with COVID-19. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Nov 20];93(1):506. Available from: [/pmc/articles/PMC7362127/](#)
165. Liu W, Russell RM, Bibollet-Ruche F, Skelly AN, Sherrill-Mix S, Freeman DA, et al. Predictors of Nonseroconversion after SARS-CoV-2 Infection - Volume 27, Number 9—September 2021 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Nov 20];27(9):2454–8. Available from: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/9/21-1042\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/9/21-1042_article)
166. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res* [Internet]. 2020 May 5 [cited 2022 Nov 20];126(10):1456–74. Available from: [/pmc/articles/PMC7188049/](#)
167. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Nov 20];20(5):565–74. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309920301961/fulltext>

168. Shlomai A, Ben-Zvi H, Glusman Bendersky A, Shafran N, Goldberg E, Sklan EH. Nasopharyngeal viral load predicts hypoxemia and disease outcome in admitted COVID-19 patients. *Crit Care* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Nov 20];24(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7459243/](#)
169. Fulton RB, Varga SM. Effects of aging on the adaptive immune response to respiratory virus infections. *Aging health* [Internet]. 2009 Dec 12 [cited 2022 Nov 20];5(6):775. Available from: [/pmc/articles/PMC2822389/](#)
170. Kwetkat A, Heppner HJ. Comorbidities in the Elderly and Their Possible Influence on Vaccine Response. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr* [Internet]. 2020 [cited 2022 Nov 20];43:73–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32305984/>
171. Lustig Y, Mendelson E, Mandelboim M, Biber A, Levin EG, Cohen C, et al. Existence of immunological memory response in true sero-negative individuals post COVID-19 molecular diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2022 Mar;
172. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* [Internet]. 2021 Jan 20 [cited 2023 Mar 19];13(577):2223. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abd2223>
173. Gasser R, Cloutier M, Prévost J, Fink C, Ducas É, Ding S, et al. Major role of IgM in the neutralizing activity of convalescent plasma against SARS-CoV-2. *Cell Rep* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2023 Mar 19];34(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33596407/>
174. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2022 Nov 20];384(6):533–40. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2034545>
175. Castilla J, Lecea Ó, Salas CM, Quílez D, Miqueleiz A, Trobajo-Sanmartín C, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 and risk of COVID-19 in Navarre, Spain, May to July 2022. *Euro Surveill* [Internet]. 2022 Aug 18 [cited

- 2023 Mar 19];27(33). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35983774/>
176. SIREN - SARS-COV2 immunity and reinfection evaluation [COVID-19] [UPH] - Health Research Authority [Internet]. [cited 2023 Mar 19]. Available from:  
<https://www.hra.nhs.uk/planning-and-improving-research/application-summaries/research-summaries/siren-sars-cov2-immunity-and-reinfection-evaluation-covid-19-uph/>
177. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiology* 2020 5:12 [Internet]. 2020 Oct 26 [cited 2022 Nov 20];5(12):1598–607. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-00813-8>
178. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2023 Mar 19];371(6529). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33408181/>
179. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2023 Mar 19];595(7867):426–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34126625/>
180. Ko JH, Müller MA, Seok H, Park GE, Lee JY, Cho SY, et al. Serologic responses of 42 MERS-coronavirus-infected patients according to the disease severity. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Mar 19];89(2):106–11. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821364/>
181. Okba NMA, Stalin Raj V, Widjaja I, GeurtsvanKessel CH, De Bruin E, Chandler FD, et al. Sensitive and Specific Detection of Low-Level Antibody Responses in Mild Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 19];25(10):1868–77. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31423970/>

182. Callow KA. Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. *J Hyg (Lond)* [Internet]. 1985 [cited 2023 Mar 19];95(1):173–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2991366/>
183. Trivedi SU, Miao C, Sanchez JE, Caidi H, Tamin A, Haynes L, et al. Development and Evaluation of a Multiplexed Immunoassay for Simultaneous Detection of Serum IgG Antibodies to Six Human Coronaviruses. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Mar 19];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30718599/>
184. Agnihothram S, Gopal R, Yount BL, Donaldson EF, Menachery VD, Graham RL, et al. Evaluation of serologic and antigenic relationships between middle eastern respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses to develop vaccine platforms for the rapid response to emerging coronaviruses. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 19];209(7):995–1006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24253287/>
185. Gao X, Zhou H, Wu C, Xiao Y, Ren L, Paranhos-Baccalà G, et al. Antibody against nucleocapsid protein predicts susceptibility to human coronavirus infection. *J Infect* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Mar 19];71(5):599–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26165609/>
186. Chan KH, Cheng VCC, Woo PCY, Lau SKP, Poon LLM, Guan Y, et al. Serological responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection and cross-reactivity with human coronaviruses 229E, OC43, and NL63. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2023 Mar 19];12(11):1317–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16275947/>
187. Du L, Ma C, Jiang S. Antibodies induced by receptor-binding domain in spike protein of SARS-CoV do not cross-neutralize the novel human coronavirus hCoV-EMC. *J Infect* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 19];67(4):348–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685240/>

188. Bajaj V, Gadi N, Spihlman AP, Wu SC, Choi CH, Moulton VR. Aging, Immunity, and COVID-19: How Age Influences the Host Immune Response to Coronavirus Infections? *Front Physiol.* 2021 Jan 12;11:1793.
189. Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling MJ, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Mar 19];71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34455390/>



# 13 ANEXO I:

Figura suplementaria 1.

