



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

Evaluación clínica de la utilidad de la prueba de liberación de interferón- γ para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19.

Alba de la Rica Martínez

Directora de la Tesis

Dra. Dña. Mar Masiá Canuto

Codirectora de la Tesis

Dra. Dña. Marta Fernández González

Universidad Miguel Hernández de Elche



La presente Tesis Doctoral, titulada “Evaluación clínica del rendimiento de la prueba de liberación interferón- γ estandarizada para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- Masiá M*, **de la Rica A***, Fernández-González M, García JA, Padilla S, García-Abellán J, Botella Á, Mascarell P, Gutiérrez F. **Integrating SARS-CoV-2-specific interferon- γ release assay testing in the evaluation of patients hospitalized with COVID-19.** Microbiol Spectr. 2023 19:e0241923. doi: 10.1128/spectrum.02419-23.

*Masiá M y de la Rica A han contribuido igualmente en este trabajo.

- Fernández-González M, Agulló V, García JA, Padilla S, García-Abellán J, **de la Rica A**, Mascarell P, Masiá M, Gutiérrez F. **T-Cell Immunity Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Measured by an Interferon- γ Release Assay Is Strongly Associated With Patient Outcomes in Vaccinated Persons Hospitalized With Delta or Omicron Variants.** J Infect Dis. 2023 228(9):1240-1252. doi: 10.1093/infdis/jiad260.





La Dra. Dña. Mar Masiá Canuto, directora, y la Dra. Dña. Marta Fernández González, codirectora de la tesis doctoral titulada **“Evaluación clínica de la utilidad de la prueba de liberación de interferón- γ para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19”**.

INFORMAN:

Que Dña. Alba de la Rica Martínez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Evaluación clínica de la utilidad de la prueba de liberación de interferón- γ para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19”** 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 firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d'Alacant 7 de mayo de 2025

Directora de la tesis

Dra. Dña. Mar Masiá Canuto

Codirectora de la tesis

Dra. Dña. Marta Fernández González





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

INFORMA:

Que Alba de la Rica Martínez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Evaluación clínica de la utilidad de la prueba de liberación de interferón-y para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19”** 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 Sant Joan d’Alacant a 7 de mayo de 2025

Profa. Dra. Dña. Mar Masiá Canuto
Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho posible esta tesis doctoral y me gustaría agradecerse a cada una de ellas:

A la Dra. Mar Masiá, gracias por su incansable dedicación, por su vocación docente, por su paciencia infinita en la revisión de cada detalle, y, sobre todo, por abrirme las puertas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General de Elche y de la aventura que ha sido la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Marta Fernández, por esas largas conversaciones que siempre iban más allá de lo estrictamente académico. Su pasión por la investigación ha sido verdaderamente contagiosa, y su pasión por la vida aún más.

Al Dr. Félix Gutiérrez, porque su liderazgo visionario y su compromiso con la investigación han creado el ambiente ideal para el desarrollo de este trabajo. Gracias por su confianza en este proyecto y por fomentar un entorno de trabajo donde la excelencia científica y la colaboración van de la mano.

A las personas que forman la Unidad de Enfermedades Infecciosas, gracias por su apoyo diario y disposición constante. Sin su compañerismo y capacidad de trabajo en equipo, esta tesis no hubiera sido posible: Sergio, Javier, Paula, Ángela, Cristian, Rafa, Mar, Yolanda, Fina, Sabina, Cati, Araceli, Jenny, Susi y Amalia. A José Alberto, por la paciencia y por los millones de emails que ha contestado sin una sola queja. A Leo, por ser refugio en los momentos duros y risas en los buenos. A Melissa, por sus mil historias y sus reflexiones vitales en tan poco tiempo. A Vanesa, por encontrar siempre la palabra adecuada y la manera de allanar el camino.

Al Servicio de Microbiología, por ser mi casa durante tantos años: Benja, Maje, Alejandro, Elia, Fini, Isa, Luisa, Ana, Manoli, Mila, Mari Carmen, Antonio y Noemi. De manera especial a Nieves, por apoyarme siempre, a Montse por enseñarme tanto y a Melanie y a Antonio por mostrarme todas esas cosas que no se escriben en los libros. A Judith, Paqui, Lucía y Pilar por alegrarme el corazón tantos días.

Mi más profundo agradecimiento a mi familia por estar a mi lado en todas mis decisiones. A mi madre, porque es posible que le haga incluso más ilusión que a mí la finalización de esta tesis, como pasa con todos mis logros. A mi padre, por poner todos los peldaños necesarios para que llegase al sitio en el que estoy sin cuestionarme nunca. A mis hermanas Irene y Julia, por su complicidad, por escucharme y animarme en cada paso del camino. A Jordi, porque los problemas bajo las estrellas con una verde siempre son menos problemas. A Marc y a Carla, por las tardes que no he podido jugar con vosotros y me moría de ganas.

A mi marido Gabriel, por creer tanto en mí que me impulsa a intentar ser mejor cada día.

Esta tesis no sería lo que es sin la guía, la experiencia y el apoyo incondicional de todos ellos. Por todo ello, y por mucho más que no puede expresarse en palabras, gracias.





ÍNDICE



ÍNDICE

1.	RESUMEN EN INGLÉS Y CASTELLANO	17
2.	INTRODUCCIÓN... ..	23
	2.1 Características generales del virus	25
	2.2 Epidemiología.....	28
	2.3 Respuesta inmunitaria adaptativa y anticuerpos	30
	2.4 Vacunación	33
	2.5 Métodos para medir la inmunidad.....	35
	2.6 Criterios de infección por COVID-19.....	39
	2.7 Clasificación de gravedad en enfermos por COVID-19	41
	2.8 Liberación de interferón gamma	44
	2.9 Descripción de la prueba de liberación de interferón gamma como método diagnóstico	47
	2.10 Identificación de biomarcadores útiles para predecir la evolución clínica en COVID-19	49
3.	HIPÓTESIS.....	53
4.	OBJETIVOS.....	57
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
6.	RESULTADOS.....	67
7.	DISCUSIÓN.....	117
8.	CONCLUSIONES.....	129
9.	REFERENCIAS.....	133
10.	ARTÍCULOS.....	145
	- ARTÍCULO I. Integrating SARS-CoV-2-specific interferon- γ release assay testing in the evaluation of patients hospitalized with COVID-19	
	- ARTÍCULO II. T-Cell Immunity Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Measured by an Interferon- γ Release Assay Is Strongly Associated with Patient Outcomes in Vaccinated Persons Hospitalized With Delta or Omicron Variants	



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADCC Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ACE2 Enzima convertidora de angiotensina 2
CCI Índice de Comorbilidad de Charlson
CLIA Inmunoensayos quimioluminiscentes
CMH Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
COVID-19 Enfermedad por coronavirus 2019
cPass Ensayo de neutralización basado en células
Ct *cycle threshold* o umbral de ciclos en *PCR*
EDTA ácido etilendiaminotetraacético
ELISA Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
FiO2 Fracción inspirada de oxígeno
HGUE Hospital General Universitario de Elche
IAAN Técnicas de detección de ácidos nucleicos
IFN- γ Interferón gamma
IgG Inmunoglobulina G
IgM Inmunoglobulina M
IEFL Inmunoensayos de flujo lateral
IGRA Ensayo de liberación de interferón gamma
IL-6 Interleucina-6
LDH Lactato deshidrogenasa
MODS-CoV-2 Disfunción orgánica múltiple en el SARS-CoV-2
NLR Ratio neutrófilos-linfocitos
NPS Hisopo nasofaríngeo
OMS Organización Mundial de la Salud
ORF1ab *Open Reading Frame* 1ab
PCR Proteína C reactiva
PRNT Neutralización mediante reducción de placas
RBD Dominio de unión al receptor
RdRP *RNA-dependent RNA polymerase*
R0 Tasa de reproducción básica
Rt Tasa de reproducción efectiva
SARS-CoV-2 *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*
SDMO Síndrome de Modulopatía Disminuida
SDRA Síndrome de dificultad respiratoria aguda
SpO2 Saturación de oxígeno en sangre
TDAg Técnicas de detección de antígeno
Th1 Células helper 1
TP Tiempo de protrombina
TTPa Tiempo parcial de tromboplastina activada





1. RESUMEN Y ABSTRACT



RESUMEN EN CASTELLANO:

Introducción. La inmunidad mediada por células T es crucial para la protección contra la COVID-19 grave. Se desconoce el rendimiento de los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA) específicos del SARS-CoV-2 para medir las respuestas de las células T durante una infección aguda grave.

Métodos. Realizamos un análisis longitudinal prospectivo de pacientes hospitalizados por COVID-19 confirmado. Al ingreso, se midió un IGRA para SARS-CoV-2 cuantitativo estandarizado específico del SARS-CoV-2. El seguimiento duró 90 días. Se incluyeron 248 pacientes; 181 (73%) estaban vacunados, 142 (57,3%) estaban infectados con la variante Omicron y 106 (42,7%) estaban infectados con la variante Delta.

Resultados. El resultado de IGRA para SARS-CoV-2 fue positivo (>200 mUI/mL) en 125 (50,5%) pacientes, y de ellos, 44 (35,2%) mostraron una respuesta concomitante de IFN- γ inducida por mitógenos. En comparación con los pacientes con resultados negativos y dudosos, aquellos con IGRA para SARS-CoV-2 positivo eran más jóvenes y mostraron una menor frecuencia de comorbilidades coexistentes, una mediana más baja del índice de comorbilidad de Charlson, una menor frecuencia de puntuación de gravedad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) >4 , mayores valores del cociente saturación arterial periférica de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno (SpO_2/FiO_2) al ingreso, mayores respuestas de anticuerpos S-IgG y N-IgG y menor mortalidad a los 28/60/90 días. Estos hallazgos fueron consistentes tanto para las variantes Omicron como para Delta. Se observaron patrones similares a los descritos anteriormente en el subconjunto de pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo y respuestas indeterminadas inducidas por mitógenos, así como en aquellos que exhibían respuestas positivas tanto específicas del SARS-CoV-2 como de mitógenos. Veintiocho (11,3%) pacientes tuvieron resultados límite (100–200 mUI/mL) de IGRA para SARS-CoV-2 y compartieron varias similitudes con pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 negativo. En un modelo de Cox ajustado, se encontró que un resultado negativo de IGRA para SARS-CoV-2 era un predictor independiente de mortalidad. Utilizando un análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC), encontramos que un valor de IFN- γ de 150 mUI/mL se identificó como el punto de corte óptimo para predecir la mortalidad, con una sensibilidad del 79% [intervalo de confianza (IC) del 95%: 61-93], 61% (IC 95% 55-68) especificidad, 18% (IC 95% 15-22) valor predictivo positivo, 96% (IC 95% 93-98) valor predictivo negativo y un área bajo la curva (AUC) del 70%.

Conclusiones. La inmunidad preexistente contra el SARS-CoV-2 está fuertemente asociada con el desenlace clínico de los pacientes que requieren ingreso hospitalario por COVID-19. Las personas que muestran respuestas tanto de células T como de anticuerpos tienen el riesgo más bajo de experimentar un desenlace clínico desfavorable. El patrón de comportamiento del ensayo fue similar independientemente de los resultados de mitógenos o de la presencia de las variantes Delta u Omicron.

Palabras clave. Inmunidad celular; COVID-19; IGRA; mortalidad; Omicron; Delta; Enfermedades infecciosas; Variante.



RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT):

Introduction. T cell-mediated immunity is crucial for protection against severe COVID-19. The performance of SARS-CoV-2-specific IFN- γ release assays (IGRA) in measuring T cell responses during severe acute infection remains unknown.

Methods. We conducted a prospective longitudinal analysis of hospitalized patients with confirmed COVID-19. A standardized quantitative SARS-CoV-2-specific IGRA was measured at admission. Follow-up lasted 90 days. Two hundred forty-eight patients were included; 181 (73%) were vaccinated, 142 (57.3%) were infected with Omicron variant and 106 (42.7%) with Delta variant.

Results. SARS-CoV-2-IGRA was positive (>200 mIU/mL) in 125 (50.5%) patients, and 44 (35.2%) showed concomitant mitogen-induced IFN- γ response. Compared to patients with negative and indeterminate results, those with positive IGRA were younger, showed lower frequency of coexisting comorbidities, lower median Charlson comorbidity index, lower frequency of World Health Organization (WHO) severity score >4 , higher peripheral arterial oxygen saturation to fraction of inspired oxygen (SpO_2/FiO_2) ratio values at admission, higher S-IgG and N-IgG antibody responses, and lower 28/60/90-day mortality. These findings were consistent for both Omicron and Delta variants. Similar patterns were observed in the subset of patients with positive SARS-CoV-2-IGRA and indeterminate mitogen-induced responses, as well as in those exhibiting both SARS-CoV-2-specific and mitogen-positive responses. Twenty-eight (11.3%) patients had borderline (100–200 mIU/mL) SARS-CoV-2-IGRA results and shared several similarities with IGRA-negative patients. In an adjusted Cox model, negative SARS-CoV-2-IGRA result was found to be an independent predictor of mortality. Using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, an IFN- γ value of 150 mIU/mL was identified as the optimal cut-off point for predicting mortality, with 79% sensitivity [95% confidence interval (CI): 61-93], 61% (95% CI 55-68) specificity, 18% (95% CI 15-22) positive predictive value, 96% (95% CI 93-98) negative predictive value, and area under the curve (AUC) of 70%.

Conclusions. Pre-existing immunity against SARS-CoV-2 is strongly associated with patient outcomes in people requiring hospitalization for COVID-19. Individuals showing both T cell and antibody responses have the lowest risk of adverse outcomes. The assay behavior pattern was similar regardless of mitogen results or the presence of Delta or Omicron variants.

Keywords. T-cell immunity; COVID-19; IGRA; mortality; Omicron; Delta; Infectious diseases; Variant.





2. INTRODUCCIÓN



2. INTRODUCCIÓN

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL SARS-COV-2

2.1. Características generales del virus SARS-CoV-2

El virus Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), es el causante de la enfermedad conocida como COVID-19, que fue declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020 [1]. Pertenece a la familia Coronaviridea, dentro del género Betacoronavirus y guarda similitudes genéticas con otros coronavirus zoonóticos descritos en las dos últimas décadas como el SARS-CoV y el MERS-CoV [2].

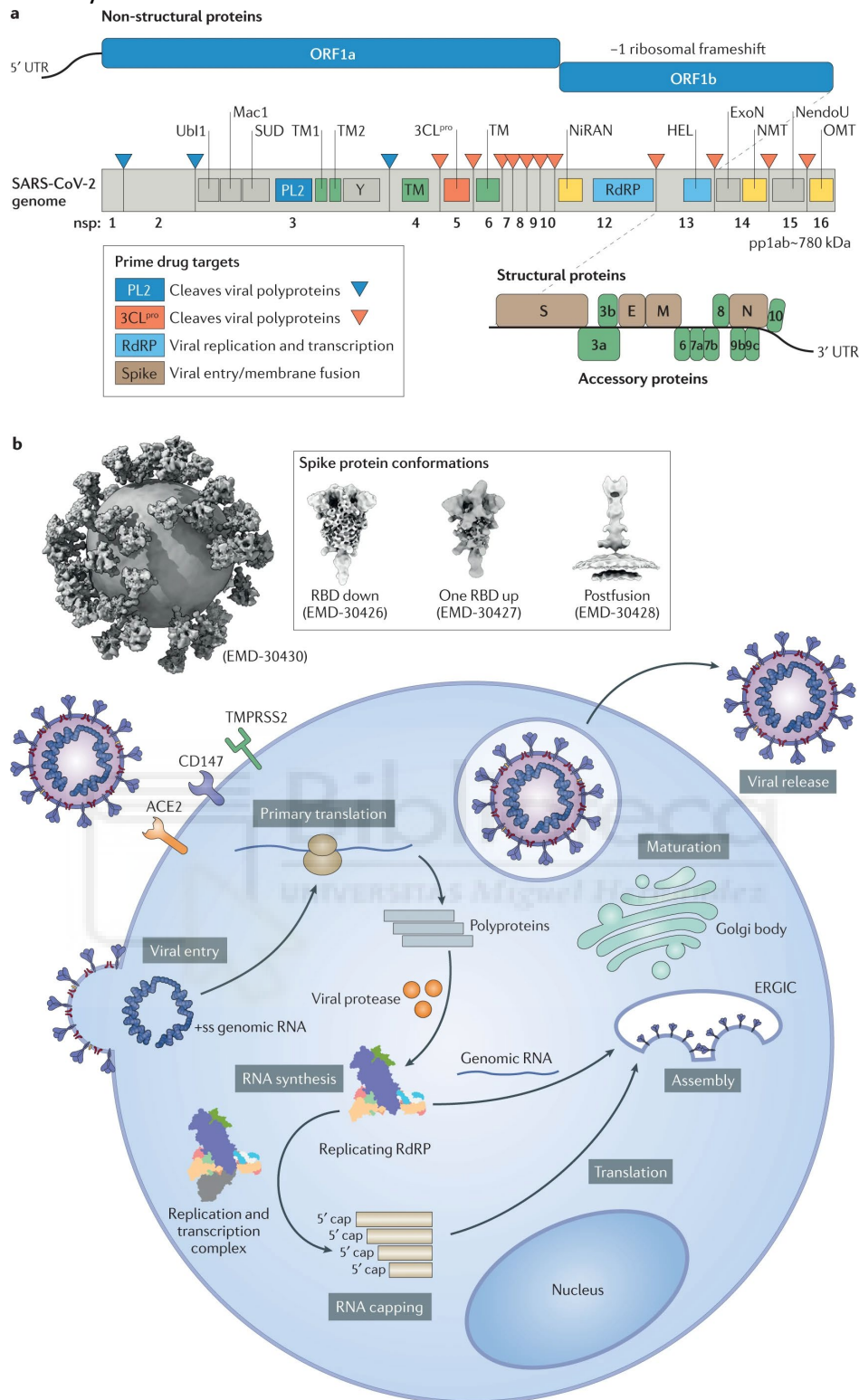
2.1.1 Estructura viral

El SARS-CoV-2 es un virus con envoltura externa que tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de alrededor de 30 kb [3]. Su estructura consta, además, de cuatro proteínas estructurales principales. Estas proteínas son: i) la proteína de la espícula (S) es la encargada de unirse al receptor y de fusionar membranas; constituye el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes y es fundamental en el desarrollo de vacunas [4]; ii) la proteína de la envoltura (proteína E) juega un papel importante en el proceso de ensamblaje y liberación del virus, iii) la proteína de la membrana (proteína M) es la más abundante en la superficie del virus y juega un papel en la formación de su estructura [5] y iv) la proteína de la nucleocápside (proteína N) se une al ARN viral y desempeña un papel crucial en el proceso de empaquetamiento del material genético del virus [6] (Figura 1).

2.1.2 Ciclo de replicación

El virus SARS-CoV-2 penetra en las células del cuerpo humano al interactuar la proteína S y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) [6]. Después de fusionarse las membranas y liberarse el material genético viral en el citoplasma, comienza la traducción de las poliproteínas virales y la replicación del ARN genómico. Las nuevas partículas virales se forman en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi antes de ser liberadas mediante exocitosis [6, 7].

Figura 1. Genoma y ciclo de vida del SARS-CoV-2.



Tomada de Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. Nat Rev Microbiol. 2021 ;19(11):685-700.

ERGIC, compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi; ExoN, exonucleasa; HEL, helicasa; Mac1, macrodominio 1; NendoU, endoribonucleasa específica de uridina; NiRAN, nucleotidiltransferasa asociada a la ARN polimerasa dependiente de ARN de nidovirus; NMT, guanina-N7-metiltransferasa; OMT, 2'-O-metiltransferasa; PL2, proteasa similar a papaína 2; RBD, dominio de unión al receptor; RdRp, ARN polimerasa dependiente de ARN; SUD, dominio único del SARS; ++, cadena sencilla de sentido positivo; TM, transmembrana; Ub11, dominio similar a ubiquitina 1; UTR, región no traducida.

En la Figura 1, se observa la organización del genoma del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), con dominios funcionales mostrados en rectángulos y los principales objetivos farmacológicos resaltados en el recuadro. La primera parte del ARN genómico del SARS-CoV-2, que codifica proteínas no estructurales (NSPs), puede traducirse directamente en dos poliproteínas (una poliproteína es una cadena única de polipéptidos unidos por enlaces peptídicos covalentes), pp1a y pp1ab, donde un cambio de marco de lectura -1 entre el marco de lectura abierto 1a (ORF1a) y ORF1b produce diferencias en la traducción.

Las dos poliproteínas son escindidas por proteasas virales, una proteasa similar a la papaína (PLpro) y una proteasa similar a 3C (3CLpro), para generar 16 NSPs y formar la maquinaria de replicación y transcripción. Los dominios con función importante dentro de cada NSP se muestran en la estructura del genoma. Los tres primeros cortes peptídicos son realizados por PLpro. Los restantes son escindidos por 3CLpro (también conocida como proteasa principal). La segunda parte del genoma de ARN codifica principalmente cuatro proteínas estructurales: la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M), la proteína de la envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N). Además de estas proteínas estructurales, también se codifican varias proteínas accesorias.

Asimismo, en la Figura 1b se presenta el ciclo de vida del SARS-CoV-2, incluyendo entrada viral, replicación y transcripción, ensamblaje y liberación. En la estructura nativa del SARS-CoV-2, las proteínas S pueden tener conformaciones de prefusión y posfusión. El SARS-CoV-2 entra en las células huésped a través de una vía de endocitosis mediada por interacciones entre la proteína S y ACE2. El ARN viral entra en el citoplasma tras la entrada, y luego ORF1a u ORF1ab es traducido por el ribosoma del huésped. Las poliproteínas virales se escinden en NSPs y se ensamblan en los complejos de replicación y transcripción. Los ARNm virales subgenómicos (después del capping) actúan como plantillas para la traducción de proteínas virales. Los viriones progenie se ensamblan en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Posteriormente, los viriones son exocitados para completar el ciclo de vida.

2.1.3 Diversidad genética

El virus SARS-CoV-2 ha mostrado una notable habilidad para mutar y evolucionar desde su aparición. Se han detectado diversas cepas que presentan distintas características de contagio y gravedad como las cepas Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron [8]. Su capacidad de mutación puede provocar la aparición de nuevas variantes más agresivas o no cubiertas por las actuales vacunas, planteando desafíos en cuanto al diagnóstico, tratamiento y prevención de la COVID-

19 [9].

2.1.4 Tropismo tisular

Si bien el SARS-CoV-2 afecta principalmente al sistema respiratorio, se ha comprobado su capacidad para infectar diversas clases de células y tejidos distintos al epitelio pulmonar. Además, también se ha identificado su presencia en células del endotelio, músculo cardíaco, riñón, sistema nervioso y tracto gastrointestinal. Esto podría explicar la variedad de síntomas clínicos que se manifiestan en los pacientes afectados por la COVID-19 [10].

La comprensión de los aspectos generales del SARS-CoV-2 es esencial para crear estrategias diagnósticas efectivas y medidas preventivas y terapéuticas eficientes. Entre estas estrategias, es posible incluir la evaluación de la respuesta inmune mediante pruebas como la liberación de interferón-gamma que se aborda en esta investigación y que nos permitiría conocer la respuesta inmunológica y la evolución clínica en pacientes con esta infección.

2.2. Epidemiología del SARS-CoV-2

La epidemiología del SARS-CoV-2 ha sido investigada en profundidad desde el comienzo de la crisis de COVID-19. Este apartado aborda los aspectos clave de la propagación y el impacto global del virus.

2.2.1 Origen y propagación inicial

El virus SARS-CoV-2 fue descubierto por primera vez en Wuhan (China), en diciembre de 2019 [11]. Aunque todavía se está investigando su origen exacto, se cree que proviene de un reservorio animal posiblemente relacionado con murciélagos y un huésped intermediario aún sin identificar definitivamente [12]. Debido al rápido alcance global de la enfermedad desencadenada por este virus, surgió una acción inmediata por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), declarando una emergencia sanitaria mundial el 30 de enero de 2020 y catalogándola como pandemia el 11 de marzo del mismo año [1, 13].

2.2.2 Transmisión

En cuanto a la transmisión, el SARS-CoV-2 se propaga mayormente a través de gotas respiratorias y aerosoles en espacios cerrados y mal ventilados [14]. También es posible la transmisión por superficies contaminadas [15]. El periodo de incubación promedio se sitúa alrededor de 5 a 6 días, pero puede extenderse desde 1 hasta 14 días [16].

2.2.3 Tasa de reproducción básica (R_0) y efectiva (R_t)

La tasa de reproducción básica (R_0) inicial del SARS-CoV-2 se estimó entre 2 y 3, indicando que cada persona infectada podía contagiar, en promedio, a 2-3 personas en una población totalmente susceptible [17]. Sin embargo, la tasa de reproducción efectiva (R_t) ha variado significativamente a lo largo del tiempo y entre diferentes regiones, influenciada por factores como las medidas de control, la inmunidad de la población y la aparición de nuevas variantes con características diferentes a la primera cepa del SARS-CoV-2 [18].

2.2.4 Variantes de preocupación

La evolución del virus SARS-CoV-2 ha generado diversas variantes, algunas de las cuales la OMS ha etiquetado como “variantes de preocupación”, debido a su mayor capacidad de contagio, virulencia o resistencia a la inmunidad [19]. Las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.135), Gamma (P.1), Delta (B.617.2), y Ómicron (B.1.529 y sublinajes), han tenido impactos significativos en el desarrollo de la pandemia en distintos momentos y lugares [20].

2.2.5 Impacto a nivel mundial y la carga de enfermedades

La crisis sanitaria originada por la pandemia de COVID-19 ha tenido un impacto a nivel global nunca antes visto en la salud pública y en la economía mundial. Hasta octubre de 2023, se han registrado más de 770 millones de casos confirmados y más de 6,9 millones de fallecimientos en todo el mundo [21]. No obstante, se estima que los verdaderos números de contagios y defunciones son considerablemente superiores debido al subregistro y las limitaciones en la capacidad para realizar pruebas en varios países [22].

2.2.6 Factores de riesgo y poblaciones vulnerables

Algunos sectores de la población tienen más probabilidades de sufrir enfermedad grave y fallecimiento a causa de COVID-19. Entre los factores de riesgo se encuentran la edad avanzada y la presencia de enfermedades crónicas previas (como problemas cardíacos o respiratorios crónicos), así como la obesidad, enfermedades respiratorias crónicas o inmunosupresión [23].

2.2.7 Estrategias de control y prevención

Desde el inicio de la pandemia, fue evidente que se necesitaban medidas drásticas para evitar la propagación del virus. Entre estas medidas, se incluyó el uso de mascarillas, el correcto lavado de manos, el distanciamiento social y restricciones a la movilidad de las personas, entre otras. También ha sido fundamental la creación y distribución de vacunas a partir del final del año 2020 para disminuir los efectos mortales asociados a la COVID-19.

A medida que la pandemia evoluciona hacia una fase endémica, los principales desafíos incluyen la vigilancia continua de nuevas variantes, la adaptación de las estrategias de vacunación, el manejo de las secuelas a largo plazo (síndrome conocido como Long COVID-19) y el fortalecimiento de los sistemas de salud global para futuras amenazas pandémicas [26].

2.3. Respuesta del sistema inmunitario adaptativo y generación de anticuerpos contra el SARS-CoV-2

La respuesta del sistema inmunitario adaptativo es fundamental para proteger al cuerpo contra el SARS-CoV-2. Destaca por su capacidad de ser específica y formar una memoria inmunológica duradera al activar tanto la respuesta de anticuerpos (inmunidad humoral) como la respuesta de células T (inmunidad celular).

2.3.1 Respuesta de las células T: Linfocitos T CD4+

Las células T CD4+ juegan un rol crucial en la regulación de la respuesta inmune adaptativa frente al SARS-CoV-2. Estas células producen citocinas que favorecen la diferenciación de células B y la generación de anticuerpos [28]. Además, ayudan a la activación y mantenimiento de las células T CD8+ [29] y pueden tener funciones efectoras directas contra las células infectadas [30].

Se ha observado que las células T CD4+, dirigidas contra el SARS-CoV-2, identifican principalmente determinantes de las proteínas de la espícula (S), la nucleocápside (N), y la membrana (M).

2.3.2 Respuesta de las células T: Linfocitos T CD8+

Las células T CD8+ citotóxicas desempeñan un papel fundamental en la eliminación de las células infectadas por un virus [32]. Estas células son esenciales para combatir las infecciones virales. Son las responsables de detectar y eliminar las células que muestran péptidos virales dentro del complejo MHC de clase I [33] y producen citocinas antivirales como IFN- γ y TNF- α [33, 34].

Se ha confirmado en investigaciones que las células T CD8+ dirigidas frente al SARS-CoV-2 se focalizan principalmente en epítomos de las proteínas S, N y M del virus. Este patrón es similar al de las células T CD4+ [35].

2.3.3 Respuesta de las células B y generación de anticuerpos

La respuesta de las células B y la producción de anticuerpos son elementos fundamentales en la respuesta inmune adaptativa contra el SARS-CoV-2. Este proceso destaca por ser específico y tener la capacidad de crear una memoria inmunológica duradera.

2.3.4 Activación y diferenciación de células B

Entre sus funciones está el reconocimiento de antígenos por parte de las células B, se produce cuando sus receptores (BCR) identifican los antígenos del virus [36]. Además, la activación de las células B necesita dos señales distintas, el reconocimiento del antígeno y la ayuda de las células T CD4+ foliculares (Tfh) [37].

Los linfocitos B activados se desplazan a los folículos linfoides para crear centros germinales, aquí experimentan hipermutación somática y selección de afinidad, lo que resulta en la producción de anticuerpos de alta afinidad [38]. Las células B pueden transformarse en células plasmáticas que fabrican anticuerpos o en células B de memoria [39].

2.3.5 Cinética de la producción de anticuerpos

La producción de anticuerpos en respuesta al SARS-CoV-2 sigue un patrón de evolución predecible. Los anticuerpos de tipo IgM suelen ser los primeros en manifestarse, siendo detectables entre 3 y 7 días después de que comienzan los síntomas. Tienden alcanzar su punto más alto alrededor de las 2 o 3 semanas y después disminuyen rápidamente [40]. En cuanto a las IgGs, suelen aparecer aproximadamente una semana después de que comienzan los síntomas y aumentan durante las siguientes 2 o 3 semanas y pueden permanecer por un largo período de tiempo incluso años [41]. Por último, las IgA son importantes en la inmunidad de las mucosas, incluyendo el tracto respiratorio. Se detectan temprano en la infección y pueden persistir durante varias semanas [42].

2.3.6 Especificidad de los anticuerpos

Los anticuerpos se dirigen contra distintas regiones del SARS-CoV-2:

1. Proteína de la espícula (S): Es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes. Dentro de la proteína S, el dominio de unión al receptor (RBD) es particularmente importante [43].
2. Proteína de la nucleocápside (N): Genera una fuerte respuesta de anticuerpos, aunque éstos no son neutralizantes [44].

3. Otras proteínas: Se han detectado anticuerpos contra otras proteínas virales como la proteína de la envoltura (E) y la proteína de la membrana (M), aunque en menor medida [45].

2.3.7 Funciones de los anticuerpos

Los anticuerpos que combaten el SARS-CoV-2 desempeñan múltiples roles, como la neutralización viral: los anticuerpos neutralizantes que se dirigen especialmente al RBD de la proteína S tienen la capacidad de evitar que el virus ingrese a las células al interrumpir su unión con el receptor ACE2 [46]. Así como la opsonización, que es un proceso en el que los anticuerpos cubren las partículas virales para ayudar a que sean identificadas y eliminadas por células fagocíticas según estudios previos [47]. También efectúan la activación del complemento los complejos antígeno-anticuerpo, que desencadenan la respuesta del sistema de complementos, produciendo lisis viral y aumento de la inflamación [48]. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) ocurre cuando los anticuerpos unidos a células infectadas pueden reclutar células NK para eliminar estas células infectadas [49].

2.3.8 Variabilidad en la respuesta de anticuerpos

La producción de anticuerpos puede diferir ampliamente entre personas debido a diversos factores como: i) la gravedad del cuadro clínico, que puede influir en la intensidad y duración de las respuestas de anticuerpos [50]; ii) Los individuos de edad avanzada pueden tener respuestas de anticuerpos menos eficaces [51]. iii) el estado del sistema inmunológico, que puede influir en la eficacia y cantidad de los anticuerpos generados [52] o iv) las variantes virales y sus mutaciones pueden tener un impacto en cómo los anticuerpos preexistentes reconocerán la proteína S [53].

2.3.9 Durabilidad de la respuesta de anticuerpos

La durabilidad de la respuesta de anticuerpos tiene implicaciones significativas en la pandemia de COVID-19. Observamos que los anticuerpos IgG anti-S y anti-N tienen cinéticas distintas, evidenciadas por una mayor durabilidad de los primeros. Los niveles de anticuerpos IgG contra el SARS-CoV-2 siguen siendo detectables por al menos 12 meses después de la infección grave/moderada en la mayoría de las personas [54]. Aunque los niveles de anticuerpos circulantes pueden disminuir con el tiempo, las células B de memoria pueden proporcionar una

respuesta rápida ante una reexposición al virus [55]. Se han encontrado células plasmáticas de largos periodos en la médula ósea de personas que se han recuperado del COVID-19, lo que indica la posibilidad de una continua producción de anticuerpos [56].

2.3.10 Implicaciones para el diagnóstico y las vacunas

La comprensión de cómo las células B responden y producen anticuerpos tiene implicaciones significativas, como, por ejemplo, permite realizar pruebas serológicas generando conocimiento de la cinética y especificidad de los anticuerpos frente al SARS-CoV-2 [57]. También está implicada en el desarrollo de vacunas contra este virus, que se centran principalmente en estimular la producción de anticuerpos que puedan neutralizar la proteína S [58]. En cuanto a las terapias centradas en anticuerpos monoclonales terapéuticos se fundamentan en el conocimiento de los anticuerpos neutralizantes de mayor eficacia [59]. Finalmente, la evaluación de la inmunidad se basa en la medición de anticuerpos como un signo de protección del sistema inmunológico; sin embargo, todavía no se ha determinado completamente la correlación exacta entre los niveles de anticuerpos y la protección contra infecciones [60].

2.4. Vacunación contra el SARS-CoV-2

La administración de vacunas contra el SARS-CoV-2 ha sido una pieza clave en la batalla contra la pandemia de COVID-19. Desde la rápida creación de las primeras vacunas hasta su distribución a nivel mundial, este procedimiento ha sido un punto de inflexión en el campo de la medicina y la salud pública.

2.4.1 Desarrollo de vacunas

La creación de vacunas contra el SARS-CoV-2 destacó por su rapidez excepcional. En menos de un año desde la detección del virus, se logró desarrollar y autorizar diversas vacunas para uso de emergencia. Este procedimiento, habitualmente extenso, se vio agilizado gracias a la cooperación científica e institucional a nivel global, a una inversión económica sustancial y a la implementación de tecnologías revolucionarias [61].

Las plataformas más importantes empleadas en la creación de vacunas contra el SARS-CoV-2 incluyen:

1. Vacunas de ARNm: Utilizan ARN mensajero encapsulado en nanopartículas lipídicas para instruir a las células a producir la proteína S del virus, induciendo una respuesta inmune [62].
2. Vacunas de vectores virales: Emplean virus modificados genéticamente (como

adenovirus) para transportar genes que codifican la proteína S del SARS-CoV-2 [63].

3. Vacunas de subunidades proteicas: Contienen fragmentos purificados de proteínas virales, generalmente la proteína S [64].

4. Vacunas inactivadas: Utilizan virus SARS-CoV-2 completos pero inactivados [65].

2.4.2 Eficacia y efectividad

Los estudios clínicos de fase 3 han confirmado una eficiencia notable de las vacunas en la prevención de casos graves de COVID-19 y en la reducción de hospitalizaciones y fallecimientos. Por poner un ejemplo ilustrativo: las vacunas basadas en ARNm demostraron una eficiencia superior al 90 % en la prevención de contagios sintomáticos [66].

2.4.3 Respuesta del sistema inmunológico

La vacunación contra el virus del COVID-19 induce tanto respuestas humorales como celulares. El papel clave en la prevención de la infección lo desempeñan los anticuerpos neutralizantes que se enfocan principalmente en la proteína Spike (S). A pesar de ello, la respuesta de las células T también resulta crucial, especialmente para garantizar una protección duradera y efectiva frente a las variantes virales [67].

Se han encontrado células T CD4+ y CD8+ específicas de SARS-CoV-2 en personas vacunadas, lo que contribuye a la inmunidad protectora. Estas células pueden identificar varios epítopos virales, no solo los de la proteína S, lo que podría ofrecer una protección más amplia contra las variantes emergentes [68].

2.4.4 Desafíos y posibles escenarios a venir

A pesar de los logros alcanzados en las campañas de vacunación, la aparición de variantes del SARS-CoV-2 con mayor transmisibilidad o potencial de escape inmunológico ha planteado preocupaciones sobre la eficacia a largo plazo de las vacunas actuales [69]. En relación a la duración de la inmunidad, aunque los datos iniciales son prometedores, aún se desconoce la duración exacta de la protección conferida por las vacunas, lo que podría requerir dosis de refuerzo periódicas [70]. Además, el acceso equilibrado y justo en todo el mundo sigue siendo un desafío ético y de salud pública, con una distribución desigual de vacunas entre naciones de ingresos altos y bajos [71]. También la resistencia a la vacunación en ciertos sectores de la población es un desafío para lograr la inmunidad colectiva [72].

El futuro de la vacunación contra el SARS-CoV-2 probablemente incluirá el desarrollo de vacunas de segunda generación que puedan ofrecer una protección más amplia contra

múltiples variantes, así como formulaciones que induzcan una inmunidad más duradera o que sean más fáciles de distribuir y administrar en entornos de recursos limitados.

En resumen, la vacunación contra el SARS-CoV-2 ha evidenciado ser un instrumento eficiente en la batalla contra la pandemia de COVID-19. No obstante, la investigación constante acerca de la reacción inmunológica generada por las vacunas incluyendo el análisis de la respuesta de células T sigue siendo fundamental para perfeccionar las estrategias de vacunación y abordar los desafíos por venir.

2.5. Métodos para medir la inmunidad frente a SARS-CoV-2

La medición precisa y confiable de la medida de la inmunidad contra el SARS-CoV-2 se ha posicionado como un elemento clave en la batalla contra la pandemia de COVID-19. Esta evaluación no solo resulta crucial para entender la respuesta tanto individual como poblacional ante la infección y las vacunas, sino que también desempeña un rol vital en las decisiones de salud pública y en la formulación de estrategias terapéuticas y preventivas. Los enfoques empleados para evaluar la respuesta inmune se centran mayormente en dos aspectos fundamentales del sistema inmunológico: la inmunidad humoral que involucra a los anticuerpos y la inmunidad celular coordinada por las células T.

2.5.1. Medición de la inmunidad humoral

La evaluación de la respuesta inmunitaria humoral se centra en detectar y cuantificar los anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 creados por células B del sistema inmunológico que desempeñan un papel crucial en neutralizar el virus y prevenir la reinfección. Los métodos más comúnmente utilizados para medir la inmunidad humoral incluyen pruebas de unión de anticuerpos y pruebas de neutralización.

2.5.1.1. Ensayos de unión de anticuerpos

Para detectar si hay anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en muestras de sangre o suero es crucial realizar estos ensayos, en algunos casos es posible cuantificar los niveles presentes de manera precisa y fiable. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

1. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es una técnica muy utilizada y versátil para detectar anticuerpos en diferentes contextos médicos y se ha adaptado rápidamente para la detección de anticuerpos relacionados al virus SARS-CoV-2, especialmente dirigidos hacia las proteínas S del virus y de la nucleocápside. Los antígenos virales se fijan en una superficie sólida como una placa de microtitulación y cuando se agrega la muestra del paciente, los anticuerpos

existentes se unen a los antígenos previamente fijados.

Después se incluye un segundo anticuerpo marcado con una enzima que se une a los anticuerpos presentes en el paciente. Por último, se introduce un sustrato que la enzima transformará en una señal visible, generalmente un cambio de color, que puede ser evaluado y cuantificado. El ensayo ELISA ofrece la ventaja de ser capaz de identificar distintas clases de anticuerpos (como IgG, IgM, IgA), dependiendo del diseño utilizado en la prueba. Esta característica resulta muy útil para determinar el orden cronológico de la respuesta inmunológica; normalmente los anticuerpos IgM son los primeros en aparecer, seguidos por los IgG que suelen perdurar por más tiempo en el organismo humano. La alta precisión y selectividad del método ELISA y su capacidad para analizar múltiples muestras al mismo tiempo lo convierten en una herramienta imprescindible para estudios epidemiológicos a gran escala [73].

2. Inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA): Los CLIA representan una evolución de los principios del ELISA, ofreciendo una mayor sensibilidad y un rango dinámico más amplio. En estos ensayos, los antígenos virales se unen a partículas magnéticas. Tras la adición de la muestra del paciente y la unión de los anticuerpos, se introduce un anticuerpo secundario marcado con una enzima. La diferencia clave radica en el uso de un sustrato quimioluminiscente que, al reaccionar con la enzima, produce luz en lugar de un cambio de color. La mayor ventaja de los análisis CLIA radica en su alta sensibilidad para detectar niveles muy bajos de anticuerpos. Asimismo, estos sistemas suelen estar automatizados, lo que facilita el procesamiento de una gran cantidad de muestras con poca intervención humana. Estos aspectos los convierten en herramientas especialmente útiles para entornos de laboratorio que requieren un alto rendimiento [74].

3. Las pruebas rápidas de flujo lateral son también conocidas como pruebas rápidas de anticuerpos y han ganado popularidad por su facilidad de uso y la rapidez en la obtención de resultados que ofrecen. Estas pruebas funcionan a través de un proceso de filtración en el que una muestra de sangre, suero o plasma se coloca en una tira reactiva y circula por ésta por capilaridad. Si en dicha muestra se encuentran anticuerpos, estos se unirán a antígenos virales conjugados a partículas coloreadas. Los anticuerpos anti-humanos capturan este complejo más tarde en la línea de prueba y generan una línea que se puede ver fácilmente. Si bien estas pruebas son rápidas (entregando resultados en 10-30 minutos) y fáciles de utilizar sin la necesidad de equipo especializado; por lo general tienen una sensibilidad y especificidad menores en comparación a ELISA o CLIA.

Además, suelen ser cualitativas o semi-cuantitativas lo que restringe su utilidad para una evaluación precisa de los niveles de anticuerpos; no obstante, su facilidad de uso las vuelve valiosas en entornos de atención primaria o estudios de campo donde el acceso a laboratorios equipados es limitado [75].

2.5.1.2 Ensayos de neutralización

Mientras que los ensayos de unión de anticuerpos detectan la presencia de anticuerpos que se unen al virus, los ensayos de neutralización van un paso más allá al evaluar la capacidad funcional de estos anticuerpos para prevenir la infección viral. Estos ensayos son cruciales para entender la eficacia protectora de la respuesta inmune.

1. Ensayos de neutralización mediante reducción de placas (PRNT): Se consideran los ensayos PRNT como la forma más precisa de medir los anticuerpos neutralizantes presentes en una muestra biológica determinada. El procedimiento implica la combinación del suero del paciente junto a una cantidad específica de virus activos conocidos. En esta mezcla se agrega células susceptibles a ser infectadas por el virus que no ha sido neutralizado y formar placas. Un análisis comparativo entre el número de placas resultantes en este ensayo y un control libre de anticuerpos sirve para evaluar el nivel de neutralización logrado. Aunque el examen PRNT ofrece datos importantes sobre la capacidad de neutralización de los anticuerpos, presenta varias restricciones en términos prácticos. En efectividad, necesita virus vivos y requiere instalaciones de nivel 3 de bioseguridad, lo que lo convierte en un proceso laborioso que puede tardar varios días en arrojar resultados. Estos obstáculos han sido el motor detrás del desarrollo de opciones más seguras y rápidas [76].

2. El ensayo de neutralización de pseudovirus: implica el uso de virus modificados que llevan la proteína S del SARS-CoV-2 pero que no son infecciosos para realizar pruebas experimentales. Estos pseudovirus están diseñados para incluir un gen informador que facilita la medición de la infección. Similar al método PRNT mencionado anteriormente, se combina el suero del paciente previamente a la adición de los pseudovirus a células susceptibles. Una ventaja destacada de este enfoque es su viabilidad en laboratorios de nivel 2 de bioseguridad, además es más eficiente en tiempo que el PRNT tradicional y permite una mayor productividad [77].

3. El ensayo de neutralización basado en células (cPass): Esta nueva prueba evalúa la capacidad de bloquear la unión entre el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S y el receptor ACE2. Su principal ventaja es que no necesita virus vivos ni cultivos celulares, lo que lo convierte

en una opción más segura y rápida que las pruebas tradicionales de neutralización. El cPass ha llamado la atención como una forma prometedora de detectar anticuerpos neutralizantes de manera más accesible a gran escala [78].

2.5.2 Medición de la inmunidad celular

La evaluación de la inmunidad contra el SARS-CoV-2 se ha centrado principalmente en la medición de anticuerpos; sin embargo, se está reconociendo cada vez más la importancia de la respuesta inmunológica mediada por células T. Estas células desempeñan un papel fundamental en coordinar la defensa del organismo y en eliminar directamente las células infectadas por el virus. La valoración de la inmunidad celular resulta especialmente relevante ya que algunos estudios sugieren que puede perdurar más tiempo que la respuesta de anticuerpos en ciertos individuos.

2.5.2.1 Ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA)

El IGRA ha sido adaptado de su uso original en el diagnóstico de tuberculosis para evaluar la respuesta de células T específicas contra el SARS-CoV-2. En este tipo de ensayo, se activan células T de sangre periférica mediante antígenos específicos del SARS-CoV-2, generalmente péptidos derivados de las proteínas S y N. Si las células T específicas están presentes, éstas generarán interferón gamma (IFN- γ) en respuesta a la estimulación.

El proceso implica incubar sangre completa o células mononucleares de sangre periférica junto a los antígenos virales durante un período de 16 a 24 horas. Posteriormente se cuantifica la cantidad de IFN- γ producido mediante ELISA.

Una ventaja importante del IGRA es su capacidad para detectar la inmunidad celular, que puede ser más duradera que la respuesta de anticuerpos y puede estar presente incluso en individuos que no han desarrollado una respuesta de anticuerpos detectable. Sin embargo, el IGRA presenta ciertas limitaciones puesto que implica el procesamiento rápido de las muestras, además es más complejo y costoso que las pruebas serológicas tradicionales. Por otro lado, la interpretación de los resultados puede resultar complicada debido a la variabilidad en la respuesta de las células T entre diferentes personas [79].

2.5.2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta muy útil que posibilita la descripción minuciosa de grupos particulares de células T y B relacionadas al virus específico en cuestión. En el contexto de la pandemia de COVID-19 se ha empleado para analizar la incidencia y características de las

células T relacionadas al SARS-CoV-2. Por lo general, las células mononucleares de la sangre periférica se exponen a antígenos virales y luego se marcan utilizando anticuerpos fluorescentes que reconocen marcadores de superficie celular y citocinas intracelulares. Esto facilita la identificación y conteo de diversos subconjuntos de células T (como CD4 + y CD8 +) y la evaluación de su capacidad para producir múltiples citocinas al mismo tiempo. La mayor ventaja de la citometría de flujo radica en su habilidad para ofrecer datos detallados acerca de los fenotipos celulares y su funcionamiento [80].

El ámbito de la evaluación de la respuesta inmunológica al SARS-CoV-2 está en continua evolución, surgiendo nuevas tecnologías y enfoques emergentes que prometen brindar un mayor entendimiento de la respuesta inmunológica.

2.6. Definición de criterios de infección por COVID-19

2.6.1. Criterios clínicos

La definición de los criterios de infección por COVID-19 ha evolucionado a lo largo de la pandemia, reflejando los avances en el conocimiento científico sobre el SARS-CoV-2 y las mejoras en las capacidades diagnósticas. Es crucial establecer criterios claros y estandarizados para garantizar una identificación precisa de los casos, lo que es fundamental para el manejo clínico, la vigilancia epidemiológica y las estrategias de control de la enfermedad. Los pacientes con COVID-19 experimentan diversos grados de gravedad, y el 80% de ellos tienen una infección leve. Aproximadamente el 15% de los casos desarrollan una enfermedad grave caracterizada por disnea, hipoxia y cambios pulmonares en las imágenes; el 5% están gravemente enfermos, con insuficiencia respiratoria por síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), shock y/o disfunción multiorgánica [81]. La activación excesiva de linfocitos y el aumento de mediadores proinflamatorios en pacientes con COVID-19 promueven el daño inmunomediado. El proceso hace que una enfermedad leve aumente en gravedad, y la afectación de un solo órgano progrese a disfunción orgánica múltiple en el SARS-CoV-2 (MODS-CoV-2). En casos graves, la enfermedad puede provocar SDRA, choque séptico, acidosis metabólica, disfunción de la coagulación y síndrome de Modulopatía Disminuida (SDMO). Las personas mayores con inmunidad reducida y comorbilidades son más susceptibles a infecciones graves. La edad media de las personas afectadas por complicaciones graves relacionadas con la COVID-19 oscila entre los 49 y los 56 años [82]. A medida que progresan los síntomas, los pacientes pueden desarrollar neumonía con SDRA, que requiere cuidados

intensivos. Los niños suelen ser asintomáticos o presentar síntomas leves. Los hombres y las mujeres tienen la misma susceptibilidad a la infección; sin embargo, los pacientes varones tienen un mayor riesgo de sufrir peor pronóstico [83]. Los síntomas incluyen fiebre, fatiga, tos seca, anorexia, mialgia, disnea y producción de esputo. La tasa de mortalidad aumenta con la edad, con un aumento significativo por encima de los 80 años. La tasa de mortalidad también aumenta con las comorbilidades, como la diabetes, la enfermedad cardíaca, la enfermedad renal crónica, la enfermedad pulmonar crónica y otros factores sociodemográficos. También se ha descubierto que un mayor riesgo de infección por SARS-CoV-2 se asocia a otras comorbilidades como hipertensión (27-30%), diabetes (19%) y enfermedad cardíaca coronaria (6-8%). Los estudios también han demostrado que los pacientes con COVID-19 grave desarrollan SDRA (67,3%), lesión renal aguda (28,9%), función hepática anormal (28,9%) y lesión cardíaca (23,1%) [84].

2.6.2. Criterios de laboratorio

2.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos (TAAN), son altamente sensibles y específicas y se han convertido en los métodos de referencia en el diagnóstico de las infecciones por SARS-CoV-2. En general, las TAAN detectan dianas específicas de SARS-CoV-2 incluidas en regiones codificantes de tres de las cuatro proteínas estructurales del virus: espícula (S), envuelta (E) y nucleocápside (N); así como en regiones que codifican proteínas no estructurales como el gen RdRP (RNA-dependent RNA polymerase), y/o las regiones ORF1ab (Open Reading Frame 1ab) y ORF8. Las distintas plataformas aprobadas están diseñadas para detectar dos o más de estas dianas, en diferentes combinaciones según los fabricantes [85].

2.6.2.2 Detección de antígenos virales

En la actualidad, se han desarrollado dos grandes grupos de técnicas de detección de antígeno (TDAg) de SARS-CoV-2. Las más usadas se basan en la inmunocromatografía o inmunoensayos de flujo lateral (IEFL), pero más recientemente se están comercializando inmunoensayos basados en técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) o enzimoimmunoensayo (EIA), de uso por el momento menos extendido. Tanto los IEFL como las TDAg automatizadas se basan en la detección de la nucleoproteína viral (proteína N). Su empleo en las pruebas de antígeno viene avalado por su abundancia en el virión (≈ 1000 copias que conforman la nucleocápside helicoidal), su longitud de 419 aminoácidos que sustenta varios determinantes antigénicos y por el hecho de que es una proteína interna en el virión y no unida a membrana, lo que facilita el proceso de extracción [86]. La sensibilidad de la prueba de antígeno depende en gran medida

de la carga vírica (cycle threshold [Ct] en *PCR*), la edad y la presencia y duración de los síntomas. La sensibilidad más alta de la prueba de antígeno se observó en pacientes sintomáticos, mayores de 50 años y asociados con un mayor riesgo de infectividad ($Ct < 25$), alcanzando el 100% en este escenario [87].

2.6.2.3 Detección de la respuesta inmune

Las pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 tienen como objetivo identificar una infección previa por SARS-CoV-2 o vacunación y pueden ayudar a confirmar la presencia de la infección actual [88].

2.7. Clasificación de pacientes afectados por COVID-19 según la gravedad

La crisis sanitaria del COVID-19 ha planteado un reto sin precedentes para los sistemas de salud en todo el mundo; no solo debido a su rápida propagación sino también por la amplia gama de síntomas clínicos que puede mostrar esta enfermedad. Desde casos sin síntomas hasta situaciones críticas que exigen cuidados intensivos; la COVID-19 ha revelado ser una enfermedad compleja y polifacética. En este escenario actual; la clasificación de los pacientes según la gravedad de su estado se ha convertido en un recurso esencial para el tratamiento clínico; la distribución equitativa de recursos y las decisiones terapéuticas.

Varias entidades de salud como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos han desarrollado sistemas de clasificación para estandarizar el abordaje de la atención médica y facilitar la comparación en investigaciones médicas. A pesar de algunas diferencias leves entre ellas, estas clasificaciones suelen coincidir al agrupar a los pacientes en categorías que van desde asintomáticos o afectados levemente hasta aquellos en estado crítico. La OMS presenta una clasificación que diferencia entre enfermedad leve, moderada, grave y crítica [89]. En el extremo más leve del espectro se encuentran pacientes que, si bien están infectados y pueden contagiar, muestran síntomas mínimos o incluso son asintomáticos. Estos individuos por lo general no necesitan ser hospitalizados, pero su identificación y su separación son fundamentales para frenar la propagación del virus.

La categoría de enfermedad leve abarca pacientes que experimentan síntomas como fiebre, tos, fatiga, pérdida del sentido del gusto y el olfato, y otros síntomas no específicos. A pesar de que estos pacientes pueden sentir malestar considerablemente, no muestran señales de neumonía o hipoxia. El tratamiento para estos casos generalmente se realiza de forma ambulatoria y se enfoca en el autocuidado, el control de los síntomas y la observación de signos

de empeoramiento [23, 88].

La transición a una etapa de enfermedad moderada representa un punto crítico significativo en el diagnóstico médico de los pacientes afectados por esta condición específica. Durante esta fase particular de la enfermedad respiratoria en discusión actualmente se puede observar la presencia de signos clínicos característicos o hallazgos radiológicos indicativos de neumonía; no obstante, es importante destacar que la saturación de oxígeno en sangre (SpO₂) se mantiene por encima del 90% sin requerir asistencia adicional. La atención y vigilancia médica en estos casos deberá ser más detallada y cercana para garantizar una evolución clínica favorable del paciente bajo consideración. En función de los elementos individuales que conforman el perfil de riesgo de cada paciente diagnosticado en este estadio y tomando en cuenta los recursos sanitarios disponibles en cada caso particular podría ser necesario considerar la hospitalización como medida preventiva o terapéutica adecuada.

La progresión hacia una enfermedad grave se manifiesta mediante síntomas de neumonía severos como una frecuencia respiratoria mayor a 30 respiraciones por minuto y dificultades para respirar significativas o un nivel de oxígeno en sangre por debajo del 90% en condiciones normales de aire ambiente. Estos pacientes suelen necesitar oxigenoterapia y una supervisión constante debido al riesgo de empeorar rápidamente y llegar a un estado crítico.

La clasificación más grave en el ámbito de la salud es la enfermedad crítica que abarca pacientes que han sufrido complicaciones potencialmente mortales como el síndrome de dificultad respiratoria aguda, sepsis o disfunción multiorgánica grave que necesitan atención especializada y cuidados intensivos que pueden incluir soporte respiratorio y otras medidas vitales de apoyo.

Es crucial señalar que la transición entre estas clasificaciones no sigue un patrón lineal ni predecible en todos los casos. Algunos pacientes pueden experimentar un empeoramiento repentino de su condición, pasando de una enfermedad inicialmente leve a un estado crítico en tan solo días o incluso horas. Este aspecto particular del COVID-19 resalta la necesidad de mantener una vigilancia constante y reevaluar regularmente la condición del paciente.

2.7.1 Factores de riesgo y comorbilidades

Además de los signos y síntomas clínicos existentes, hay varios factores extra que afectan la gravedad y el pronóstico de COVID-19. La edad avanzada se ha identificado de manera consistente como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad grave y la mortalidad. Los mecanismos subyacentes detrás de esta vulnerabilidad relacionada con

el envejecimiento son diversos, incluyendo una disminución global en la función inmunológica, una mayor prevalencia de comorbilidades y posiblemente una mayor expresión del receptor ACE2, el punto de entrada del virus en las células humanas.

Las enfermedades preexistentes como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tienen un papel importante en determinar la gravedad del COVID-19 [90]. Estas condiciones no solo aumentan el riesgo de complicaciones graves al contraer la infección, sino que también pueden dificultar el tratamiento clínico y empeorar la respuesta inflamatoria relacionada al virus.

2.7.2 Biomarcadores y pronóstico

En el campo de la investigación clínica se han identificado diversos biomarcadores que están relacionados a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades graves en el futuro. Un ejemplo de ello es la presencia común de linfopenia en casos severos y su asociación a un peor pronóstico. Asimismo, se ha observado que elevaciones en marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva y el dímero D entre otros, están ligados a la gravedad de la enfermedad y son indicadores de resultados desfavorables [91]. Estos marcadores biológicos no solamente brindan datos pronósticos importantes, sino que también ofrecen visiones sobre la fisiopatología de la enfermedad, indicando un estado de inflamación excesiva y trastornos de coagulación en los casos más severos.

2.7.3 Herramientas de evaluación y predicción

El avance en la creación de herramientas predictivas ha sido un tema de gran interés desde que comenzó la pandemia. Ejemplos como el COVID-GRAM, que utiliza 10 variables para predecir el desarrollo de enfermedad crítica, y el 4C Mortality Score, desarrollado en el Reino Unido para predecir la mortalidad hospitalaria, representan esfuerzos para sistematizar la evaluación del riesgo [92, 93]. Aunque estas herramientas son valiosas en su propósito original, es importante tener en cuenta que su interpretación debe estar siempre enmarcada dentro del contexto clínico individual y las condiciones locales.

2.7.4 Implicaciones para el sistema sanitario

La precisa estratificación de los pacientes conforme a la gravedad tiene implicaciones que trascienden el manejo clínico individualmente considerado. En el ámbito de la salud pública permite una asignación más efectiva de recursos al priorizar la atención intensiva, así como las intervenciones más agresivas para aquellos en mayor riesgo de resultados negativos. Para la investigación médica proporciona un marco estándar para evaluar nuevos tratamientos comparando resultados entre diversos estudios y poblaciones.

2.7.5 Evolución y adaptación del sistema de clasificación

Con el desarrollo de la pandemia se ha ampliado nuestro conocimiento sobre la enfermedad y como resultado también han evolucionado los enfoques para su clasificación. El surgimiento de nuevas variantes virales ha generado interrogantes acerca de la pertinencia de las clasificaciones actuales y si es necesario realizar ajustes para reflejar posibles modificaciones en la manifestación clínica o el avance de la enfermedad.

2.8. Liberación de interferón gamma

El interferón gamma (IFN- γ) es una citocina de suma importancia en la coordinación de la respuesta inmunológica, especialmente en la protección contra patógenos que se replican dentro de las células como virus y ciertas bacterias. Su participación en la defensa inmunológica ante el SARS-CoV-2 ha adquirido una relevancia extraordinaria durante la pandemia de COVID-19, no solo por su papel defensivo sino también por su potencial como indicador biológico en pruebas de diagnóstico y de seguimiento.

Características y atributos del interferón gamma.

El IFN- γ es una proteína dimérica producida mayoritariamente por las células T CD4+, llamadas *helper 1* (Th1), células T CD8+, conocidas como citotóxicas, y células *Natural Killer* (NK). Su estructura molecular le permite unirse específicamente a receptores específicos presentes en una amplia gama de células del sistema inmunológico y otros tipos celulares. Esta interacción desencadena una serie de señales dentro de la célula que resultan en la activación de múltiples genes relacionados directamente al sistema inmunológico [94].

La versatilidad de IFN- γ en la regulación de la respuesta del sistema inmunológico es notable y relevante, destacando entre sus diversas funciones la activación de los macrófagos para mejorar su capacidad fagocítica y microbicida que resultan fundamentales en la eliminación efectiva de agentes patógenos intracelulares. Adicionalmente, IFN- γ promueve la presentación de antígenos al incrementar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tanto de clase I como II en las células encargadas de presentarlos. Esta medida aumentará notablemente la aptitud del sistema inmunológico para identificar y reaccionar ante agentes extraños [95-96].

En el ámbito de la respuesta inmunológica adaptativa, el IFN- γ desempeña un papel fundamental para orientar el desarrollo de células T CD4+ hacia el fenotipo Th1. Esta inclinación hacia la respuesta Th1 resultan especialmente vital para combatir virus y otros agentes

patógenos que infectan las células. Adicionalmente, el IFN- γ posee una acción antiviral efectiva, al activar un mecanismo que inhibir la replicación y difusión viral en células infectadas y vecinas [97, 98].

La regulación de la respuesta inflamatoria es otra función crucial del IFN- γ . Controla la producción de otras citocinas y quimiocinas, afectando así el reclutamiento y activación de diferentes células del sistema inmunológico. Esta capacidad para coordinar la respuesta inmunológica convierte al IFN- γ en un componente fundamental en la protección del cuerpo, aunque también significa que su desregulación puede contribuir a enfermedades inflamatorias y autoinmunidad [99].

2.8.1 Liberación de interferón gamma en la infección por SARS-CoV-2

En el contexto particular de la pandemia la liberación de IFN- γ se ha revelado como un componente crucial de la respuesta inmune. Investigaciones más recientes han confirmado que la generación del IFN- γ se lleva a cabo en diferentes etapas de la infección y por diversos tipos celulares; cada uno presenta implicaciones críticas para el desarrollo de la enfermedad.

En las primeras etapas de la infección por el virus SARS-CoV-2 se ha observado que las células NK producen IFN- γ rápidamente. Esta reacción inicial forma parte de la primera línea de defensa contra el virus y ayuda a limitar su propagación inicial. La rapidez y eficiencia de esta respuesta temprana de IFN- γ puede ser crucial en el control inicial de la enfermedad y potencialmente en la gravedad posterior de la misma [100]. A medida que la respuesta inmune adaptativa se desarrolla, las células T específicas contra SARS-CoV-2 toman el relevo en la producción de IFN- γ . Estas células reconocen antígenos virales presentados por células infectadas o células presentadoras de antígenos, y responden produciendo IFN- γ junto con otras citocinas. Esta producción de IFN- γ por células T específicas es fundamental para la eliminación eficaz del virus y para la generación de una memoria inmunológica duradera [101].

Un descubrimiento importante en el ámbito de la investigación sobre la COVID-19 ha sido notar diferencias en los niveles de producción de IFN- γ entre pacientes que padecen la enfermedad de forma leve y aquellos que la sufren de manera grave. Diversas investigaciones han señalado que los pacientes afectados gravemente por la COVID-19 suelen exhibir una respuesta

comprometida o tardía en cuanto al IFN- γ , a diferencia de quienes desarrollan formas leves de la enfermedad. Este hallazgo insinúa que la capacidad para generar una respuesta sólida de IFN- γ podría ser un factor determinante en el control de la infección y en la prevención de complicaciones severas [102].

La memoria inmunológica impulsada por IFN- γ también ha sido objeto de una investigación exhaustiva. Observaciones posteriores en pacientes recuperados de COVID-19 han indicado que las células T de memoria específicas para el SARS-CoV-2 conservan su capacidad de producir IFN- γ varios meses después de la infección. Esta durabilidad en la respuesta del IFN- γ resulta alentadora desde la perspectiva de la inmunidad a largo plazo y tiene considerables implicaciones para el diseño y evaluación de vacunas [103].

La prueba de liberación de interferón gamma (IGRA), adaptada al ámbito de la COVID-19, ha surgido como un método importante para estudiar la respuesta inmunológica celular frente al SARS-CoV-2. El principio del IGRA para SARS-CoV-2 se basa en la activación de las células T de la sangre periférica utilizando antígenos específicos del SARS-CoV-2 y la medición de la producción de IFN- γ resultante. Este método facilita la detección y medición de la respuesta de las células T específicas contra el virus, ofreciendo una visión sobre la inmunidad celular que complementa los datos obtenidos de las pruebas serológicas convencionales [104].

Las aplicaciones del IGRA en el contexto de la COVID-19 son variadas y poseen un prometedor potencial. Uno de los aspectos más relevantes la evaluación de la respuesta inmune celular después de contraer la enfermedad natural o recibir la vacuna. Esto resultaría especialmente útil ya que los niveles de anticuerpos pueden decrecer a lo largo del tiempo, mientras que la inmunidad a través de las células T tiende a ser más perdurable. El IGRA también se ha mostrado eficaz para identificar la presencia previa de SARS-CoV-2 en situaciones donde la respuesta de los anticuerpos es mínima o no detectable. Esto es especialmente útil en personas asintomáticas o con síntomas leves [105, 106].

Una de las ventajas del IGRA es su alta especificidad para la respuesta inmunológica contra el SARS-CoV-2. Al emplear antígenos virales específicos en el análisis es capaz de diferenciar la respuesta frente al SARS-CoV-2 y la respuesta ante otros coronavirus estacionales de manera efectiva. Además de esto, el IGRA tiene la capacidad de identificar una respuesta inmunológica celular aun en ausencia de anticuerpos detectables, lo cual lo convierte en una herramienta valiosa para evaluar la inmunidad en poblaciones donde la seroprevalencia es baja [107].

Sin embargo, el IGRA también tiene ciertas restricciones que es necesario tener en cuenta. El ensayo implica un procesamiento rápido de las muestras lo que puede resultar complicado logísticamente en algunos contextos. Asimismo, la interpretación de los resultados puede ser difícil debido a la variabilidad natural en la respuesta de las células T entre personas [108].

2.8.2 Implicaciones clínicas y de investigación

La comprensión del papel de IFN- γ en la COVID-19 tiene repercusiones significativas tanto en la práctica clínica como en la investigación médica. En el ámbito clínico, vigilar la liberación de IFN- γ puede ofrecer información importante sobre la calidad y duración de la respuesta del sistema inmunológico celular; esto resulta especialmente relevante para el seguimiento de pacientes recuperados y para evaluar a largo plazo la efectividad de las vacunas [109]. En la creación de vacunas contra el COVID-19, el análisis de la producción de IFN- γ ha adquirido relevancia en las pruebas de eficiencia. Se considera que la habilidad de una vacuna para estimular una reacción sólida en células T generadoras de IFN- γ es un signo positivo de su capacidad para desarrollar una protección duradera [110]. Desde un punto de vista de evaluación del riesgo, la cantidad de IFN- γ producido podría ser útil para reconocer a los pacientes en mayor riesgo de desarrollar una enfermedad grave en el futuro. Estos datos podrían resultar útiles al momento de tomar decisiones sobre tratamientos y cuidados clínicos [111]. La exploración del rol de IFN- γ en la COVID-19 también ha motivado la investigación de terapias que se basan en interferones. Algunos estudios han investigado el potencial uso de IFN- γ u otros tipos de interferones como tratamiento para la COVID-19; los resultados iniciales sugieren un beneficio posible sobre todo cuando se administran al principio de la enfermedad [112].

La liberación de interferón gamma es fundamental para la respuesta inmunológica ante el SARS-CoV-2 y tiene implicaciones que van desde la enfermedad hasta el desarrollo de herramientas diagnósticas y terapéuticas. El análisis de la producción de IFN- γ , especialmente a través de pruebas como el IGRA, proporciona una ventana única para comprender la inmunidad celular en relación a la COVID-19.

2.9. Descripción de la prueba de liberación de interferón gamma como método diagnóstico

La prueba de liberación de interferón gamma (IGRA), conocida en inglés como IGRA test (*Interferon Gamma Release Assay*), se ha convertido en una herramienta valiosa para diagnosticar y evaluar la respuesta inmunológica celular al SARS-CoV-2. Inicialmente concebida para identificar la tuberculosis latente, esta prueba se ha adaptado rápidamente para ser

utilizada en el contexto de la COVID-19, proporcionando una visión única sobre la inmunidad desencadenada por las células T.

2.9.1 Principio de la prueba

El IGRA se fundamenta en la premisa de que las células T de memoria generarán IFN- γ como parte de su respuesta inmunológica al entrar en contacto nuevamente con antígenos específicos del patógeno previamente reconocidos por ellas. En el contexto del COVID-19, la prueba evalúa la liberación de IFN- γ por parte de las células T al ser estimuladas por antígenos específicos del SARS-CoV-2 [113].

Metodología

El proceso estándar para llevar a cabo una prueba de IGRA implica seguir los pasos que se detallan a continuación [114]:

1. Obtención de la muestra: Se extrae sangre completa del paciente, generalmente utilizando tubos especiales que contienen anticoagulantes y que pueden incluir los antígenos específicos del SARS-CoV-2.
2. Estimulación antigénica: La sangre se incuba con péptidos antigénicos derivados de proteínas del SARS-CoV-2, típicamente de la proteína de la espícula (S) y de la nucleocápside (N). Se incluyen también controles positivos (generalmente fitohemaglutinina) y negativos.
3. Incubación: Las muestras se incuban durante 16-24 horas a 37°C, permitiendo que las células T específicas, si están presentes, produzcan IFN- γ en respuesta a los antígenos.
4. Cuantificación de IFN- γ : Después de la incubación, se separa el plasma y se mide la concentración de IFN- γ , generalmente mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
5. Interpretación de resultados: Se calcula la diferencia entre la cantidad de IFN- γ producida en respuesta a los antígenos del SARS-CoV-2 y el control negativo. Un resultado se considera positivo si esta diferencia supera un umbral predeterminado.

2.9.2 Aplicaciones para el diagnóstico de la enfermedad por coronavirus

El IGRA tiene varios usos posibles en el contexto de la COVID-19, como la evaluación de la inmunidad celular que sirve para identificar y medir la reacción de las células T ante el SARS-CoV-2; esto complementa los datos obtenidos de las pruebas serológicas que evalúan los

niveles de anticuerpos [115]. También puede reconocer a personas que han estado en contacto previo al SARS-CoV-2 aunque no haya una respuesta detectable de anticuerpos, lo cual resultaría especialmente beneficiosos en situaciones de infecciones asintomáticas o leves [116]. Permite la monitorización de la respuesta inmunológica después de la vacunación ofreciendo detalles sobre la intensidad y persistencia de la reacción del sistema inmunológico a nivel celular desencadenada por las vacunas contra la COVID-19 [117].

Al emplear antígenos particulares del SARS-CoV-2 en las pruebas de IGRA se logra una alta especificidad al detectar la respuesta inmunológica frente a este virus [109, 118]. La evaluación de la inmunidad celular ofrece datos acerca de la reacción de las células T que puede resultar más perdurable y sólida que la respuesta de los anticuerpos [119]. Además, no se ve afectado por haber recibido vacunas que no sean de virus completo, lo que resulta útil para diferenciar entre la inmunidad generada por la infección natural y la vacunación en diversas situaciones [120].

El estudio sobre el IGRA para el SARS-CoV-2 está avanzando rápidamente. Se están llevando a cabo investigaciones para mejorar la elección de antígenos, estandarizar los procedimientos y establecer relaciones más precisas entre los resultados de las pruebas y la inmunidad [121]. Además, se están examinando versiones simplificadas de la prueba que podrían facilitar su uso en entornos donde los recursos son limitados. La combinación del IGRA junto a otras formas de diagnóstico como las pruebas serológicas y moleculares podría ofrecer una visión más amplia del estado inmunológico de una persona frente al SARS-CoV-2. Esto resultaría crucial no solo en el tratamiento clínico personalizado sino también en investigaciones epidemiológicas y el seguimiento de la efectividad de las vacunas en el futuro.

2.10. Identificación de biomarcadores útiles para predecir la evolución clínica en COVID-19

La búsqueda de marcadores biológicos fiables para predecir la evolución clínica de pacientes afectados por COVID-19 ha sido objeto de una extensa investigación desde el comienzo de la pandemia mundial provocada por dicho virus SARS-CoV-2. Estos indicadores no solo son útiles para determinar el riesgo que enfrentan los pacientes, sino que también pueden orientar en la toma de decisiones terapéuticas y en la asignación óptima de recursos disponibles en el ámbito médico. A continuación, se detalla un análisis sobre los marcadores biológicos más significativos identificados hasta ahora.

2.10.1. Marcadores inflamatorios

Proteína C reactiva (PCR): La PCR es un marcador de inflamación aguda que ha demostrado ser un predictor útil de la gravedad de la COVID-19. Niveles elevados de PCR se han asociado con un mayor riesgo de progresión a enfermedad grave y necesidad de ventilación mecánica [122].

Interleucina-6 (IL-6): La IL-6 es una citocina proinflamatoria clave en la "tormenta de citocinas" observada en casos graves de COVID-19. Niveles elevados de IL-6 se han correlacionado con una mayor gravedad de la enfermedad y un peor pronóstico [123].

Ferritina sérica: La ferritina, además de su papel en el metabolismo del hierro, actúa como un reactante de fase aguda. Niveles elevados de ferritina se han asociado con un mayor riesgo de SDRA y mortalidad en pacientes con COVID-19 [124].

2.10.2. Marcadores de coagulación

Dímero D: El dímero D, un producto de degradación de la fibrina, ha emergido como un importante biomarcador en COVID-19. Niveles elevados de dímero D se han asociado con un mayor riesgo de trombosis, necesidad de ingreso en UCI y mortalidad [125].

Tiempo de protrombina (TP) y Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa): Alteraciones en estos parámetros de coagulación pueden indicar coagulopatía asociada a COVID-19, que se ha relacionado con un peor pronóstico [126].

2.10.3. Marcadores hematológicos

Recuento de linfocitos: La linfopenia es un hallazgo común en pacientes con COVID-19 grave. Un recuento bajo de linfocitos se ha asociado con un mayor riesgo de progresión a enfermedad grave y mortalidad [127].

Ratio neutrófilos-linfocitos (NLR): Un NLR elevado se ha propuesto como un marcador de inflamación sistémica y se ha asociado con un peor pronóstico en pacientes con COVID-19 [128].

2.10.4. Marcadores bioquímicos

Lactato deshidrogenasa (LDH): Niveles elevados de LDH se han asociado con daño tisular y se han correlacionado con un mayor riesgo de progresión a enfermedad grave y mortalidad en COVID-19 [129].

Troponina cardíaca: La elevación de troponina, indicativa de daño miocárdico, se ha asociado con un mayor riesgo de complicaciones cardíacas y mortalidad en pacientes con COVID-19 [130].

Creatinina y urea: La elevación de estos marcadores de función renal se ha asociado con un mayor riesgo de lesión renal aguda y mortalidad en COVID-19 [131].

2.10.5. Otros biomarcadores

Procalcitonina: Aunque típicamente asociada con infecciones bacterianas, la elevación de procalcitonina en COVID-19 se ha relacionado con un mayor riesgo de infección bacteriana secundaria y peor pronóstico [132].

Angiotensina II: Algunos estudios han sugerido que los niveles de angiotensina II podrían ser útiles para predecir la gravedad de la COVID-19, dada la interacción del SARS-CoV-2 con el sistema renina-angiotensina-aldosterona [133].

Es fundamental destacar que si bien estos biomarcadores han mostrado su eficacia en distintas investigaciones; su análisis debe llevarse a cabo considerando la situación clínica del paciente de manera integral. Aspectos como el momento en que se toman las muestras, las condiciones médicas concurrentes del paciente y las diferencias en los procedimientos de laboratorio pueden afectar a los resultados obtenidos.

La investigación sobre biomarcadores para COVID-19 está avanzando rápidamente y se están explorando nuevos campos de interés, como:

- La aplicación de métodos de aprendizaje automático para detectar relaciones complejas en información de biomarcadores.
- Investigar biomarcadores genómicos y transcriptómicos que puedan anticipar la vulnerabilidad o la gravedad de una enfermedad.
- El diseño de pruebas en el punto de atención (*point-of-care testing*) que posibilitan la evaluación rápida de diversos biomarcadores en entornos clínicos.

En definitiva, descubrir y confirmar biomarcadores útiles para predecir la evolución clínica del COVID-19 es un área de estudio importante y cambiante. A pesar de que se han hecho progresos notables, se requiere más investigación para perfeccionar y validar estos biomarcadores en distintas poblaciones y escenarios clínicos, buscando mejorar el tratamiento de pacientes y los resultados médicos finales [134, 135, 136].



3.HIPÓTESIS





3. HIPÓTESIS

La prueba de liberación de interferón gamma estandarizada para la detección de la respuesta de células T después de la infección o vacunación en pacientes hospitalizados con COVID-19 realizada durante la fase aguda será una herramienta útil para clasificar correctamente a los pacientes según su pronóstico. Será capaz de identificar a los pacientes con mayores probabilidades de muerte, lo que permitirá adoptar medidas terapéuticas y preventivas específicas.







4. OBJETIVOS



4. **OBJETIVOS**

El objetivo general fue la caracterización y la evaluación del rendimiento pronóstico de la prueba IGRA para SARS-CoV-2 en pacientes con infección aguda por SARS-CoV-2 que necesitan ingreso hospitalario.

Los objetivos específicos fueron:

- Describir las respuestas del IGRA para SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19 y en el subgrupo de pacientes que había sido previamente vacunado.
- Evaluar la relación del IGRA para SARS-CoV-2 con las características demográficas y clínicas de los pacientes, con los niveles de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2, las poblaciones linfocitarias y los biomarcadores de inflamación.
- Comparar en pacientes hospitalizados con COVID-19 la respuesta del IGRA para SARS-CoV-2 entre los vacunados y no vacunados y entre los infectados por la variante Delta y la variante Ómicron.
- Comparar las características clínicas de los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo y mitógeno negativo y los que tienen ambas pruebas negativas.
- Evaluar la relación de la respuesta del IGRA para SARS-CoV-2 con la mortalidad a 28 días de los pacientes hospitalizados con COVID-19.
- Evaluar el estado inmunológico celular y humoral preexistente en pacientes hospitalizados previamente vacunados como factor predictivo de la mortalidad.





5. MATERIAL Y MÉTODOS



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño

Se trata de un estudio de cohortes longitudinal prospectivo en pacientes hospitalizados con COVID-19 en un periodo de un año a los que se les realiza en el momento del ingreso un estudio de la respuesta de IFN- γ específica del SARS-CoV-2.

5.2 Sujetos y ámbito de estudio

El ámbito del estudio comprende el Hospital General Universitario de Elche. Se incluyeron pacientes que requirieron ingreso hospitalario por infección respiratoria aguda por SARS-CoV-2 entre julio de 2021 y abril de 2022. Los criterios de inclusión fueron la infección por SARS-CoV-2 microbiológicamente confirmada, hallazgos anormales en la radiografía de tórax y/o criterios de gravedad, incluida la saturación de oxígeno $<93\%$ y la puntuación CURB-65 para la gravedad de la neumonía ≥ 2 . Los datos clínicos y las muestras de sangre se recolectaron de acuerdo con un protocolo predefinido aprobado por el Comité Institucional COVID-19 (59, 60). El protocolo incluyó la recolección estandarizada de variables clínicas, muestras nasofaríngeas (NPS) para SARS-CoV-2 y muestras de sangre seriadas obtenidas al ingreso y cada 48 h durante la estancia hospitalaria para análisis de sangre de rutina y medición de biomarcadores, incluidos los niveles de interleucina-6 (IL-6), ferritina, proteína C reactiva (PCR), dímero D, recuentos de linfocitos y poblaciones linfocitarias (Citómetro de flujo AQUIOS CL, Beckman Coulter, EE. UU.). La prueba QuantiFERON-TB Gold Plus (Qiagen, Hilden, Alemania) se realizó al ingreso para la detección de infección tuberculosa latente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero para medir los niveles de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se congelaron a -80°C .

Los pacientes recibieron terapia antiviral y/o inmunomoduladora que contenía dexametasona $\pm$ remdesivir $\pm$ tocilizumab $\pm$ baricitinib según criterios preespecificados (60, 61). Todos los pacientes recibieron profilaxis antitrombótica con enoxaparina.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético Institucional como parte del proyecto COVID-19 Elx/España con número de referencia del Comité Ético PI 105/2021. Para este estudio no se requirió consentimiento informado por escrito para participar de acuerdo con la legislación nacional y los requisitos institucionales.

5.3 Materiales e instrumentos

Para la medición de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 y ensayos de liberación de IFN- γ , se extrajo sangre en tubo de suero sin aditivos y en tubo de heparina de litio, consecutivamente. La muestra de suero se utilizó para realizar los ELISA de anticuerpos anti-IgG y anti-IgM. Se usó sangre completa del tubo de heparina de litio para la incubación del ensayo de IGRA para SARS-CoV-2 dentro de 4 horas siguientes a la extracción de sangre.

Ensayo de liberación de SARS-CoV-2 IFN- γ

La respuesta celular del SARS-CoV-2 se midió utilizando un ensayo de liberación de interferón- γ cuantitativo específico en sangre total siguiendo las instrucciones del fabricante (Quan-T-Cell SARS-CoV-2, Euroimmun, Lübeck, Alemania). La sangre de cada paciente se incubó 21 h a 37 °C en los tres tubos suministrados:

(1) Tubo blanco: El tubo no contiene ningún componente activador de las células inmunológicas para no inducir ninguna secreción de interferón gamma. El plasma obtenido aquí sirve para la determinación del fondo del interferón gamma individual y éste debe sustraerse de las otras dos condiciones.

(2) Tubo de mitógeno para la secreción inespecífica de IFN- γ , como control para verificar si la muestra contiene células inmunes en cantidad suficiente y con una capacidad suficiente para ser activado.

(3) Tubo de estimulación recubierto con componentes del dominio S1 de la secuencia original de la proteína espiga del SARS-CoV-2, para la secreción específica de IFN- γ .

Después de centrifugar los tres tubos, la concentración obtenida de IFN- γ liberado en la fracción plasmática se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente (Quan-T-Cell ELISA, Euroimmun, Lübeck, Alemania).

Detección de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2

Determinación de niveles de IgG contra la proteína de la espícula del virus SARS-CoV-2.

Los niveles séricos de anticuerpos IgG contra la proteína de la espícula (TrimericS-IgG) se cuantificaron utilizando un inmunoensayo cuantitativo comercial (ensayo LIAISON SARS-CoV-2

TrimericS IgG; DiaSorin, Saluggia, Italia) en una plataforma automatizada LIAISON XL.

Determinación de niveles de IgG contra la Nucleocápside del virus SARS-CoV-2.

Los niveles séricos de IgG contra la proteína interna de la nucleocápside (N) (N-IgG) se midieron mediante un inmunoensayo quimioluminiscente semicuantitativo (SARS-CoV-2 IgG, Abbott Laboratories) en un sistema automatizado Alinity.

Caracterización de variantes de SARS-CoV-2

El NPS con *PCR* positiva para SARS-CoV-2 (Cobas 6800, Roche, Suiza) se caracterizó mediante secuenciación o *PCR* múltiple según la disponibilidad de recursos. La secuenciación del genoma se realizó siguiendo el protocolo de secuenciación de amplicón ARTIC para MinION versión V3 descrito en trabajos anteriores [61]. La caracterización mediante *PCR* multiplex se realizó con Novaplex SARS-CoV-2 Variants-VII Assay (Seegene, Korea), dirigida específicamente al gen RdRp y las mutaciones E484A, HV69/70del y N501Y, siguiendo el protocolo del fabricante, en un CFX96 termociclador en tiempo real (Bio-Rad).

5.4. Análisis estadístico

Para la comparación de grupos en variables continuas se utilizó la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon o la *t* de Student, según el resultado del contraste de normalidad de Shapiro Wilks. Para las variables categóricas, las comparaciones se realizaron mediante la prueba de chi-cuadrado y exacta de Fisher para más de 2 categorías y variables dicotómicas, respectivamente. La correlación entre las respuestas de IFN- γ y los niveles de anticuerpos y biomarcadores se evaluó con el coeficiente de Pearson. Utilizamos modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox ajustados multivariantes para evaluar la asociación de los resultados de IGRA para SARS-CoV-2 con la mortalidad incorporando covariables de interés. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R versión 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing).





6. RESULTADOS



6.1. RESULTADOS ARTÍCULO I: Integrating SARS-CoV-2-specific interferon- γ release assay testing in the evaluation of patients hospitalized with COVID-19.

Población de estudio

Durante el período de estudio (julio de 2021-abril de 2022), 248 pacientes ingresados en el hospital cumplieron los criterios de inclusión en el estudio. La variante SARS-CoV-2 fue Omicron en 142 (57,3%) pacientes y Delta en 106 (42,7%); en 155 (62,5%) se confirmó mediante secuenciación del genoma, en 74 (29,8%) mediante *PCR* múltiple y en 19 (7,7%) casos, con un umbral del ciclo (Ct) de la *PCR* de transcripción inversa en tiempo real (RT-*PCR*) con valores altos (≥ 35), se asumió en base a la variante prevalente que circulaba en nuestro Departamento de Salud en el momento de la infección. Un total de 172 (69,4%) pacientes tuvieron una respuesta positiva de anticuerpos TrimericS-IgG. Las características de los pacientes al ingreso se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la presencia de respuesta celular frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso hospitalario.

Características	Negativo IGRA (<100 mIU/mL)	Positivo IGRA (>200 mIU/mL)	Dudoso IGRA (100-200 mIU/mL)	Total	P Valor
No, %	95 (38.3)	125 (50.4)	28 (11.3)	248	
Sexo, masculino	54 (56.8)	64 (51.2)	16 (57.1)	134 (54.0)	0.672
Edad, años	77 (58-85)	62 (49-79)	76 (63-83)	70 (52-83)	0.001
Blanco, no hispano	87 (91.6)	109 (87.2)	25 (89.3)	221 (89.1)	0.613
Índice de Charlson	4 (2-7)	3 (1-6)	4 (3-7)	4 (1-6)	0.078
Nº de comorbilidades *	2 (0-4)	1 (0-3)	2.5 (1-3)	2 (0-4)	0.056
Diabetes	27 (28.4)	27 (21.6)	6 (21.4)	60 (24.2)	0.506
Insuficiencia cardíaca congestiva	8 (8.4)	14 (11.2)	5 (17.9)	27 (10.9)	0.821
Enfermedad arterial coronaria	15 (15.8)	12 (9.6)	3 (10.7)	30 (12.1)	0.411
Antecedente de accidente cerebrovascular	6 (6.3)	12 (9.6)	2 (7.1)	20 (8.1)	0.673
Enfermedad arterial periférica	5 (5.3)	9 (7.2)	1 (3.6)	15 (6.0)	0.803
Enfermedad pulmonar	21 (22.1)	25 (20.0)	7 (25.0)	53 (21.4)	0.775
Enfermedad renal crónica	20 (21.1)	16 (12.8)	6 (21.4)	42 (16.9)	0.201
Neoplasia maligna	12 (12.6)	17 (13.6)	4 (14.3)	33 (13.3)	0.965
Condición inmunosupresora [£]	9 (9.5)	18 (14.4)	6 (21.4)	33 (13.3)	0.214
Infección previa por COVID-19	1 (1.1)	5 (4.0)	3 (10.7)	9 (3.6)	0.046
Estado vacunal					
No vacunado	28 (29.5)	33 (26.4)	6 (21.4)	67 (27.0)	0.706

Vacunado #	67 (70.5)	92 (73.6)	22 (78.6)	181 (73.0)	
Días desde la última dosis de vacuna	119 (68-186)	95 (59-175)	110 (81-175)	100 (67-178)	0.252
Presentación clínica					
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso	5 (3-7)	6 (3-8)	5 (2-7)	5 (3-7)	0.632
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso	343 (283-354)	354 (343-462)	346 (294-417)	350 (309-457)	0.001
Escala de gravedad WHO	4 (3.1-4.1)	4 (3.0-4.0)	4 (3.9-4.0)	4 (3.1-4.1)	0.386
Escala de gravedad WHO >4	12 (12.6)	4 (3.2)	2 (7.1)	18 (7.3)	0.022
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	44 (46.3)	62 (49.6)	12 (42.9)	118 (47.6)	0.568
Datos microbiológicos					
Variante SARS-CoV-2, Omicron	58 (61.1)	69 (55.2)	15 (53.6)	142 (57.3)	0.611
Valor umbral de ciclo (Ct) más bajo en PCR	22 (17-26)	23 (19-28)	23 (19-29)	22 (18-29)	0.202
IgG-TriméricaS, BAU/mL	143 (5-2535)	1090 (81-3650)	261 (6-2218)	581 (10-3278)	0.053
IgG-TriméricaS, Positivo	56 (58.9)	99 (79.2)	17 (60.7)	172 (69.4)	0.003
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	45 (47.4)	82 (65.6)	14 (50.0)	141 (56.9)	0.019
IgG-N, Positivo	8 (8.4)	23 (18.4)	3 (10.7)	34 (13.7)	0.095
IGRA SARS-CoV-2, mIU/mL	10 (0.5-43)	635 (337-1752)	163 (139-173)	206 (26-636)	<0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	125 (100)	0 (0)	125 (50.4)	<0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2 & Positivo	12 (12.6)	44 (35.2)	6 (21.4)	62 (25.0)	<0.001
Mitógeno-Quantiferon-TB, Positivo (≥0,50 UI/mL)	77/84 (91.7)	105/110 (95.5)	25/26 (96.2)	207/220 (94.1)	0.692
QuantiferonTB, Positivo	3 (3.5)	4 (3.6)	1 (3.7)	8 (3.6)	1.000
Antivirales/inmunomoduladores					
Remdesivir	79 (83.2)	98 (78.4)	24 (85.7)	201(81.0)	0.573
Anticuerpos monoclonales	4 (4.2)	2 (1.6)	0 (0)	6 (2.4)	0.399
Tocilizumab o baricitinib	59 (62.1)	85 (68.0)	19 (67.9)	163 (65.7)	0.656
Outcomes					
Estancia hospitalaria, días	5 (3.5-9)	5 (3-7)	7 (4-8)	5 (3-8)	0.171
Ingreso en UCI	7 (7.4)	3 (2.4)	2 (7.1)	12 (4.8)	0.147
Mortalidad a los 28 días	15 (15.8)	5 (4.0)	4 (14.3)	24 (9.7)	0.006
Mortalidad a los 60 días	19 (20.0)	10 (8.0)	5 (17.9)	34 (13.7)	0.025
Mortalidad a los 90 días	21 (22.1)	10 (8.0)	5 (17.9)	36 (14.5)	0.009

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluyó las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluyó VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #De 181 pacientes vacunados, 103 (57%) tenían la pauta completa y 78 (43%) habían recibido dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Caracterización del ensayo de liberación de IFN- γ del SARS-CoV-2 en personas hospitalizadas por COVID-19

El resultado de IGRA para SARS-CoV-2 fue positivo (>200 mIU/mL) en 125 (50,5%) pacientes. Los pacientes con resultados positivos de IGRA para SARS-CoV-2 mostraron un perfil clínico diferencial (Tabla 1). En comparación con los pacientes con resultados negativos o dudosos, aquellos con IGRA para SARS-CoV-2 positivo eran más jóvenes, mostraron una menor frecuencia de comorbilidades coexistentes, una mediana más baja del índice de comorbilidad de Charlson (CCI), una menor frecuencia de puntuación de gravedad de la OMS > 4 y un mayor cociente saturación arterial periférica de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno (SpO₂/FiO₂) al ingreso (Tabla S5).

Tabla S5. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la presencia de respuesta celular frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso hospitalario.

Características	Negativo/ Dudoso IGRA (≤ 200 mIU/mL)	Positivo IGRA (>200 mIU/mL)	Total	P Valor
No, %	123 (49.6)	125 (50.4)	248	
Sexo, masculino	70 (56.9)	64 (51.2)	134 (54.0)	0.376
Edad, años	76 (59-85)	62 (49-79)	70 (52-83)	<0.001
Blanco, no hispano	112 (91.1)	109 (87.2)	221 (89.1)	0.416
Índice de Charlson	4 (2-7)	3 (1-6)	4 (1-6)	0.024
Número de comorbilidades *	2 (1-4)	1 (0-3)	2 (0-4)	0.024
Diabetes	33 (26.8)	27 (21.6)	60 (24.2)	0.375
Insuficiencia cardíaca congestiva	18 (14.6)	12 (9.6)	30 (12.1)	0.247
Enfermedad arterial coronaria	13 (10.6)	14 (11.2)	27 (10.9)	1.000
Antecedente de accidente cerebrovascular	8 (6.5)	12 (9.6)	20 (8.1)	0.485
Enfermedad arterial periférica	6 (4.9)	9 (7.2)	15 (6.0)	0.596
Enfermedad pulmonar	28 (22.8)	25 (20.0)	53 (21.4)	0.644
Enfermedad renal crónica	26 (21.1)	16 (12.8)	42 (16.9)	0.092
Neoplasia maligna	16 (13.0)	17 (13.6)	33 (13.3)	1.000
Condición inmunosupresora [£]	15 (12.2)	18 (14.4)	33 (13.3)	0.709
Infección previa por COVID-19	4 (3.3)	5 (4.0)	9 (3.6)	1.000
Estado vacunal				
No vacunado	34 (27.6)	33 (26.4)	67 (27.0)	0.887
Vacunado [#]	89 (72.4)	92 (73.6)	181 (73.0)	
Días desde la última dosis de vacuna	12 (73-184)	95 (59-175)	110 (67-178)	0.117
Presentación clínica				
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso	5 (3-7)	6 (3-8)	5 (3- 7)	0.377
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso (*100)	3.4 (2.8-4.1)	3.5 (3.4-4.6)	3.5 (3.0-4.6)	<0.001

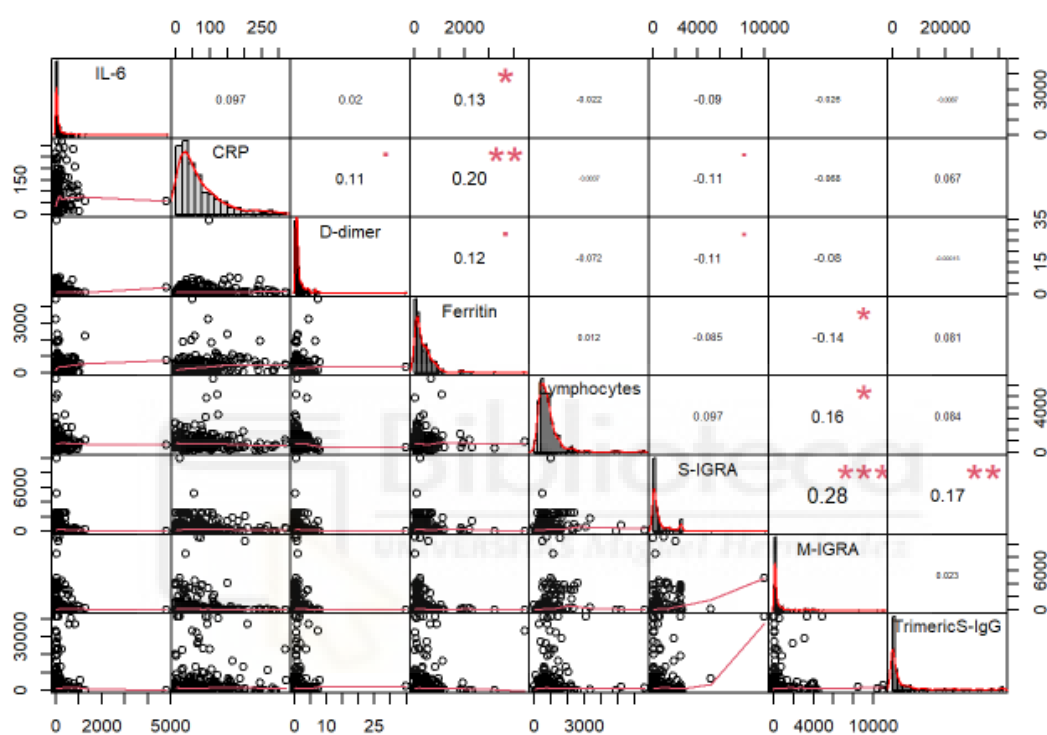
Escala de gravedad WHO	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.0-4.0)	4.0 (3.1-4.1)	0.187
	14 (11.4)	4 (3.2)	18 (7.2)	0.03
Escala de gravedad WHO >4	56 (45.5)	62 (49.6)	118 (47.6)	0.298
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Omicron	73 (59.3)	69 (55.2)	142 (57.3)	0.524
Valor umbral de ciclo (Ct) más bajo en PCR	22 (17-29)	23 (19-28)	22 (18-29)	0.130
IgG-TriméricaS, BAU/mL	173 (4.8-2535)	1090 (81-3650)	581 (10-3278)	0.015
IgG-TriméricaS, Positivo	73 (59.3)	99 (79.2)	172 (69.4)	0.001
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	59 (48.0)	82 (65.6)	141 (56.9)	0.007
IgG-N, Positivo	11 (8.9)	23 (18.4)	34 (13.7)	0.041
IGRA SARS-CoV-2, mIU/mL	22 (0.5-80)	635 (337-1752)	206 (26-636)	<0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2 & Positivo	18 (14.6)	44 (35.2)	62 (25.0)	<0.001
Mitógeno QuantiferonTB	8.6 (2.4-10.0)	9.8 (3.4-9.9)	9.7 (3.2-10.0)	0.827
QuantiferonTB, Positivo	4 (3.5)	4 (3.6)	8 (3.6)	0.902
Outcomes				
Estancia hospitalaria, días	6 (4-9)	5 (3-7)	5 (3-8)	0.092
Ingreso en UCI	9 (7.3)	3 (2.4)	12 (4.8)	0.083
Mortalidad a los 28 días	19 (15.4)	5 (4.0)	24 (9.7)	0.002
Mortalidad a los 60 días	24 (19.5)	10 (8.0)	34 (13.7)	0.010
Mortalidad a los 90 días	6 (21.1)	10 (8.0)	36 (14.5)	0.004

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #De 181 pacientes vacunados, 103 (57%) tenían la pauta completa y 78 (43%) habían recibido dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] $\geq$ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Las respuestas positivas de TrimericS-IgG y N-IgG fueron más frecuentes entre los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo, sin diferencias según los valores de Ct del SARS-CoV-2. Hubo una leve correlación entre los valores de TrimericS-IgG e IGRA para SARS-CoV-2, con una $\rho = 0,17$ ($P < 0,001$) (Figura 2). Esta correlación no alcanzó significación estadística en el grupo de pacientes que fallecieron ($\rho = 0,017$; $P = 0,935$). El QuantiFERON-TB fue positivo en el 3,6% de los pacientes e indeterminado en el 5,9% (de ellos, el 0,4% tuvo un resultado positivo del mitógeno IGRA para SARS-CoV-2 y el 2,2% tuvo un valor positivo para el SARS-CoV-2 específico). La prueba de mitógeno del QuantiFERON-TB fue positiva en el 94,1% de los pacientes evaluados, sin diferencias en relación con los resultados de IGRA para SARS-CoV-2. Los resultados respecto a la evolución de los pacientes difirieron según el estado de IGRA para SARS-CoV-2, con una menor mortalidad a los 28, 60 y 90 días después del ingreso hospitalario

en los pacientes positivos para IGRA para SARS-CoV-2 y una tendencia a una menor admisión a la unidad de cuidados intensivos (UCI) ($P = 0,083$) (Tabla 1).

Figura 2. Correlación de los niveles de interferón- γ con biomarcadores inflamatorios y anticuerpos IgG anti-espícula en personas hospitalizadas por COVID-19. Fuente: Elaboración propia.



IL-6, Interleucina-6; PCR, Proteína C reactiva; Linfocitos, recuento total de linfocitos periféricos; S-IGRA, IGRA SARS-CoV-2; M-IGRA, respuesta IGRA inespecífica (mitógeno); IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína S trimérica.

La tabla 2 muestra los resultados de IGRA para SARS-CoV-2 según recuentos de linfocitos y niveles de biomarcadores. El IGRA para SARS-CoV-2 positivo se asoció con un mayor recuento total de linfocitos periféricos, células B, células T y células T CD4+ y una tendencia a un menor número de células *natural killer* (NK). Menos de un tercio de los pacientes con células T de menos de 200/ μ L mostraron resultados positivos de IGRA para SARS-CoV-2, y el 91,4% de ellos mostraron un resultado negativo para el mitógeno de IGRA para SARS-CoV-2. De los biomarcadores medidos, el IGRA para SARS-CoV-2 positivo se asoció con niveles más altos de Interleucina-6 (IL-6) y una tendencia a niveles más bajos de ferritina al ingreso. Hubo una correlación leve y negativa de la respuesta de IFN- γ con la proteína C reactiva y el dímero D ($p = -0,11$, $P < 0,05$ en ambos casos; Figura 2).

Table 2. Recuento linfocitario y niveles de biomarcadores al ingreso.

Características	Negativo IGRA (<100 mIU/mL)	Positivo IGRA (>200 mIU/mL)	Dudoso IGRA (100-200 mIU/mL)	Total	P Valor
Recuento de linfocitos periféricos, células/ μ L	606 (419-951)	795 (498-1070)	763 (544-957)	694 (461-1013)	0.048
Recuento de linfocitos periféricos, categorías, células/μL					
<100	1 (1.1)	1 (0.8)	0 (0.0)	2 (0.8)	0.161
100-199	2 (2.1)	4 (3.3)	0 (0.0)	6 (2.5)	
200-500	35 (37.2)	27 (22.0)	5 (19.2)	67 (27.6)	
>500	56 (59.6)	91 (74.0)	21 (80.8)	168 (69.1)	
Recuento de Linfocitos T, células/ μ L	367 (224-566)	468 (314-739)	503 (406-598)	435 (281-660)	0.013
Recuento de linfocitos T, categoría, células/μL					
<100	3 (3.2)	2 (1.6)	0 (0.0)	5 (2.1)	0.081
100-199	19 (20.2)	9 (7.3)	2 (7.7)	30 (12.3)	
200-500	40 (42.6)	54 (43.9)	11 (42.3)	105 (43.2)	
>500	32 (34.0)	58 (47.2)	13 (50.0)	103 (42.4)	
CD4+ T-cell count, cells/ μ L	193 (110-327)	277 (153-414)	342 (272-373)	240 (146-376)	0.003
Recuento de linfocitos T CD4+, células/μL					
<100	19 (20.2)	16 (13.0)	2 (7.7)	37 (15.2)	0.012
100-199	29 (30.9)	30 (24.4)	2 (7.7)	61 (25.1)	
200-500	34 (36.2)	54 (43.9)	20 (76.9)	108 (44.4)	
>500	12 (12.8)	23 (18.7)	2 (7.7)	37 (15.2)	
Cociente CD4+/CD8	1.4 (0.9-2.3)	1.6 (1.0-2.4)	2.0 (1.3-2.8)	1.6 (1.0-2.4)	0.102
Recuento de linfocitos B, células/ μ L	54 (23-89)	65 (38-126)	58 (36-103)	60 (28-113)	0.033
Linfocitos NK/ μ L	23 (14-34)	19 (12-29)	21 (14-30)	20 (13-31)	0.076
Interleucina-6, pg/mL	29 (6-131)	41 (16-134)	80 (42-280)	42 (12-139)	0.026
Proteína C reactiva, mg/L	49 (23-103)	53 (24-88)	47 (29-104)	50 (24-97)	0.930
Dímero D, μ g/mL	0.8 (0.4-2.3)	0.7 (0.4-1.1)	0.7 (0.5-1)	0.7 (0.4-1.4)	0.316
Ferritina, ng/mL	248 (104-519)	199 (100-441)	431 (167-609)	231 (108-503)	0.075

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje).

En la Tabla S1 se muestra el rendimiento de la prueba IGRA para SARS-CoV-2 según los datos demográficos y clínicos de los pacientes. Los resultados fueron consistentes con los descritos anteriormente. No hubo diferencias en los resultados de IGRA para SARS-CoV-2 según la variante del SARS-CoV-2. Los pacientes que murieron en cada uno de los periodos definidos del estudio mostraron una mayor frecuencia de IGRA para el SARS-CoV-2 negativo, y se observó la misma tendencia con el ingreso en la UCI.

Table S1. Resultados del ensayo de liberación de interferón- γ frente a SARS-CoV-2 según las características de los pacientes en el momento del ingreso hospitalario por COVID-19.

Características	Total N (%)	Mediana (Q1- Q3) del valor de IGRA (mUI/mL)	P	N (%) IGRA positivo (>200 mUI/mL)	P	N (%) IGRA- Mitógeno positivo	P
N	248	206 (26-636)		125 (50.4)		62 (25.0)	
Sexo, Masculino	134 (54.0)	185 (24-585)	0.674	64 (47.8)	0.376	27 (20.1)	0.077
Femenino	114 (46.0)	249 (30-714)		61 (53.5)		35 (30.7)	
Edad, ≤ 65 años	114 (46.0)	303 (56-1348)	<0.001	69 (60.5)	0.004	31 (27.2)	0.467
>65 años	134 (54.0)	145 (13-430)		56 (41.8)		31 (23.1)	
Raza, Blanco no hispano	221 (89.1)	185 (19- 638)	0.350	109 (49.3)	0.416	56 (25.3)	0.818
otras	27 (10.9)	246 (77-578)		16 (59.3)		6 (22.2)	
Índice de Charlson, <4	119 (48.0)	269 (55-1167)	0.004	68 (57.1)	0.043	29 (24.4)	0.884
≥ 4	129 (52.0)	163 (10-463)		57 (44.2)		33 (25.6)	
Nº de comorbilidades*, ≤ 2	156 (62.9)	254 (44-775)	0.043	86 (55.1)	0.066	37 (23.7)	0.548
>2	92 (37.1)	154 (10-542)		39 (42.4)		25 (27.2)	
Diabetes, Si	60 (24.2)	163 (14-542)	0.172	27 (45.0)	0.375	17 (28.3)	0.497
No	188 (75.8)	233 (32-741)		98 (52.1)		45 (23.9)	
Insuficiencia cardíaca							
congestiva, Si	27 (10.9)	221 (44-844)	0.625	14 (51.9)	1.000	7 (25.9)	1.000
No	221 (89.1)	203 (27-627)		111 (50.2)		55 (24.9)	
Enfermedad arterial coronaria, Si	30 (12.1)	98 (6-573)	0.136	12 (40.0)	0.247	6 (20.0)	0.654
No	218 (87.9)	239 (40-637)		113 (51.8)		56 (25.7)	
Antecedente accidente cerebrovascular, Si	20 (8.1)	309 (54-761)	0.483	12 (60.0)	0.485	7 (35.0)	0.288
No	228 (91.9)	198 (22-629)		113 (49.6)		55 (24.1)	
Enfermedad arterial periférica, Si	15 (6.0)	275 (59-519)	0.731	9 (60.0)	0.596	3 (20.0)	0.768
No	233 (94.0)	198 (22-638)		116 (49.8)		59 (25.3)	
Enfermedad pulmonar, Si	53 (21.4)	184 (4-528)	0.258	25 (47.2)	0.644	12 (22.6)	0.723
No	195 (78.6)	212 (41-704)		100 (51.3)		50 (25.6)	
Enfermedad renal crónica, Si	42 (16.9)	148 (12-274)	0.023	16 (38.1)	0.092	10 (23.8)	1.000
No	206 (83.1)	247 (34-842)		109 (52.9)		52 (25.2)	
Neoplasia maligna, Si	33 (13.3)	212 (30-467)	0.795	17 (51.5)	1.000	7 (21.2)	0.671
No	215 (86.7)	203 (25-651)		108 (50.2)		55 (25.6)	
Condición inmunosupresora, Si	33 (13.3)	272 (42-588)	0.569	18 (54.5)	0.709	8 (24.2)	1.000
No	215 (86.7)	198 (25-637)		107 (49.8)		54 (25.1)	
Infección previa por COVID-19, Si	9 (3.6)	209 (156-339)	0.782	5 (55.6)	1.000	1 (11.1)	0.457
No	239 (96.4)	203 (21-671)		120 (50.2)		61 (25.5)	

Estado vacunal, Vacunado	181 (73.0)	221 (33-635)	0.649	92 (50.8)	0.887	51 (28.2)	0.069
No vacunado	67 (27.0)	183 (15-644)		33 (49.3)		11 (16.4)	
Presentación clínica							
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso ≥ 6	134 (54.7)	191 (18-585)		65 (48.5)		41 (30.6)	
<6	111 (45.3)	246 (45-722)	0.353	59 (53.2)	0.522	21 (18.9)	0.040
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso ≤ 350	138 (55.6)	159 (14-490)		57 (41.3)		24 (17.4)	
>350	110 (44.4)	303 (56-1141)	0.002	68 (61.8)	0.001	38 (34.5)	0.003
Escala de gravedad WHO, ≤ 4	143 (57.7)	237 (25-775)		73 (51.0)		44 (30.8)	
>4	105 (42.3)	182 (27-528)	0.458	52 (49.5)	0.898	18 (17.1)	0.017
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía, Yes	18 (47.6)	232 (40-720)		62 (52.5)		21 (17.8)	
No	130 (52.4)	184 (18-611)	0.441	63 (48.5)	0.528	41 (31.5)	0.013
Datos microbiológicos							
Variante SARS-CoV-2, Omicron	142 (57.3)	191 (11-561)		69 (48.6)		39 (27.5)	
Delta	106 (42.7)	253 (47-916)	0.095	56 (52.8)	0.524	23 (21.7)	0.374
Valor umbral de ciclo (Ct) más bajo en PCR, ≤ 20	84 (33.9)	153 (10-407)		43 (40.2)		21 (19.6)	
>20	164 (66.1)	256 (45-713)	0.037	82 (58.2)	0.007	41 (29.1)	0.104
IgG-TriméricaS Positivo							
Si	172 (69.4)	277 (46-871)	<0.00	99 (57.6)		50 (29.1)	
No	76 (30.6)	85 (4-273)	1	26 (34.2)	0.001	12 (15.8)	0.027
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL,							
Si	141 (56.9)	293 (49-1087)		82 (58.2)		41 (29.1)	
No	107 (43.1)	145 (6-343)	0.001	43 (40.2)	0.007	21 (19.6)	0.104
IgG-N Positivo, Si	34 (13.7)	488 (131-1347)		23 (67.6)		5 (14.7)	
No	214 (86.3)	182 (18-572)	0.005	102 (47.7)	0.041	57 (26.6)	0.199
Mitógeno-TB-Quantiferon, <0.5	13 (5.9)	92 (4-704)		5 (38.5)		1 (7.7)	
≥ 0.50	207 (94.1)	209 (38-637)	0.327	105 (50.7)	0.569	52 (25.1)	0.197
Valores de laboratorio							
Interleucina-6, pg/mL							
(-Inf,15]	68 (27.4)	115 (14-431)		29 (42.6)		12 (17.6)	
(15, Inf]	180 (72.6)	243 (45-856)	0.057	96 (53.4)	0.155	50 (28.1)	0.138
Proteína C reactiva, mg/L ≤ 20	51 (20.6)	135 (10-925)		25 (49.0)		14 (27.5)	
>20	197 (79.4)	209 (42-627)	0.677	100 (50.8)	0.876	48 (24.4)	0.717
Dímero D, $\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,7$	118 (48.0)	239 (45-1047)		62 (52.5)		34 (28.8)	
>0,7	128 (52.0)	183 (19-498)	0.150	62 (48.4)	0.527	28 (21.9)	0.241
Ferritina, ng/mL, ≤ 200	109 (44.0)	254 (16-739)		60 (55.0)		36 (33.0)	
>200	139 (56.0)	180 (43-545)	0.716	65 (46.8)	0.203	26 (18.7)	0.012

Recuento total de linfocitos, células/ μ L, ≤ 700	123 (50.6)	161 (18-508)		54 (43.9)		20 (16.3)	
>700	120 (49.4)	268 (47-943)	0.058	69 (57.5)	0.040	41 (34.2)	0.002
Recuento de linfocitos B cells / μ L, ≤ 65	136 (56.2)	169 (16-496)		62 (45.6)		29 (21.3)	
>65	106 (43.8)	271 (52-1141)	0.012	61 (57.5)	0.071	32 (30.2)	0.136
Recuento de linfocitos T, células/ μ L ≤ 500	140 (57.6)	171 (18-464)		65 (46.4)		20 (14.3)	
>500	103 (42.4)	275 (47-1137)	0.033	58 (56.3)	0.153	41 (39.8)	<0.001
Recuento de linfocitos T CD4, células/ μ ≤ 200	98 (40.3)	150 (12-491)		46 (46.9)		13 (13.3)	
>200	145 (59.7)	268 (48-874)	0.017	77 (53.1)	0.363	48 (33.1)	<0.001
Antivirales/inmunomoduladores							
Remdesivir, Yes	201 (81.0)	185 (29-635)		98 (48.8)		50 (24.9)	
No	47 (19.0)	252 (25-634)	0.730	27 (57.4)	0.332	12 (25.5)	1.000
Anticuerpos monoclonales, Si	6 (2.4)	6 (1.4-349)		2 (33.3)		1 (16.7)	
No	242 (97.6)	211 (31-637)	0.205	123 (50.8)	0.445	61 (25.2)	1.000
Tocilizumab/baricitinib, Si	163 (65.7)	229 (45-650)		85 (52.1)		38 (23.3)	
No	85 (34.3)	182 (8-618)	0.259	40 (47.1)	0.504	24 (28.2)	0.441
Outcomes							
Estancia hospitalaria, ≤ 4 days	108 (43.5)	277 (44-1156)		61 (56.5)		33 (30.6)	
>4 days	140 (56.5)	171 (14-518)	0.020	64 (45.7)	0.098	29 (20.7)	0.103
Muerte intrahospitalaria, Si	21 (8.5)	10 (0.5-56)	<0.001	3 (14.3)	<0.001	0 (0.0)	
No	227 (91.5)	248 (43-722)	1	122 (53.7)	1	62 (27.3)	0.003
Ingreso en UCI, Si	12 (4.8)	54 (22-200)		3 (25.0)		1 (8.3)	
No	236 (95.2)	225 (28-674)	0.126	122 (51.7)	0.083	61 (25.8)	0.304
Mortalidad a los 28 días, Si	24 (9.7)	20 (2-145)		5 (20.8)		1 (4.2)	
No	224 (90.3)	247 (43-713)	0.001	120 (53.6)	0.002	61 (27.2)	0.012
Mortalidad a los 60 días, Si	34 (13.7)	52 (5-299)		10 (29.4)		5 (14.7)	
No	214 (86.3)	247 (43-730)	0.006	115 (53.7)	0.010	57 (26.6)	0.199
Mortalidad a los 90 días, Si	36 (14.5)	49 (4-278)		10 (27.8)		6 (16.7)	
No	212 (85.5)	250 (43-741)	0.002	115 (54.2)	0.004	56 (26.4)	0.297

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Se habían vacunado un total de 181 (73%) pacientes. No hubo diferencias significativas en la positividad de IGRA para SARS-CoV-2 según el estado de vacunación o los días desde la última dosis de vacuna. Los pacientes vacunados eran mayores, tenían un índice de comorbilidad de Charlson más alto y una mayor carga de comorbilidades, y mostraron una tendencia a una mayor frecuencia de mitógeno positivo (Tabla S2).

Table S2. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según el estado vacunal en el momento del ingreso.

Características	No vacunado	Vacunado	Total	P Valor
No. (%)	67 (27.0)	181 (73.0)	248	
Sexo, masculino	32 (47.8)	102 (56.4)	134 (54.0)	0.253
Edad, años	66 (48-79)	74 (54-83)	70 (52-83)	0.045
Blanco, no hispano	59 (88.1)	162 (89.5)	221 (89.1)	0.819
Índice de comorbilidad de Charlson	3 (0-5)	4 (1-7)	4 (1-6)	0.004
Número de comorbilidades*	1 (0-3)	2 (0-4)	2 (0-4)	0.073
Diabetes	9 (13.4)	51 (28.2)	60 (24.2)	0.019
Insuficiencia cardíaca congestiva	5 (7.5)	22 (12.2)	27 (10.9)	0.363
Enfermedad arterial coronaria	10 (14.9)	20 (11.0)	30 (12.1)	0.390
Antecedente de accidente cerebrovascular	4 (6.0)	16 (8.8)	20 (8.1)	0.603
Enfermedad arterial periférica	2 (3.0)	13 (7.2)	15 (6.0)	0.367
Enfermedad pulmonar	15 (22.4)	38 (21.0)	53 (21.4)	0.862
Enfermedad renal crónica	6 (9.0)	36 (19.9)	42 (16.9)	0.055
Neoplasia maligna	4 (6.0)	29 (16.0)	33 (13.3)	0.056
Condición inmunosupresora ^f	3 (4.5)	30 (16.6)	33 (13.3)	0.011
Infección previa por COVID-19	0 (0)	9 (5.0)	9 (3.6)	0.118
Presentación clínica				
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso	7.0 (4.0-8.0)	5.0 (3.0-7.0)	5.0 (3.0-7.0)	0.009
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso	3460 (275-452)	350 (309-457)	350 (302-457)	0.109
Escala de gravedad de la OMS	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.1-4.1)	0.420
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	41 (61.2)	77 (42.5)	118 (47.6)	0.067
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	39 (58.2)	103 (56.9)	142 (57.3)	0.886
Valor umbral de ciclo más bajo en PCR	23.8 (19.0-28.8)	22.1 (17.7-27.3)	22.3 (18.0-28.5)	0.186
IgG-TriméricaS, BAU/mL	4.8 (4.8-15)	1710 (266-5670)	581 (10-3278)	<0.001
IgG-TriméricaS, Positivo	14 (20.9)	158 (87.3)	172 (69.4)	<0.001
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	5 (7.5)	136 (75.1)	141 (56.9)	<0.001
IgG-N, Positivo	11 (16.4)	23 (12.7)	34 (13.7)	0.533
IGRA SARS-CoV-2, mUI/mL	183 (15-644)	221 (33-635)	206 (26-636)	0.649
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	33 (49.3)	92 (50.8)	125 (50.4)	0.887
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, ^g Positivo	11 (16.4)	51 (28.2)	62 (25.0)	0.069
Valores de laboratorio				

Interleucina-6, pg/mL	45 (21-140)	42 (12-139)	42 (12-139)	0.531
Proteína C reactiva, mg/L	48 (26-92)	52 (23-98)	50 (24-97)	0.839
Dímero D, µg/mL	0.7 (0.5-1.4)	0.8 (0.4-1.4)	0.7 (0.4-1.4)	0.833
Ferritina, ng/mL	296 (150-624)	221 (99-487)	238 (109-511)	0.051
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	659 (404-1021)	699 (487-999)	694 (461-1013)	0.428
Recuento de linfocitos B, células/µL	71 (38-105)	54 (25-117)	60 (28-113)	0.143
Recuento de linfocitos T, células/µL	366 (255-598)	455 (304-703)	435 (281-660)	0.094
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	214 (127-371)	249 (154-376)	240 (146-376)	0.384
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.9 (1.1-2.6)	1.5 (1.0-2.3)	1.6 (1.0-2.4)	0.107
Antivirales/inmunomoduladores				
Remdesivir	57 (85.1)	144 (79.6)	201 (81.0)	0.367
Anticuerpos monoclonales	1 (1.5)	5 (2.8)	6 (2.4)	1.000
Tocilizumab o baricitinib	45 (67.2)	118 (65.2)	163 (65.7)	0.880
Resultados				
Estancia hospitalaria, días	6.0 (4.0-8.0)	5.0 (3.0-8.0)	5.0 (3.0-8.0)	0.478
Ingreso en UCI	4 (6.0)	8 (4.4)	12 (4.8)	0.739
Mortalidad a los 28 días	7 (10.4)	17 (9.4)	24 (9.7)	0.811
Mortalidad a los 60 días	7 (10.4)	27 (14.9)	34 (13.7)	0.413
Mortalidad a los 90 días	8 (11.9)	28 (15.5)	36 (14.5)	0.548

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluye: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. ‡Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

En el análisis por variante del SARS-CoV-2, los pacientes infectados con la variante Delta eran significativamente más jóvenes y mostraron una menor carga de comorbilidad, una menor frecuencia de vacunación y un mayor número de días desde el inicio de los síntomas (Tabla S3). Cuando se compararon los resultados positivos y negativos de IGRA para el SARS-CoV-2 en pacientes con las variantes Omicron y Delta por separado, los patrones fueron similares a los observados en toda la cohorte (Tabla 3). Entre los pacientes infectados con la variante Delta, los individuos con un resultado negativo de IGRA para el SARS-CoV-2 mostraron una tasa de mortalidad a los 28 días que fue el doble que aquellos con un resultado positivo (13,5 % frente a 5,4 %), aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

Tabla 3. Características de los pacientes hospitalizados con la variante Ómicron o Delta, según la presencia de respuesta celular frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	DELTA			OMICRON		
	Negativo IGRA	Positivo IGRA	P Valor	Negativo IGRA	Positivo IGRA	P Valor
n (%)	50 (47.2)	56 (52.8)		73 (51.4)	69 (48.6)	
Sexo, masculino	37 (74.0)	24 (42.9)	0.002	33 (45.2)	40 (58.0)	0.135
Edad, años	67 (55-80)	56 (49-72)	0.006	81 (60-86)	73 (51-83)	0.014
Índice de comorbilidad de Charlson	3 (1-7)	2 (1-3)	0.036	5 (3-7)	5 (1-7)	0.622
Número de comorbilidades*	1 (0-4)	0.5 (0-2)	0.011	2 (1-4)	2 (0-4)	0.714
Diabetes	16 (32.0)	8 (14.3)	0.037	17 (23.3)	19 (27.5)	0.570
Insuficiencia cardíaca congestiva	3 (6.0)	4 (7.1)	1.000	10 (13.7)	10 (14.5)	1.000
Enfermedad arterial coronaria	6 (12.0)	3 (5.4)	0.301	12 (16.4)	9 (13.0)	0.640
Antecedente de accidente cerebrovascular	3 (6.0)	2 (3.6)	0.665	5 (6.8)	10 (14.5)	0.176
Enfermedad arterial periférica	3 (6.0)	1 (1.8)	0.341	3 (4.1)	8 (11.6)	0.122
Enfermedad pulmonar	7 (14.0)	9 (16.1)	0.793	21 (28.8)	16 (23.2)	0.567
Enfermedad renal crónica	10 (20.0)	4 (7.1)	0.082	16 (21.9)	12 (17.4)	0.533
Neoplasia maligna	5 (10.0)	5 (8.9)	1.000	11 (15.1)	12 (17.4)	0.821
Condición inmunosupresora ^f	3 (6.0)	5 (8.9)	0.720	2 (1-4)	2. (0-4)	0.714
Infección previa por COVID-19	3 (6.0)	0	3 (6.0)	1 (1.4)	5 (7.2)	0.109
Estado vacunal						
Días desde la última dosis de vacuna	129 (80-180)	128 (62-180)	0.697	104 (73-188)	84 (56-157)	0.084
No vacunado	12 (24.0)	16 (28.6)	0.662	22 (30.1)	17 (24.6)	0.573
Pauta completa	38 (76.0)	40 (71.4)		51 (69.9)	52 (75.4)	
Presentación clínica						
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso	6 (5-7)	6 (4-7)	0.923	4 (2-7)	4 (2-8)	0.363
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso	346 (301-450)	350 (327-462)	0.119	343 (274-408)	354 (343-462)	0.003
Escala de gravedad de la OMS >4	8 (16.0)	2 (3.6)	0.044	6 (8.2)	2 (2.9)	0.276
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	25 (50.0)	33 (58.9)	0.110	31 (42.5)	29 (42.0)	0.926
Datos microbiológicos						
Valor umbral de ciclo más bajo en PCR	23 (18-30)	25 (21-29)	0.565	20 (17-27)	21 (18-28)	0.159
IgG-TriméricaS, BAU/mL	196 (10-5495)	515 (85-4140)	0.521	143 (5-1800)	1470 (57-2920)	0.006
IgG-TriméricaS, Positivo	32 (64.0)	46 (82.1)	0.047	41 (56.2)	53 (76.8)	0.013
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	24 (48.0)	34 (60.7)	0.242	35 (47.9)	48 (69.6)	0.011

IgG-N, Positivo	6 (12.0)	11 (19.6)	0.305	5 (6.8)	12 (17.4)	0.070
IGRA SARS-CoV-2, mUI/mL	45 (12-113)	863 (343-1838)	<0.001	11 (0.5-63)	575 (337-1400)	<0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	3 (6.0)	20 (35.7)	<0.001	15 (20.5)	24 (34.8)	0.063

Valores de laboratorio						
Interleucina-6, pg/mL	60 (12-147)	42 (24-116)	0.985	30 (6-140)	36 (11-143)	0.668
Proteína C reactiva, mg/L	64 (29-99)	60 (32-98)	0.927	39 (19-104)	40 (21-75)	0.628
Dímero D, µg/mL	0.7 (0.5-1.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.169	0.9 (0.4-2.2)	0.8 (0.5-1.4)	0.547
Ferritina, ng/mL	418 (229-598)	293 (154-535)	0.262	173 (91-529)	164 (80-321)	0.263
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	644 (424-940)	823 (519-1212)	0.056	633 (457-962)	708 (492-978)	0.470
Recuento de linfocitos B, células/µL	57 (29-109)	64 (36-110)	0.679	49 (19-85)	69 (40-133)	0.005
Recuento de linfocitos T, células/µL	370 (254-567)	562 (329-830)	0.024	440 (261-574)	425 (314-709)	0.444
Recuento de linfocitos T CD4+, células/µL	206 (99-357)	326 (157-473)	0.003	231 (149-369)	214 (151-371)	0.861
Cociente de linfocitos CD4+/CD8	1.1 (0.7-2.2)	1.6 (1.0-2.4)	0.143	1.9 (1.1-2.4)	1.8 (1.2-2.3)	0.788

Antivirales/inmunomoduladores						
Remdesivir	43 (86.0)	43 (76.8)	0.320	60 (82.2)	55 (79.7)	0.831
Anticuerpos monoclonales	0	1 (1.8)	1.000	4 (5.5)	1 (1.4)	0.230
Tocilizumab o baricitinib	40 (80.0)	44 (78.6)	1.0	38 (52.1)	41 (59.4)	0.402

Resultados						
Estancia hospitalaria	5 (3-7)	4 (3-7)	0.594	6 (4-10)	5 (3-7)	0.115
Mortalidad a los 28 días	5 (13.5)	3 (5.4)	0.370	13 (17.8)	2 (2.9)	0.005
Mortalidad a los 60 días	6 (16.2)	4 (7.1)	0.358	17 (23.3)	6 (8.7)	0.023
Mortalidad a los 90 días	6 (16.2)	4 (7.1)	0.358	19 (26.0)	6 (8.7)	0.008

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluye: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Tabla S3. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la variante de SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	Variante Delta	Variante Omicron	Total	P Valor
N (%)	106 (42.7)	142 (57.3)	248	
Sexo, masculino	61 (57.5)	73 (51.4)	134 (54.0)	0.369
Edad, años	61 (50-76)	77 (57-85)	70 (52- 83)	<0.001
Blanco, no hispano	91 (85.8)	130 (91.5)	221 (89.1)	0.216
Índice de comorbilidad de Charlson	2 (1-5)	5 (2-7)	4 (1- 6)	<0.001
Número de comorbilidades*	1 (0-3)	2 (0.2-4)	2 (0-4)	<0.001
Diabetes	24 (22.6)	36 (25.4)	60 (24.2)	0.655

Insuficiencia cardíaca congestiva	7 (6.6)	20 (14.1)	27 (10.9)	0.067
Enfermedad arterial coronaria	9 (8.5)	21 (14.8)	30 (12.1)	0.169
Antecedente de accidente cerebrovascular	5 (4.7)	15 (10.6)	20 (8.1)	0.105
Enfermedad arterial periférica	4 (3.8)	11 (7.7)	15 (6.0)	0.282
Enfermedad pulmonar	16 (15.1)	37 (26.1)	53 (21.4)	0.042
Enfermedad renal crónica	14 (13.2)	28 (19.7)	42 (16.9)	0.231
Neoplasia maligna	10 (9.4)	23 (16.2)	33 (13.3)	0.134
Condición inmunosupresora [£]	8 (7.5)	25 (17.6)	33 (13.3)	0.023
Infección previa por COVID-19	3 (2.8)	6 (4.2)	9 (3.6)	0.736
Estado vacunal				
No vacunado	28 (26.4)	39 (27.5)	67 (27.0)	0.886
Días desde la última dosis de vacuna	129 (69-180)	94 (67-176)	110 (67-178)	0.239
Presentación clínica				
Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso	6 (4-7)	4 (2-7)	5 (3-7)	0.004
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	346 (306-457)	350 (300-452)	350 (302-457)	0.984
Escala de gravedad de la OMS	4.0 (3.1 to 4.1)	3.9 (3.0 to 4.0)	4.0 (3.1 to 4.1)	0.287
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	58 (54.7)	60 (42.3)	118 (47.6)	0.098
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	0	142	142	
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR	24 (19-30)	21 (18-28)	22 (18-29)	0.040
Tiempo de muestreo desde el ingreso, días	1 (1-2)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.050
IgG-TriméricaS, BAU/mL	488 (18-4748)	745 (8-2308)	581 (10-3278)	0.455
IgG-TriméricaS, Positivo	78 (73.6)	94 (66.2)	172 (69.4)	0.265
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL				
IgG-N, Positivo	17 (16.0)	17 (12.0)	34 (13.7)	0.359
IGRA SARS-CoV-2, mUI/mL	253 (47-916)	191 (11-561)	206 (26-636)	0.095
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	56 (52.8)	69 (48.6)	125 (50.4)	0.524
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, ^{&} Positivo	23 (21.7)	39 (27.5)	62 (25.0)	0.374
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	49 (18-133)	34 (8-140)	42 (12-139)	0.133
Proteína C reactiva, mg/L	61 (29-99)	39 (20-89)	50 (24-97)	0.019
Dímero D, µg/mL	0.6 (0.4 to 1.0)	0.8 (0.5 to 1.9)	0.7 (0.4 to 1.4)	0.016
Ferritina, ng/mL	378 (163-546)	172 (84- 462)	238 (109-511)	<0.001
Recuento total de linfocitos, células/µL	798 (456-1066.0)	673 (461-973.5)	694 (461- 1066.0)	0.213
Recuento de linfocitos B, células/µL	59 (32-109)	60 (24-114)	60 (28-113)	0.580
Recuento de linfocitos T, células/µL	452 (280-738)	430 (285-626)	435 (281-660)	0.446
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	264 (140-414.0)	225 (150-370.8)	240 (146-376)	0.702
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.4 (0.9 to 2.3)	1.8 (1.2 to 2.4)	1.6 (1.0 to 2.4)	0.042
Antivirales/inmunomoduladores				
Remdesivir	86 (81.1)	115 (81.0)	201 (81.0)	1.000
Anticuerpos monoclonales	1 (0.9)	5 (3.5)	6 (2.4)	0.243
Tocilizumab o baricitinib	84 (79.2)	79 (55.6)	163 (65.7)	<0.001
Resultados				
Estancia hospitalaria, días	4.5 (3.0 to 7.0)	6.0 (4.0 to 8.0)	5.0 (3.0 to 8.0)	0.197
Ingreso en UCI	8 (7.5)	4 (2.8)	12 (4.8)	0.132
Mortalidad a los 28 días	9 (8.5)	15 (10.6)	24 (9.7)	0.667
Mortalidad a los 60 días	11 (10.4)	23 (16.2)	34 (13.7)	0.198
Mortalidad a los 90 días	11 (10.4)	25 (17.6)	36 (14.5)	0.145

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). * Esta categoría incluye: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. £ Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. & Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL.

Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Resultados dudosos del ensayo de liberación de IFN-γ del SARS-CoV-2

Un total de 28 (11,3%) pacientes mostraron resultados IGRA para el SARS-CoV-2 dudosos (100 a 200 mUI/mL). Compartieron varias similitudes con los pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 negativo en características demográficas, carga de comorbilidad y respuestas de anticuerpos TrimericS-IgG y N-IgG, aunque exhibieron recuentos más altos de células T y células T CD4+, así como valores de ferritina e IL-6 más altos, mostrando este último los valores numéricos más altos observados entre los grupos, y mayor frecuencia de COVID-19 previo (Tabla 1). Las tasas de frecuencia de ingreso a la UCI y de mortalidad a los 28, 60 y 90 días también fueron similares a las de los pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 negativo para el SARS-CoV-2.

Respuestas de IFN-γ a mitógenos (no específicos)

De 125 pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo 44 (35,2 %) tuvieron una respuesta positiva concomitante de IFN-γ inducida por mitógenos. Estos pacientes mostraron una puntuación de gravedad más baja de la OMS, un índice de Saturación periférica de oxígeno/ Fracción inspirada de oxígeno (SpO₂/FiO₂) (SpO₂/FiO₂) inicial más alto, una mayor frecuencia de vacunación y un mayor número de linfocitos T totales, y de linfocitos T CD4 que aquellos con solo respuestas de IFN-γ específicas del SARS-CoV-2 (Tabla 4). Las características de los 81 (64,8%) pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo con respuesta indeterminada inducida por mitógenos se compararon con las de los pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 negativo. Mostraron numerosas similitudes con el grupo general de pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo en términos demográficos, comorbilidades, criterios de gravedad al ingreso y respuestas de anticuerpos TrimericS-IgG y N-IgG.

También mostraron una mortalidad más baja en todos los momentos (Tabla 4). La comparación de pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo y respuestas de IFN-γ específicas o no específicas, con pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 negativo, mostró resultados similares (Tabla 4). Se obtuvo una segunda muestra para IGRA para el SARS-CoV-2 de 53 pacientes durante el seguimiento [mediana Q1-Q3, 54 (48-57) días]. De 41 (77,3%) pacientes con respuesta mitógena inicial indeterminada, 36 (87,8%) cambiaron a respuesta positiva, y de 23 con respuesta específica negativa inicial, 13 (57%) cambiaron a respuesta positiva.

Tabla 4. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo y concomitante IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2 positivo.

Característica	S-IGRA (+) & M-IGRA (+)	S-IGRA (+) & M-IGRA (-)	P ¹	S-IGRA (-)	P ²	P ³
n (%)	44 (31.7)	81 (46.0)		95 (68.3)		
Sexo, masculino	20 (45.5)	44 (54.3)	0.356	54 (56.8)	0.273	0.763
Edad	62 (48-79)	62 (50-79)	0.924	77 (58-85)	0.011	0.001
Índice de comorbilidad de Charlson	2 (1-6)	2 (1-6)	0.697	4 (2-7)	0.243	0.032
Número de comorbilidades*	1 (0-4)	1 (0-3)	0.910	2 (0-4)	0.186	0.111
Diabetes	11 (25.0)	16 (19.8)	0.503	27 (28.4)	0.838	0.219
Insuficiencia cardíaca congestiva	5 (11.4)	9 (11.1)	1.000	8 (8.4)	0.549	0.614
Enfermedad arterial coronaria	5 (11.4)	7 (8.6)	0.752	15 (15.8)	0.608	0.176
Antecedente de accidente	6 (13.6)	6 (7.4)	0.342	6 (6.3)	0.195	0.775
Enfermedad arterial periférica	2 (4.5)	7 (8.6)	0.491	5 (5.3)	1.000	0.389
Enfermedad pulmonar	7 (15.9)	18 (22.2)	0.498	21 (22.1)	0.498	1.000
Enfermedad renal crónica	4 (9.1)	12 (14.8)	0.416	20 (21.1)	0.096	0.330
Neoplasia maligna	5 (11.4)	12 (14.8)	0.786	12 (12.6)	1.000	0.826
Condición inmunosupresora†	6 (13.6)	12 (14.8)	0.550	9 (9.5)	0.558	0.352
Infección previa por COVID-19	1 (2.3)	4 (4.9)	0.656	1 (1.1)	0.534	0.182
Estado vacunal						
Días desde la última dosis de	83 (54-157)	99 (64-179)	0.317	119 (68-186)	0.149	0.496
No vacunado	6 (13.6)	27 (33.3)	0.047	28 (29.5)	0.056	0.626
Presentación clínica						
Días desde el inicio de síntomas	5 (2-7)	6 (3-8)	0.195	5 (3-7)	0.545	0.174
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	452 (350-)	350 (323-457)	0.005	343 (275-413)	<0.001	0.036
Escala de gravedad de la OMS >4	1 (2.3)	3 (3.7)	0.038	12 (12.6)	0.001	0.323
Infiltrados pulmonares bilaterales	16 (36.4)	46 (56.8)	0.220	44 (46.3)	0.374	0.115
Datos microbiológicos						
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	24 (54.5)	45 (55.6)	1.000	58 (61.1)	0.578	0.540
Valor umbral de ciclo más bajo en	23 (18-26)	24 (19-30)	0.198	22 (17-26)	0.262	0.100
IgG-TriméricaS, BAU/mL	1420 (334-)	608 (19-2800)	0.087	143 (4.8-2535)	0.008	0.152
IgG-TriméricaS, Positivo	39 (88.6)	60 (74.1)	0.067	56 (58.9)	<0.001	0.039
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	33 (75.0)	49 (60.5)	0.007	45 (47.4)	0.003	0.096
IgG-N, Positivo	4 (9.1)	19 (23.5)	0.055	8 (8.4)	1.000	0.007
IGRA SARS-CoV-2, mUI/mL	1269 (551-)	521 (310-1334)	<0.001	10 (0.5-43)	<0.001	<0.001
Valores de laboratorio						
Interleucina-6, pg/mL	45 (16-177)	37 (16-106)	0.330	29 (6-131)	0.125	0.290
Proteína C reactiva, mg/L	48 (22-74)	54 (26-97)	0.220	49 (23-103)	0.292	0.828
Dímero D, µg/mL	0.5 (0.3-1.0)	0.8 (0.5-1.2)	0.012	0.8 (0.4-2.3)	0.014	0.660
Ferritina, ng/mL	175 (97-)	279 (117-545)	0.009	248 (104-519)	0.023	0.598
Recuento de linfocitos periféricos,	835 (655-)	712 (420-980)	0.008	606 (419-951)	<0.001	0.414
Recuento de linfocitos B, células/µL	77 (41-147)	64 (37-120)	0.296	54 (23-89)	0.010	0.052
Recuento de linfocitos T, células/µL	636 (429-)	405 (270-591)	0.001	367 (224-566)	<0.001	0.269
Recuento de linfocitos T CD4+,	371 (192-)	211 (145-359)	0.001	193 (110-327)	<0.001	0.206
Cociente de linfocitos CD4+/CD8	2.0 (1.3-2.5)	1.5 (1.0-2.2)	0.100	1.4 (0.9-2.3)	0.051	0.519
Antivirales/inmunomoduladores						
Remdesivir	35 (79.5)	63 (77.8)	0.664	79 (83.2)	0.639	0.444
Anticuerpos monoclonales	43 (97.7)	1 (1.2)	0.578	91 (95.8)	1.000	0.376
Tocilizumab o baricitinib	15 (34.1)	25 (30.9)	0.630	36 (37.9)	0.709	0.345
Resultados						
Mortalidad a los 28 días	1 (2.3)	4 (4.9)	0.656	15 (15.8)	0.021	0.027
Mortalidad a los 60 días	4 (9.1)	6 (7.4)	0.740	19 (20.0)	0.142	0.018
Mortalidad a los 90 días	4 (9.1)	6 (7.4)	0.740	21 (22.1)	0.095	0.011

P¹ para la comparación de resultados de mitógeno positivo y negativo entre pacientes SARS-CoV-2 IGRA(+). P² para la comparación de pacientes IGRA(+) y mitógeno(+) con pacientes IGRA(-). P³ para la comparación de pacientes IGRA(+) y mitógeno(-) con pacientes IGRA(-). Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluye: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] $\geq$ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Rendimiento del ensayo de liberación de IFN- γ del SARS-CoV-2 para predecir la evolución de los pacientes hospitalizados por COVID-19

Un total de 24 (9,7%) pacientes fallecieron en los 28 días posteriores al ingreso hospitalario. Las características de los pacientes según los resultados de la enfermedad se muestran en la Tabla S4. La mortalidad se asoció con una edad más avanzada, una mayor carga de comorbilidad, una mayor gravedad de la enfermedad, una menor frecuencia de tratamiento con remdesivir y niveles más altos de todos los biomarcadores. En un modelo de Cox ajustado por edad, carga de comorbilidad, puntuación de gravedad de la OMS, respuesta humoral de TrimericS-IgG positiva, recuentos de linfocitos y terapia con remdesivir, el IGRA para el SARS-CoV-2 negativo fue un predictor independiente de mortalidad (Tabla 5).

Tabla S4. Análisis univariante de la mortalidad a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Característica	Muerte 28 días	No muerte 28 días	Total	P Value
n (%)	24 (9.7)	224 (90.3)	248	
Sexo, masculino	11 (45.8)	123 (54.9)	134	0.519
Edad, años	87 (81-89)	66 (51-81)	70 (52-83)	<0.001
Índice de comorbilidad de Charlson	7 (5-9)	3 (1-6)	4 (1-6)	<0.001
Número de comorbilidades*	4 (2-5)	1 (0-3)	2 (0-4)	<0.001
Diabetes	8 (33.3)	52 (23.2)	60 (24.2)	0.315
Insuficiencia cardíaca congestiva	4 (16.7)	23 (10.3)	27 (10.9)	0.310
Enfermedad arterial coronaria	9 (37.5)	21 (9.4)	30 (12.1)	0.001
Antecedente de accidente cerebrovascular	5 (20.8)	15 (6.7)	20 (8.1)	0.032
Enfermedad arterial periférica	2 (8.3)	13 (5.8)	15 (6.0)	0.645
Enfermedad pulmonar	5 (20.8)	48 (21.4)	53 (21.4)	1.000
Enfermedad renal crónica	9 (37.5)	33 (14.7)	42 (16.9)	0.009
Neoplasia maligna	7 (29.2)	26 (11.6)	33 (13.3)	0.025
Condición inmunosupresora†	4 (16.7)	29 (12.9)	33 (13.3)	0.538
Infección previa por COVID-19	0	9 (4.0)	9 (3.6)	1.000
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna	118 (85-61)	105 (66-179)	110 (67-78)	0.475
No vacunado	7 (29.2)	60 (26.8)	67 (27.0)	0.811
Pauta completa	17 (70.8)	164 (73.2)	181 (73.0)	
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas	4 (3-8)	5 (3-7)	5 (3-7)	0.563

Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	2.7 (2.3-3.5)	3.5 (3.1-4.6)	3.5 (3.0-4.6)	0.563
Escala de gravedad de la OMS >4	5 (20.8)	13 (5.8)	18 (7.3)	0.020
Infiltrados pulmonares bilaterales	12 (50.0)	106 (47.3)	118 (47.6)	0.615
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	15 (62.5)	127 (56.7)	142 (57.3)	0.667
Valor umbral de ciclo más bajo en PCR	22 (17-26)	23 (18-29)	22 (18-29)	0.319
IgG-TriméricaS, BAU/mL	978 (5-5673)	580 (14-2808)	581 (10-3278)	0.994
IgG-TriméricaS, Positivo	14 (58.3)	158 (70.5)	172 (69.4)	0.246
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	13 (54.2)	128 (57.1)	141 (56.9)	0.830
IgG-N, Positivo	4 (16.7)	30 (13.4)	34 (13.7)	0.753
IGRA SARS-CoV-2, mUI/mL	20 (2-145)	247 (43-713)	206 (26-636)	0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	5 (20.8)	120 (53.6)	125 (50.4)	0.002
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	1 (4.2)	61 (27.2)	62 (25.0)	0.012
Mitógeno-QuantiFERON-TB, mediana(RIC)	7.0 (1.1-9.8)	9.7 (3.4-10.0)	9.7 (3.2-10.0)	0.143
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	140 (55-450)	38 (11-123)	42 (12-139)	<0.001
Proteína C reactiva, mg/L	75 (45-159)	48 (22-93)	50 (24-97)	0.022
Dímero D, µg/mL	1.1 (0.7-3.6)	0.7 (0.4-1.3)	0.7 (0.4-1.4)	0.001
Ferritina, ng/mL	620 (190-910)	229 (101-489)	238 (109-511)	0.003
Recuento de linfocitos periféricos,	681 (429-962)	697 (462-1024)	694 (461-1013)	0.532
Recuento de linfocitos B, células/µL	29 (20-59)	61 (31-117)	60 (28-113)	0.015
Recuento de linfocitos T, células/µL	455 (269-574)	431 (281-684)	435 (281-660)	0.686
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	257 (160-382)	239 (145-376)	240 (146-376)	0.903
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.6 (1.1-2.1)	1.6 (1.0-2.4)	1.6 (1.0-2.4)	0.799
Antivirales/inmunomoduladores				
Remdesivir	15 (62.5)	186 (83.0)	201 (81.0)	0.025
Anticuerpos monoclonales	0 (0.0)	6 (2.7)	6 (2.4)	1.000
Tocilizumab o baricitinib	12 (50.0)	151 (67.4)	163 (65.7)	0.113

Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se expresan como número (porcentaje). *Esta categoría incluye: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. ‡Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Además, la carga de comorbilidad y una puntuación de gravedad de la OMS > 4 también se identificaron como predictores independientes de mortalidad. La sensibilidad de un resultado negativo de IGRA para SARS-CoV-2 para predecir la mortalidad fue del 63% [intervalo de confianza (IC) del 95%: 57–69], especificidad del 54% (IC del 95 %: 48–60), valor predictivo positivo (VPP) 16% (IC 95% 11-21), y valor predictivo negativo (VPN) 96% (IC 95% 93-98). Usando una curva de características operativas del receptor (ROC), un valor de corte de IFN-γ de 150 mUI/mL tuvo una sensibilidad del 79% (IC 95% 61-93), una especificidad del 61% (IC 95% 55-68), 18 % (IC 95% 15-22) VPP, 96% (IC 95% 93-98) VPN y área bajo la curva (AUC) del 70% para predecir mortalidad (Figura 3).

Tabla 5. Modelo de Cox ajustado de predictores de mortalidad a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Variable	HR no ajustado (IC 95%)	P no ajustado	HR ajustado (IC 95%)	P ajustado
Edad >64 años	9.51 (2.24-40.43)	p=0.002	1.99 (0.43-9.29)	0.381
Índice de Charlson	1.32 (1.18-1.48)	p<0.001	1.42 (1.18-1.69)	<0.001
Escala de gravedad WHO>4	4.02 (1.50-10.78)	p=0.006	3.34 (1.14-9.74)	0.028
IGRA SARS-CoV-2 Positivo	0.24 (0.09-0.65)	p=0.005	0.24 (0.08-0.75)	0.009
IGRA SARS-CoV-2 Borderline	0.88 (0.29-2.65)	p=0.817	1.04 (0.33-3.28)	0.946
IgG-TriméricaS Positivo	4.02 (1.50-10.78)	p=0.006	0.47 (0.18-1.22)	0.122
Recuento de linfocitos periféricos (log 10), células/ μ L	0.45 (0.18-1.14)	p=0.093	0.92 (0.35-2.38)	0.857
Remdesivir	0.36 (0.16-0.83)	p=0.016	0.41 (0.17-0.97)	0.053

HR, razón de riesgo (hazard ratio); IC, intervalo de confianza

Figura 3. Curva ROC (característica operativa del receptor) para evaluar el rendimiento del ensayo de interferón- γ frente a SARS-CoV-2 en la predicción de la mortalidad a los 28 días. Fuente: Elaboración propia.

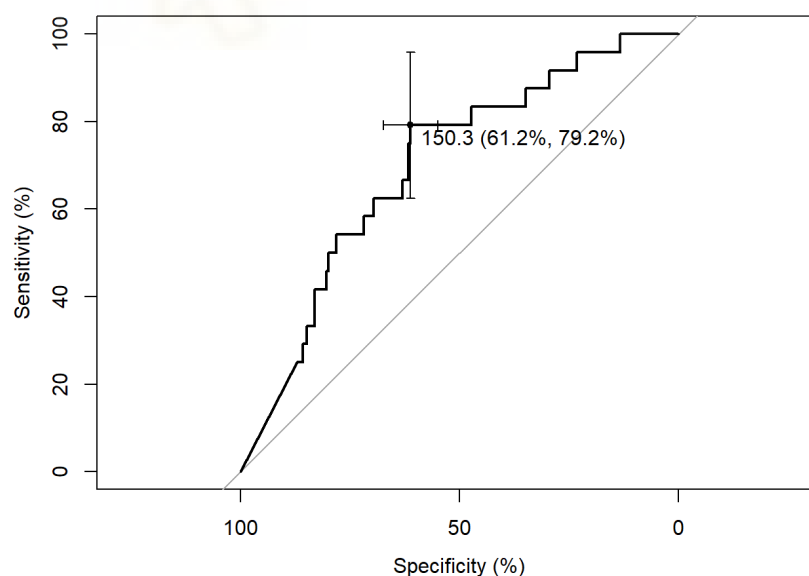
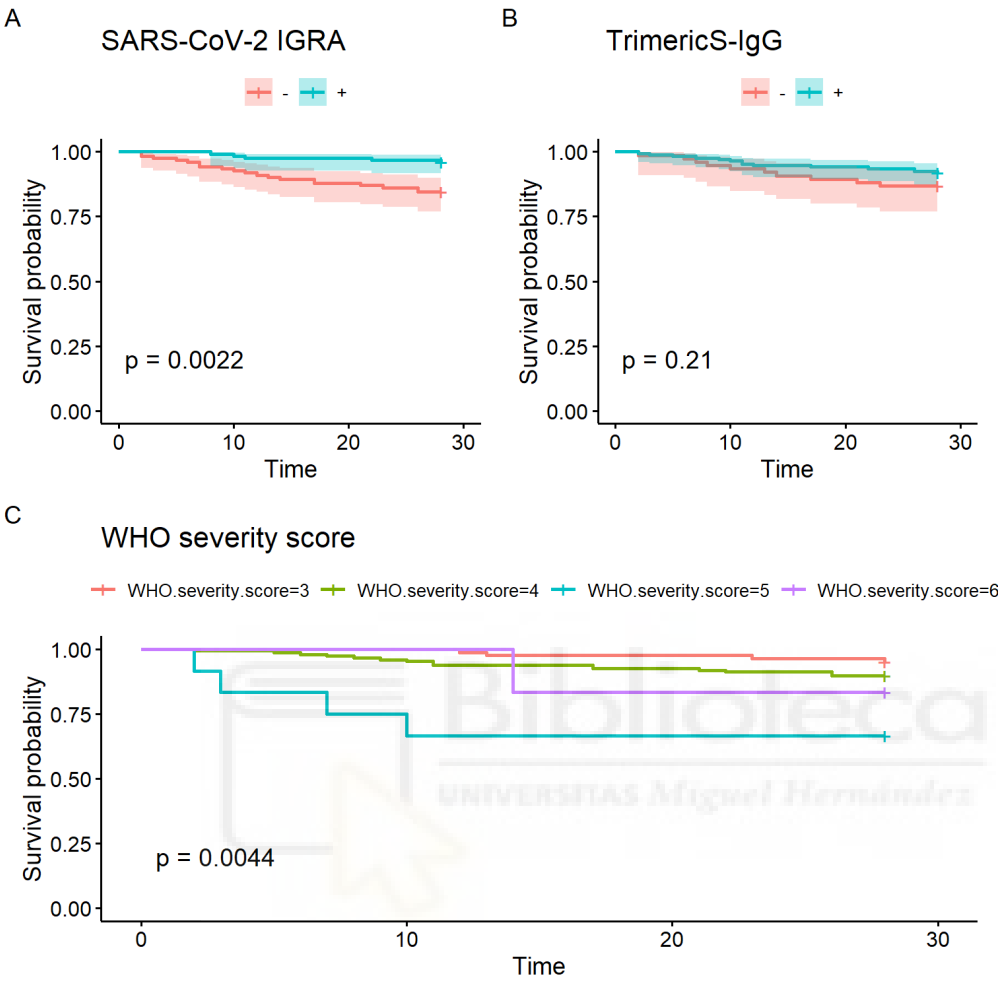


Figura 4. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier a los 28 días según las variables de interés.
Fuente: Elaboración propia.



6.2. ARTÍCULO II: T-Cell Immunity Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Measured by an Interferon- γ Release Assay Is Strongly Associated with Patient Outcomes in Vaccinated Persons Hospitalized with Delta or Omicron Variants

Descripción de la población de estudio

De 537 pacientes ingresados en el hospital debido a COVID-19 confirmado por PCR durante el período del estudio (julio de 2021-abril de 2022), 393 (73,2%) habían recibido alguna dosis de la vacuna contra el SARS-CoV-2. Entre ellos, 181 (46,1%) cumplieron los criterios de elegibilidad y fueron incluidos en el estudio. La mediana de tiempo desde la última dosis de vacuna hasta el ingreso hospitalario fue de 110 días (rango intercuartílico [RIC], 67–178 días), sin diferencias significativas entre las vacunas de ARNm y las de vectores virales. La variante del SARS-CoV-2 (103 Omicron, 78 Delta) se confirmó mediante secuenciación del genoma en 115 (64%) casos y mediante PCR múltiple en 53 (29%) casos, y en 13 (7%) casos con valores altos del umbral del ciclo de PCR de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) ($Ct \geq 35$), se asumió en base a la variante prevalente que circulaba en nuestro Departamento de Salud en el momento de la infección.

La Tabla suplementaria 1 resume las características iniciales, la vacunación y el estado clínico al ingreso, la terapia administrada durante la estancia hospitalaria y los resultados de los pacientes. Veinticinco (13,8%) pacientes murieron por cualquier causa desde el ingreso hospitalario hasta el día 28 o requirieron ingreso en UCI. Se recogieron muestras para medir las respuestas inmunitarias del SARS-CoV-2 con una mediana de 1 día (RIC, 1 -1) después del ingreso hospitalario, 6 días (RIC, 4-8) después del inicio de los síntomas y 3,7 meses (RIC 2,3-6) después de la última dosis de vacuna (Tabla suplementaria 1).

Tabla S-1. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19.

Característica	Total
n (%)	181
Sexo, masculino	102 (56.4)
Edad, mediana (RIC), años	74 (55-83)
Blanco, no hispano	162 (89.5)
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	4 (1-7)
Número de comorbilidades*, mediana (RIC)	2 (1-3)
Diabetes	51 (28.2)

Insuficiencia cardíaca congestiva	22 (12.2)
Enfermedad arterial coronaria	20 (11)
Antecedente de accidente cerebrovascular	16 (8.8)
Enfermedad arterial periférica	13 (7.2)
Enfermedad pulmonar	38 (21)
Enfermedad renal crónica	36 (19.9)
Neoplasia maligna	29 (16.0)
Condición inmunosupresora	30 (16.6)
Neoplasia hematológica activa	12 (6.6)
Recibiendo inmunosupresión	8 (4.4)
Quimioterapia activa	6 (3.3)
Trasplante de órgano sólido o médula ósea	3 (1.7)
VIH	1 (0.6)
Infección previa por COVID-19	9 (5.0)
Estado vacunal Tipo de vacuna:	
BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	125 (69.1)
mRNA-1273 (Moderna)	23 (12.7)
AZD1222 (Oxford-AstraZeneca)	13 (7.2)
Ad26.COVS.2 (Janssen-Johnson & Johnson)	20 (11)
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	110 (67-178)
Recepción de dosis de refuerzo [#]	78 (43.1)
Presentación clínica	
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	5 (3-7)
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso, mediana (RIC)	350 (309-457)
Escala de gravedad de la OMS, mediana (RIC)	4 (3-4)
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	77 (42.5)
Datos microbiológicos	
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	103 (56.9)
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (18-27)
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1710 (266-5670)
IgG-TriméricaS, Positivo	158 (87.3)
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	136 (75.1)
IgG-N, Positivo	23 (12.7)
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	221 (33-635)
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	92 (50.8)
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, ^{&} Positivo	51 (28.2)
Valores de laboratorio disponibles	
Interleucina-6, pg/mL	42 (12-139)
Proteína C reactiva, mg/L	52 (23-98)
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.4-1.4)
Ferritina, ng/mL	221 (99-487)
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	699 (487-999)
Recuento de linfocitos B, células/µL	54 (25-117)
Recuento de linfocitos T, células/µL	455 (304-703)
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	249 (154-376)

Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.5 (0.98-2.29)
Terapia antiviral e inmunomoduladora	
Remdesivir	144 (79.6)
Anticuerpos monoclonales	5 (2.8)
Tocilizumab o baricitinib	118 (65.2)
Dexametasona o metilprednisolona^	172 (95%)
Resultados	
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	5 (3-8)
Muerte intrahospitalaria	13 (7.2)
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	25 (13.8)
Mortalidad a los 28 días	17 (9.4)
Mortalidad a los 60 días	27 (14.9)
Mortalidad a los 90 días	28 (15.5)

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] ≥ 400 mUI/mL. ^En la mayoría de los casos (146/172, 84,9%) se administró al ingreso hospitalario con una mediana (RIC) de 1 (1-1) día antes de la prueba IGRA. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Un total de 158 de los 181 pacientes (87,3%) tenían anticuerpos detectables contra el SARS-CoV-2, 92 (50,8%) mostraron respuesta de células T específicas en IGRA para SARS-CoV-2 y 87 (48,1%) tenían tanto anticuerpos como respuesta de células T.

Características de los pacientes según inmunidad humoral y celular preexistente al SARS-CoV-2

La Tabla suplementaria 2 muestra las características de los pacientes agrupados según si tenían o no anticuerpos frente a la Spike (TrimericS-IgG). Los pacientes seronegativos tenían más probabilidades de tener condiciones de inmunodepresión, tenían valores Ct de RT-PCR más bajos y tenían menos probabilidades de tener IGRA para SARS-CoV-2 positivo y N-IgG positivo. También tenían recuentos más bajos de linfocitos periféricos totales, células B y células T CD4, con un mayor porcentaje de células T CD8 y una proporción más alta del cociente CD4/CD8. No se observaron otras diferencias significativas en la presentación clínica o los resultados según la seropositividad (Tabla suplementaria 2).

Tabla S-2. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la presencia de respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	Negativo TrimericS-IgG	Positivo TrimericS-IgG	Total	P Valor
n (%)	23 (12.7)	158 (87.3)	181	
Sexo, masculino	14 (60.9)	88 (55.7)	102 (56.4)	0.822
Edad, mediana (RIC), años	63 (54-82)	74 (55-84)	74 (55-83)	0.346
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	4 (2-6.5)	4 (1-7)	4 (1-7)	0.899
Número de comorbilidades*, mediana (RIC)	2 (1-4)	2 (0-3)	2 (1-3)	0.234
Diabetes	8 (34.8)	43 (27.2)	51 (28.2)	0.463
Insuficiencia cardíaca congestiva	4 (17.4)	18 (11.4)	22 (12.2)	0.491
Enfermedad arterial coronaria	3 (13)	17 (10.8)	20 (11)	0.724
Antecedente de accidente cerebrovascular	1 (4.3)	15 (9.5)	16 (8.8)	0.698
Enfermedad arterial periférica	1 (4.3)	12 (7.6)	13 (7.2)	1.000
Enfermedad pulmonar	6 (26.1)	32 (20.3)	38 (21)	0.584
Enfermedad renal crónica	8 (34.8)	28 (17.7)	36 (19.9)	0.089
Neoplasia maligna	5 (21.7)	24 (15.2)	29 (16)	0.379
Condición inmunosupresora [‡]	10 (43.5)	20 (12.7)	30 (16.6)	0.001
Infección previa por COVID-19	0 (0)	9 (5.7)	9 (5)	0.606
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	95 (73-112)	116 (67-181)	110 (67-178)	0.251
Recepción de dosis de refuerzo [#]	11 (47.8)	67 (42.4)	78 (43.1)	0.657
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	5 (4-7)	4.5 (2-7)	5 (3-7)	0.699
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso, mediana (RIC)	343 (279-452)	350 (314-457)	350 (309-457)	0.598
Escala de gravedad de la OMS	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.270
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	12 (52.2)	65 (41.1)	77 (42.5)	0.494
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	12 (52.2)	91 (57.6)	103 (56.9)	0.657
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	18 (16-25)	22 (18-28)	22 (18-27)	0.023
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.544
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	4.8 (4.8-14)	1920 (733-6325)	1710 (266-5670)	<0.001
IgG-TriméricaS, Positivo	0 (0)	158 (100)	158 (87.3)	
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	0 (0)	136 (86.1)	136 (75.1)	<0.001
IgG-N, Positivo	0 (0)	23 (14.6)	23 (12.7)	0.049
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	27 (6-174)	265 (45-704)	221 (33-635)	0.005
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	5 (21.7)	87 (55.1)	92 (50.8)	<0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, ^{&} Positivo	3 (13)	48 (30.4)	51 (28.2)	0.003
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	41 (11-143)	43 (12-138)	42 (12-139)	0.696

Proteína C reactiva, mg/L	33 (21-68)	55 (24-100)	52 (23-98)	0.296
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.5-1.4)	0.7 (0.4-1.4)	0.8 (0.4-1.4)	0.794
Ferritina, ng/mL	182 (85-532)	223 (100-474)	221 (99-487)	0.976
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	483 (333-874)	748 (516-998)	699 (487-999)	0.012
Recuento de linfocitos B, células/µL	18 (5-52)	59 (29-118)	54 (25-117)	<0.001
Recuento de linfocitos T, células/µL	331 (206-499)	467 (326-711)	455 (304-703)	0.029
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	164 (75-293)	262 (160-387)	249 (154-376)	0.005
Porcentaje de linfocitos T CD8, %	29.2 (22.3-41.4)	22.8 (16.8-31.9)	23.4 (17.2-33.5)	0.012
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.0 (0.62-1.54)	1.6 (1.02-2.36)	1.5 (0.98-2.29)	0.002
Antivirales/inmunomoduladores				
Remdesivir	20 (87)	124 (78.5)	144 (79.6)	0.421
Anticuerpos monoclonales	4 (17.4)	1 (0.6)	5 (2.8)	0.001
Tocilizumab o Baricitinib	15 (65.2)	103 (65.2)	118 (65.2)	1.000
Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	7 (4-10)	5 (3-8)	5 (3-8)	0.075
Muerte intrahospitalaria	3 (13)	10 (6.3)	13 (7.2)	0.218
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	6 (26.1)	19 (12.0)	25 (13.8)	0.099
Mortalidad a los 28 días	3 (13)	14 (8.9)	17 (9.4)	0.458
Mortalidad a los 60 días	4 (17.4)	23 (14.6)	27 (14.9)	0.754
Mortalidad a los 90 días	4 (17.4)	24 (15.2)	28 (15.5)	0.761

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Las características de los individuos según la reactividad específica de las células T frente al IGRA para SARS-CoV-2 se muestran en la Tabla 1. Los pacientes con resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2 eran significativamente mayores y tendían a tener una puntuación del Índice de Comorbilidad de Charlson (CCI) más alta. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a su estado de vacunación, infección previa por SARS-CoV-2 o tiempo desde la aparición de los síntomas hasta el ingreso hospitalario. En comparación con los pacientes que mostraron respuestas específicas de células T con IGRA para SARS-CoV-2, aquellos con resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2 tenían una peor situación clínica al ingreso, con una relación SpO2/FiO2 más baja y una puntuación en la escala pronóstica ordinal de 7 puntos de la OMS más alta, y tenían niveles más bajos de linfocitos periféricos y células B, recuentos de células T y de células T CD4. Además, tenían más probabilidades de necesitar

ingreso en la UCI o morir por cualquier causa hasta el día 28, y tenían una mortalidad significativamente mayor a los 28, 60 y 90 días. Se observaron tendencias similares al comparar sólo a pacientes infectados con la variante Omicron (Tabla suplementaria 3) y cuando sólo las personas que exhibían respuestas positivas de células T específicas (IGRA para SARS-CoV-2) y liberación inespecífica de IFN- γ (mitógeno-SARS-CoV-2 IGRA) se incluyeron en el análisis (Tabla suplementaria 4).

Tabla 1. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la presencia de respuesta celular frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	Negativo IGRA	Positivo IGRA	Total	P Valor
n (%)	89 (49.2)	92 (50.8)	181	
Sexo, masculino	53 (59.6)	49 (53.3)	102 (56.4)	0.454
Edad, mediana (RIC), años	78 (60-85)	65 (51-80)	74 (55-83)	0.002
Blanco, no hispano	83 (93.3)	79 (85.9)	162 (89.5)	0.168
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	5 (2-7)	3 (1-7)	4 (1-7)	0.060
Número de comorbilidades*, mediana (RIC)	2 (1-4)	2 (0-3)	2 (1-3)	0.156
Diabetes	26 (29.2)	25 (27.2)	51 (28.2)	0.869
Insuficiencia cardíaca congestiva	10 (11.2)	12 (13.0)	22 (12.2)	0.821
Enfermedad arterial coronaria	11 (12.4)	9 (9.8)	20 (11)	0.640
Antecedente de accidente cerebrovascular	7 (7.9)	9 (9.8)	16 (8.8)	0.795
Enfermedad arterial periférica	6 (6.7)	7 (7.6)	13 (7.2)	1.000
Enfermedad pulmonar	20 (22.5)	18 (19.6)	38 (21)	0.716
Enfermedad renal crónica	22 (24.7)	14 (15.2)	36 (19.9)	0.137
Neoplasia maligna	14 (15.7)	15 (16.3)	29 (16.0)	1.000
Condición inmunosupresora ^f	14 (15.7)	16 (17.4)	30 (16.6)	0.843
Infección previa por COVID-19	4 (4.5)	5 (5.4)	9 (5.0)	1.000
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	112 (73-184)	95 (59-174)	110 (67-178)	0.125
Recepción de dosis de refuerzo ^h	39 (43.8)	39 (42.4)	78 (43.1)	0.881
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	4.5 (2-7)	5 (3-7)	5 (3-7)	0.626
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso, mediana (RIC)	343 (283-354)	354 (343-462)	350 (309-457)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS, mediana (RIC)	4 (4-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.001
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	38 (42.7)	39 (42.4)	77 (42.5)	0.254
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	51 (57.3)	52 (57.3)	103 (56.9)	1.000

Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (17-28)	23 (18-27)	22 (18-27)	0.351
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.749
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1600 (63-4970)	1820 (601-5933)	1710 (266-5670)	0.060
IgG-TriméricaS, Positivo	71 (79.8)	87 (94.6)	158 (87.3)	0.003
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	59 (66.3)	77 (83.7)	136 (75.1)	0.009
IgG-N, Positivo	10 (11.2)	13 (14.1)	23 (12.7)	0.657
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	30 (0.5-96)	631 (338-1729)	221 (33-635)	<0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	92 (100)	92 (50.8)	
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	13 (14.6)	38 (41.3)	51 (28.2)	<0.001
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	44 (9-141)	41 (14-138)	42 (12-139)	0.748
Proteína C reactiva, mg/L	50 (23-104)	53 (25-85)	52 (23-98)	0.786
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.5-2.1)	0.7 (0.4-1)	0.8 (0.4-1.4)	0.099
Ferritina, ng/mL	371 (113-539)	182 (97-350)	221 (99-487)	0.035
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	644 (458-926)	797 (542-1165)	699 (487-999)	0.036
Recuento de linfocitos B, células/µL	48 (22-87)	64 (30-137)	54 (25-117)	0.018
Recuento de linfocitos T, células/µL	410 (294-559)	511 (350-778)	455 (304-703)	0.018
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	226 (123-359)	289 (177-414)	249 (154-376)	0.025
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.4 (0.84-2.30)	1.6 (1.06-2.29)	1.5 (0.98-2.29)	0.263
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	73 (82)	71 (77.2)	144 (79.6)	0.464
Anticuerpos monoclonales	4 (4.5)	1 (1.1)	5 (2.8)	0.206
Tocilizumab o baricitinib	57 (64)	61 (66.3)	118 (65.2)	0.758
Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	6 (4-9)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.039
Muerte intrahospitalaria	12 (13.5)	1 (1.1)	13 (7.2)	0.001
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	20 (22.5)	5 (5.4)	25 (13.8)	0.001
Mortalidad a los 28 días	14 (15.7)	3 (3.3)	17 (9.4)	0.005
Mortalidad a los 60 días	19 (21.3)	8 (8.7)	27 (14.9)	0.021
Mortalidad a los 90 días	20 (22.5)	8 (8.7)	28 (15.5)	0.013

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. ‡Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Tabla S-3. Características de los pacientes hospitalizados por la variante Ómicron, según la presencia de respuesta celular frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	Negativo IGRA	Positivo IGRA	Total	P Valor
n (%)	51 (49.5)	52 (50.5)	103	
Sexo, masculino	25 (49)	30 (57.7)	55 (53.4)	0.432
Edad, mediana (RIC), años	82 (62-86)	76 (57-85)	79 (59-85)	0.100
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	5 (3-7)	5 (1-8)	5 (2-7)	0.963
Número de comorbilidades*, mediana (RIC)	2 (1-4)	3 (1-4)	3 (1-4)	0.438
Diabetes	13 (25.5)	18 (34.6)	31 (30.1)	0.391
Insuficiencia cardíaca congestiva	8 (15.7)	10 (19.2)	18 (17.5)	0.796
Enfermedad arterial coronaria	6 (11.8)	8 (15.4)	14 (13.6)	0.775
Antecedente de accidente cerebrovascular	4 (7.8)	8 (15.4)	12 (11.7)	0.358
Enfermedad arterial periférica	3 (5.9)	6 (11.5)	9 (8.7)	0.488
Enfermedad pulmonar	15 (29.4)	13 (25)	28 (27.2)	0.662
Enfermedad renal crónica	12 (23.5)	10 (19.2)	22 (21.4)	0.637
Neoplasia maligna	10 (19.6)	10 (19.2)	20 (19.4)	1.000
Condición inmunosupresora†	11 (21.6)	11 (21.2)	22 (21.4)	1.000
Infección previa por COVID-19	1 (2.0)	5 (9.6)	6 (5.8)	0.205
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	104 (73-188)	85 (58-158)	95 (67-177)	0.113
Recepción de dosis de refuerzo#	33 (64.7)	33 (63.5)	66 (64.1)	1.000
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	3 (2-6)	4 (2-7)	4 (2-7)	0.413
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso, mediana (RIC)	343 (281-389)	354 (343-462)	350 (306-455)	0.005
Escala de gravedad de la OMS	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.024
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	20 (39.2)	19 (36.5)	39 (37.9)	0.784
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	51 (100)	52 (100)	103 (100)	0.657
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	20 (17-26)	21 (18-28)	20 (17-27)	0.312
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.618
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1260 (63-2955)	1820 (833-5078)	1610 (380-4280)	0.017
IgG-TriméricaS, Positivo	41 (80.4)	50 (96.2)	91 (88.3)	0.015
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	35 (68.6)	47 (90.4)	82 (79.6)	0.007
IgG-N, Positivo	4 (7.8)	7 (13.5)	11 (10.7)	0.526
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	14 (0.5-66)	623 (338-1185)	209 (14-623)	<0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	52 (100)	52 (50.5)	
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2,& Positivo	12 (23.5)	22 (42.3)	34 (33.0)	0.059
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	33 (6-130)	34 (10-138)	33 (7-139)	0.864
Proteína C reactiva, mg/L	35 (17-105)	42 (20-76)	38 (18-94)	0.901
Dímero D, µg/mL	1 (0.4-2.3)	0.8 (0.5-1.3)	0.9 (0.5-1.9)	0.470
Ferritina, ng/mL	173 (82-531)	126 (66-280)	149 (73-441)	0.182

Recuento de linfocitos periféricos, células/ μ L	644 (473-946)	720 (510-981)	697 (486-962)	0.461
Recuento de linfocitos B, células/ μ L	39 (17-76)	63 (25-143)	52 (23-117)	0.033
Recuento de linfocitos T, células/ μ L	442 (304-559)	458 (346-711)	447 (318-632)	0.356
Recuento de linfocitos T CD4, células/ μ L	236 (155-366)	239 (177-374)	236 (158-371)	0.605
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.6 (0.99-2.38)	1.7 (1.19-2.29)	1.7 (1.08-2.35)	0.657
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	41 (80.4)	41 (78.8)	82 (79.6)	1.000
Anticuerpos monoclonales	4 (7.8)	0 (0)	4 (3.9)	0.057
Tocilizumab o Baricitinib	27 (52.9)	30 (57.7)	57 (55.3)	0.694
Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	6 (4-10)	5 (3-7)	6 (3-8)	0.325
Muerte intrahospitalaria	7 (13.7)	0 (0.0)	7 (6.8)	0.006
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	9 (17.6)	2 (3.8)	11 (10.7)	0.028
Mortalidad a los 28 días	8 (15.7)	2 (3.8)	10 (9.7)	0.052
Mortalidad a los 60 días	12 (23.5)	6 (11.5)	18 (17.5)	0.126
Mortalidad a los 90 días	13 (25.5)	6 (11.5)	19 (18.4)	0.080

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] $\geq$ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Tabla S-4. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 según la presencia o ausencia de respuestas celulares específicas e inespecíficas frente a SARS-CoV-2 en el momento del ingreso.

Característica	Negativo IGRA	Positivo IGRA & Positivo Mitogen IGRA	Total	P Valor
n (%)	89 (70.1)	38 (29.9)	127	
Sexo, masculino	53 (59.6)	19 (50)	72 (56.7)	0.335
Edad, mediana (RIC), años	78 (60-85)	64 (51-80)	75 (58-84)	0.013
Índice de comorbilidad de Charlson	5 (2-7)	4 (1-8)	5 (2-7)	0.294
Nº de comorbilidades*	2 (1-4)	2 (0-4)	2 (1-4)	0.608
Diabetes	26 (29.2)	11 (28.9)	37 (29.1)	1.000
Insuficiencia cardíaca congestiva	10 (11.2)	5 (13.2)	15 (11.8)	0.769
Enfermedad arterial coronaria	11 (12.4)	5 (13.2)	16 (12.6)	1.000
Antecedente de accidente cerebrovascular	7 (7.9)	4 (10.5)	11 (8.7)	0.732
Enfermedad arterial periférica	6 (6.7)	2 (5.3)	8 (6.3)	1.000
Enfermedad pulmonar	20 (22.5)	6 (15.8)	26 (20.5)	0.477
Enfermedad renal crónica	22 (24.7)	4 (10.5)	26 (20.5)	0.093

Neoplasia maligna	14 (15.7)	5 (13.2)	19 (15.0)	0.792
Condición inmunosupresora ^f	14 (15.7)	6 (15.8)	20 (15.7)	1.000
Infección previa por COVID-19	4 (4.5)	1 (2.6)	5 (3.9)	1.000
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	112 (73-184)	85 (58-158)	95 (67-177)	0.113
Recepción de dosis de refuerzo [#]	39 (43.8)	15 (39.5)	54 (42.5)	0.698
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	4.5 (2-7)	5 (2-7)	5 (2-7)	0.913
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso, mediana (RIC)	343 (283-354)	452 (350-462)	346 (305-452)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS	4 (4-4)	3 (3-4)	4 (3-4)	0.001
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	38 (42.7)	14 (36.8)	52 (40.9)	0.475
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	51 (57.3)	22 (57.9)	73 (57.5)	1.000
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (17-28)	22 (18-26)	22 (17-27)	0.467
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.621
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1600 (63-4970)	2045 (669-5458)	1690 (194-5215)	0.089
IgG-TriméricaS, Positivo	71 (79.8)	37 (97.4)	108 (85)	0.013
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	59 (66.3)	33 (86.8)	92 (72.4)	0.018
IgG-N, Positivo	10 (11.2)	3 (7.9)	13 (10.2)	0.753
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	30 (0.5-96)	1410 (578-2469)	67 (11-356)	<0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	38 (100)	38 (29.9)	<0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, ^{&} Positivo	13 (14.6)	38 (100)	51 (40.2)	<0.001
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	44 (9-141)	49 (17-180)	45 (12-159)	0.318
Proteína C reactiva, mg/L	50 (23-104)	8 (24-74)	50 (23-98)	0.427
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.5-2.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.7 (0.4-1.7)	0.037
Ferritina, ng/mL	371 (113-539)	182 (98-307)	227 (100-489)	0.017
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	644 (458-926)	804 (596-1445)	690 (486-996)	0.009
Recuento de linfocitos B, células/µL	48 (22-87)	74 (38-145)	54 (23-108)	0.021
Recuento de linfocitos T, células/µL	410 (294-559)	631 (412-1039)	454 (302-720)	0.004
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	226 (123-359)	370 (178-529)	249 (151-381)	0.003
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.4 (0.8-2.3)	2.0 (1.3-2.6)	1.6 (1.0-2.3)	0.068
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	73 (82.0)	32 (84.2)	105 (82.7)	1.000
Anticuerpos monoclonales	4 (4.5)	1 (2.6)	5 (3.9)	1.000

Tocilizumab o Baricitinib	57 (64.0)	26 (68.4)	83 (65.4)	0.688
---------------------------	-----------	-----------	-----------	-------

Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	6 (4-9)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.090
Muerte intrahospitalaria	12 (13.5)	0 (0.0)	12 (9.4)	0.018
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	20 (22.5)	2 (5.3)	22 (17.3)	0.021
Mortalidad a los 28 días	14 (15.7)	1 (2.6)	15 (11.8)	0.038
Mortalidad a los 60 días	19 (21.3)	4 (10.5)	23 (18.1)	0.209
Mortalidad a los 90 días	20 (22.5)	4 (10.5)	24 (18.9)	0.142

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. £Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] $\geq$ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

La Tabla 2 muestra las características de los pacientes (n = 87) que tenían tanto anticuerpos contra el SARS-CoV-2 como respuestas específicas de células T. En comparación con los casos con respuesta de anticuerpos únicamente (n = 71), los individuos con ambas respuestas inmunes eran más jóvenes, tenían un mejor estado clínico al ingreso con una relación SpO₂/FiO₂ más alta y una puntuación en la escala ordinal de 7 puntos de la OMS más baja, y tenían más probabilidades de estar vivos a los 28, 60 y 90 días después de la hospitalización (Tabla 2). Tenían un mayor recuento de células B, sin diferencias significativas en los recuentos de linfocitos totales y de células T. Se observó una tendencia similar en los resultados clínicos cuando solo se incluyeron en el análisis pacientes que presentaban respuesta positiva de células T específicas (IGRA) y liberación inespecífica de IFN- γ (mitógeno IGRA), con recuentos significativamente mayores de subpoblaciones de linfocitos (recuentos de células B [P = 0,047], células T [P = 0,027] y células T CD4 [P = 0,044]) en aquellos que mostraban TrimericS-IgG, IGRA para SARS-CoV-2 y mitógeno-IGRA positivos, que en aquellos con TrimericS-IgG positivo e IGRA para SARS-CoV-2 negativo (Tabla suplementaria 5).

Tabla 2. Características de los pacientes hospitalizados por COVID-19 con respuesta de anticuerpos positiva frente a SARS-CoV-2 según la presencia de respuesta celular en el momento del ingreso.

Característica	Positivo SARS-CoV-2 TrimericS-IgG		Total	P Valor
	Negativo IGRA	Positivo IGRA		
n (%)	71 (44.9)	87 (55.1)	158	
Sexo, masculino	41 (57.7)	47 (54)	88 (55.7)	0.748
Edad, mediana (RIC), años	78 (62-86)	68 (52-81)	74 (55-84)	0.002
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	5 (2-8)	3 (1-7)	4 (1-7)	0.073
Número de comorbilidades*, mediana (RIC)	2 (1-4)	2 (0-3)	2 (0-3)	0.392
Diabetes	18 (25.4)	25 (28.7)	43 (27.2)	0.720
Insuficiencia cardíaca congestiva	7 (9.9)	11 (12.6)	18 (11.4)	0.624
Enfermedad arterial coronaria	9 (12.7)	8 (9.2)	17 (10.8)	0.607
Antecedente de accidente cerebrovascular	6 (8.5)	9 (10.3)	15 (9.5)	0.789
Enfermedad arterial periférica	5 (7)	7 (8)	12 (7.6)	1.000
Enfermedad pulmonar	15 (21.1)	17 (19.5)	32 (20.3)	0.844
Enfermedad renal crónica	15 (21.1)	13 (14.9)	28 (17.7)	0.403
Neoplasia maligna	12 (16.9)	12 (13.8)	24 (15.2)	0.659
Condición inmunosupresora†	7 (9.9)	13 (14.9)	20 (12.7)	0.471
Infección previa por COVID-19	4 (5.6)	5 (5.7)	9 (5.7)	1.000
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	120 (70-195)	101 (65-177)	116 (67-181)	0.267
Recepción de dosis de refuerzo#	31 (43.7)	36 (41.4)	67 (42.4)	0.872
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	4 (2-7)	5 (3-7)	4.5 (2-7)	0.391
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso, mediana (RIC)	343 (291-354)	354 (343-462)	350 (314-457)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS, mediana (RIC)	4 (4-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.027
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	28 (39.4)	37 (42.5)	65 (41.1)	0.243
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	41 (57.7)	50 (57.5)	91 (57.6)	1.000
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (18-29)	23 (18-27)	22 (18-28)	0.911
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.967
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1930 (604-6230)	1910 (790-6530)	1920 (733-6325)	0.860
IgG-TriméricaS, Positivo	71 (100)	87 (100)	158 (100)	
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	59 (83.1)	77 (88.5)	136 (86.1)	0.362
IgG-N, Positivo	10 (14.1)	13 (14.9)	23 (14.6)	1.000
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	42 (0.5-89)	635 (344-1597)	265 (45-704)	<0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	87 (100)	87 (55.1)	<0.001

IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	11 (15.5)	37 (42.5)	48 (30.4)	<0.001
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	45 (10-127)	40 (13-139)	43 (12-138)	0.928
Proteína C reactiva, mg/L	60 (25-107)	54 (24-88)	55 (24-100)	0.621
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.5-2.1)	0.7 (0.4-1)	0.7 (0.4-1.4)	0.149
Ferritina, ng/mL	371 (118-531)	183 (98-350)	223 (100-474)	0.059
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	694 (502-961)	796 (562-1080)	748 (516-998)	0.288
Recuento de linfocitos B, células/µL	50 (26-97)	65 (39-137)	59 (29-118)	0.050
Recuento de linfocitos T, células/µL	452 (304-586)	511 (350-748)	467 (326-711)	0.129
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	240 (155-371)	285 (177-414)	262 (160-387)	0.270
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.7 (0.99-2.40)	1.6 (1.05-2.29)	1.6 (1.02-2.36)	0.944
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	57 (80.3)	67 (77)	124 (78.5)	0.699
Anticuerpos monoclonales	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.6)	0.449
Tocilizumab o baricitinib	45 (63.4)	58 (66.7)	103 (65.2)	0.738
Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	6 (3-8)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.168
Muerte intrahospitalaria	9 (12.7)	1 (1.1)	10 (6.3)	0.005
Mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días	14 (19.7)	5 (5.7)	19 (12.0)	0.012
Mortalidad a los 28 días	11 (15.5)	3 (3.4)	14 (8.9)	0.011
Mortalidad a los 60 días	15 (21.1)	8 (9.2)	23 (14.6)	0.042
Mortalidad a los 90 días	16 (22.5)	8 (9.2)	24 (15.2)	0.026

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. £Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Tabla S-5. Características de los pacientes con IgG-TriméricaS positiva frente a SARS-CoV-2 según la presencia de respuestas celulares específicas e inespecíficas en el momento del ingreso.

Característica	Positivo SARS-CoV-2 TrimericS-IgG		Total	P Valor
	IGRA Negativo	IGRA Positivo & Mitógeno IGRA Positivo		
n (%)	71 (65.7)	37 (34.3)	108	
Sexo, masculino	41 (57.7)	19 (51.4)	60 (55.6)	0.547
Edad, mediana (RIC), años	78 (62-86)	65 (51-80)	76 (58-85)	0.013
Índice de comorbilidad de Charlson	5 (2-8)	4 (1-8)	5 (2-8)	0.344
Nº de comorbilidades*	2 (1-4)	2 (0-4)	2 (1-4)	0.992
Diabetes	18 (25.4)	11 (29.7)	29 (26.9)	0.652

Insuficiencia cardíaca congestiva	7 (9.9)	5 (13.5)	12 (11.1)	0.624
Enfermedad arterial coronaria	9 (12.7)	8 (9.2)	17 (10.8)	0.607
Antecedente de accidente cerebrovascular	6 (8.5)	4 (10.8)	10 (9.3)	1.000
Enfermedad arterial periférica	5 (7)	2 (5.4)	7 (6.5)	1.000
Enfermedad pulmonar	15 (21.1)	6 (16.2)	21 (19.4)	0.616
Enfermedad renal crónica	15 (21.1)	4 (10.8)	19 (17.6)	0.286
Neoplasia maligna	12 (16.9)	5 (13.5)	17 (15.7)	0.784
Condición inmunosupresora ^a	7 (9.9)	6 (16.2)	13 (12)	0.362
Infección previa por COVID-19	4 (5.6)	1 (2.7)	5 (4.6)	0.659

Estado vacunal

Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	120 (70-195)	86 (59-158)	118 (67-181)	0.184
Recepción de dosis de refuerzo [#]	31 (43.7)	14 (37.8)	45 (41.7)	0.681

Presentación clínica

Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	4 (2-7)	5 (2-7)	4 (2-7)	0.845
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso, mediana (RIC)	343 (291-354)	452 (350-462)	350 (309-452)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS	4 (4-4)	3 (3-4)	4 (3-4)	0.001
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	28 (39.4)	14 (37.8)	42 (38.9)	0.490

Datos microbiológicos

Variante SARS-CoV-2, Ómicron	41 (57.7)	22 (59.5)	63 (58.3)	1.000
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (18-29)	23 (18-26)	22 (18-28)	0.919
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.453
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1930 (604-6230)	2270 (840-5690)	1985 (623-6190)	0.851
IgG-TriméricaS, Positivo	71 (100)	37 (100)	108 (100)	
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	59 (83.1)	33 (89.2)	92 (85.2)	0.570
IgG-N, Positivo	10 (14.1)	3 (8.1)	13 (12.0)	0.536
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC),	42 (0.5-89)	1353 (575-2375)	111 (17-578)	<0.001

IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0 (0)	37 (100)	37 (34.3)	
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	11 (15.5)	37 (100)	48 (44.4)	<0.001
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	45 (10-127)	51 (17-182)	45 (14-163)	0.352
Proteína C reactiva, mg/L	60 (25-107)	43 (23-73)	54 (24-99)	0.252
Dímero D, µg/mL	0.8 (0.5-2.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.7 (0.4-1.6)	0.066
Ferritina, ng/mL	371 (118-531)	182 (98-320)	225 (100-487)	0.022
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	694 (502-961)	803 (595-1403)	742 (534-999)	0.088
Recuento de linfocitos B, células/µL	50 (26-97)	76 (42-152)	59 (28-117)	0.047
Recuento de linfocitos T, células/µL	452 (304-586)	606 (397-948)	468 (312-738)	0.027
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	240 (155-371)	370 (178-507)	288 (161-389)	0.044
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.7 (1.0-2.4)	2.0 (1.3-2.4)	1.7 (1.1-2.4)	0.462
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	57 (80.3)	31 (83.8)	88 (81.5)	0.796
Anticuerpos monoclonales	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.9)	1.000
Tocilizumab o Baricitinib	45 (63.4)	25 (67.6)	70 (64.8)	0.832
Resultados				
Estancia hospitalaria, mediana (RIC), días	6 (3-8)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.302
Muerte intrahospitalaria	9 (12.7)	0 (0.0)	9 (8.3)	0.026
Mortalidad / UCI a los 28 días	14 (19.7)	2 (5.4)	16 (14.8)	0.051
Mortalidad a los 28 días	11 (15.5)	1 (2.7)	12 (11.1)	0.055
Mortalidad a los 60 días	15 (21.1)	4 (10.8)	19 (17.6)	0.286
Mortalidad a los 90 días	16 (22.5)	4 (10.8)	20 (18.5)	0.193

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. ‡Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN-γ[mitógeno] – IFN-γ[blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

La Tabla 3 muestra las características de las personas según la mortalidad a los 28 días o la necesidad de ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Los pacientes que murieron por cualquier causa en los siguientes 28 días o que necesitaron ingreso en la UCI eran mayores y tenían más afecciones médicas subyacentes, con un índice de comorbilidad de Charlson más alto. Tenían un peor estado clínico al ingreso, con una relación SpO₂/FiO₂ más baja y una puntuación en la escala ordinal de 7 puntos de la OMS más alta, tenían niveles más altos de biomarcadores inflamatorios (IL-6, PCR y ferritina) y recibían con menos frecuencia terapia antiviral con remdesivir. En comparación con los casos con un resultado favorable, tenían menos probabilidades de tener una respuesta inespecífica de IFN- γ y respuesta de células T específica en el IGRA para SARS-CoV-2, y tuvieron respuestas de IFN- γ cuantitativamente más bajas (Tabla 3 y Tabla suplementaria 6). No hubo diferencias significativas entre estos grupos en los niveles de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 o en los recuentos de linfocitos.

Tabla 3. Análisis univariante de la mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Característica	No Mortalidad/Ingreso en UCI 28 días	Mortalidad/Ingreso en UCI 28 días	Total	P Valor
n (%)	156 (86.2)	25 (13.8)	181	
Sexo, masculino	88 (56.4)	14 (56.0)	102 (56.4)	1.000
Edad, mediana (RIC), años	70 (52-83)	82 (74-89)	74 (54-83)	0.002
Índice de comorbilidad de Charlson	3 (1-7)	7 (5-9)	4 (1-7)	<0.001
Nº de comorbilidades*	2 (0-3)	3 (2-4)	2 (1-3)	0.001
Diabetes	38 (24.4)	13 (52)	51 (28)	0.008
Insuficiencia cardíaca congestiva	19 (12.2)	3 (12)	22 (12.2)	1.000
Enfermedad arterial coronaria	11 (7.1)	9 (36)	20 (11)	<0.001
Antecedente de accidente cerebrovascular	12 (7.7)	4 (16)	16 (8.8)	0.244
Enfermedad arterial periférica	11 (7.1)	2 (8)	13 (7.2)	0.696
Enfermedad pulmonar	32 (20.5)	6 (24)	38 (21)	0.791
Enfermedad renal crónica	26 (16.7)	10 (40)	36 (19.9)	0.013
Neoplasia maligna	22 (14.1)	7 (28.0)	29 (16.0)	0.136
Condición inmunosupresora†	25 (16)	5 (20)	30 (16.6)	0.572

Infección previa por COVID-19	9 (5.8)	0 (0)	9 (5.0)	0.614
Estado vacunal				
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	107 (66-180)	112 (80-156)	110 (67-178)	0.988
Recepción de dosis de refuerzo#	66 (42.3)	12 (48)	78 (43.1)	0.666
Presentación clínica				
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	5 (3-7)	6 (3-8)	5 (3-7)	0.339
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso, mediana (RIC)	350 (339-462)	280 (238-346)	350 (309-457)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS, mediana (RIC)	4 (3-4)	4 (4-5)	4 (3-4)	<0.001
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	64 (41)	13 (52)	77 (42.5)	0.498
Datos microbiológicos				
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	51 (57.3)	52 (57.3)	134 (56.9)	1.000
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	22 (18-28)	21 (16-25)	22 (18-27)	0.213
Tiempo de muestreo desde el ingreso, mediana (RIC), días	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.148
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1610 (312-4910)	2320 (43-8000)	1710 (266-5670)	0.744
IgG-TriméricaS, Positivo	139 (89.1)	19 (76)	158 (87.3)	0.099
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	119 (76.3)	17 (68)	136 (75.1)	0.454
IgG-N, Positivo	18 (11.5)	5 (20)	23 (12.7)	0.327
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	268 (44-713)	45 (4-145)	221 (33-635)	0.001
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	87 (55.8)	5 (20)	92 (50.8)	0.001
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	49 (31.4)	2 (8)	51 (28.2)	0.026
Valores de laboratorio				
Interleucina-6, pg/mL	36 (9-111)	152 (41-409)	42 (12-139)	0.001
Proteína C reactiva, mg/L	47 (21-88)	96 (47-163)	52 (23-98)	0.003
Dímero D, µg/mL	0.7 (0.4-1.3)	1 (0.6-4.4)	0.8 (0.4-1.4)	0.007
Ferritina, ng/mL	184 (94-435)	774 (468-921)	221 (99-487)	<0.001
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	699 (499-999)	739 (400-990)	699 (487-999)	0.673

Recuento de linfocitos B, células/ μ L	55 (26-117)	51 (21-119)	54 (25-117)	0.585
Recuento de linfocitos T, células/ μ L	460 (304-714)	428 (277-565)	455 (304-703)	0.451
Recuento de linfocitos T CD4, células/ μ L	259 (155-380)	240 (128-365)	249 (154-376)	0.472
Cociente de linfocitos CD4/CD8	1.5 (0.92-2.33)	1.3 (0.99-2.19)	1.5 (0.98-2.29)	0.434
Antivirales/Inmunomoduladores				
Remdesivir	128 (82.1)	16 (64)	144 (79.6)	0.058
Anticuerpos monoclonales	4 (2.6)	1 (4.0)	5 (2.8)	0.529
Tocilizumab o baricitinib	104 (66.7)	14 (56)	118 (65.2)	0.366

*Esta categoría incluye las siguientes condiciones médicas subyacentes: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, enfermedad neurológica crónica, enfermedad pulmonar crónica, neoplasias y condiciones inmunosupresoras. †Esta categoría incluye: VIH, trasplante de órgano sólido o médula ósea, neoplasia hematológica activa, inmunosupresión o quimioterapia activa. #Vacunación primaria completa más dosis de refuerzo. &Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] $\geq$ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; BAU, Unidades de Anticuerpos de Unión; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Tabla S-6. Respuesta celular al SARS-CoV-2 en función de la mortalidad a los 28 días o el ingreso en la UCI en personas hospitalizadas con COVID-19.

Característica	No mortalidad o UCI 28 días	Mortalidad o UCI 28 días	Total	P Valor
n (%)	N=156 (86.2)	N=25 (13.8)	N=181	
IGRA SARS-CoV-2, Positivo #	87 (55.8)	5 (20)	92 (50.8)	
Límite	18 (11.5)	4 (16)	22 (12.2)	0.002
Negativo	51 (32.7)	16 (64)	67 (37)	
IGRA SARS-CoV-2 mediana	268 (44-713)	45 (4-145)	221 (33-635)	0.001
IGRAMit-SARS-CoV-2, Positivo &	49 (31.4)	2 (8)	51 (28.2)	0.026
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2	115 (21-601)	14 (0-52)	77 (14-479)	<0.001
# IGRA SARS-CoV-2 Positivo	N=87 (94.6)	N=5 (5.4)	N=92	
Positivo Mit IGRA	36 (41.4)	2 (40)	38 (41.3)	
IGRA SARS-CoV-2 mediana	1410 (585-2500)	1444 (1004-1884)	1410 (578-2469)	0.844
IGRA Mit, mediana	1745 (765-2500)	1674 (1236-2112)	1745 (777-2500)	0.948
IGRA Mit Indeterminado n (%)	51 (58.6)	3 (60)	54 (58.7)	
IGRA, mediana	467 (309-807)	449 (355-659)	458 (309-837)	0.806
IGRA Mit, mediana	71 (24-179)	15 (7-34)	65 (21-168)	0.108

#Se definió como resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [SARS-CoV-2] – IFN- γ [blanco] >200 mUI/mL. &Se definió como

resultado positivo según el fabricante: IFN- γ [mitógeno] – IFN- γ [blanco] ≥ 400 mUI/mL. Los datos se presentan como n (%) salvo que se indique lo contrario. IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; RIC, rango intercuartílico; UCI, unidad de cuidados intensivos.

Las correlaciones de las respuestas humorales y celulares con los biomarcadores inflamatorios y el recuento de linfocitos se muestran en la Figura 1 suplementaria y en la Tabla 7 suplementaria.

Figura S-1: Correlación de las respuestas humoral y celular con biomarcadores inflamatorios y recuentos linfocitarios en pacientes hospitalizados por COVID-19. Fuente: Elaboración propia.

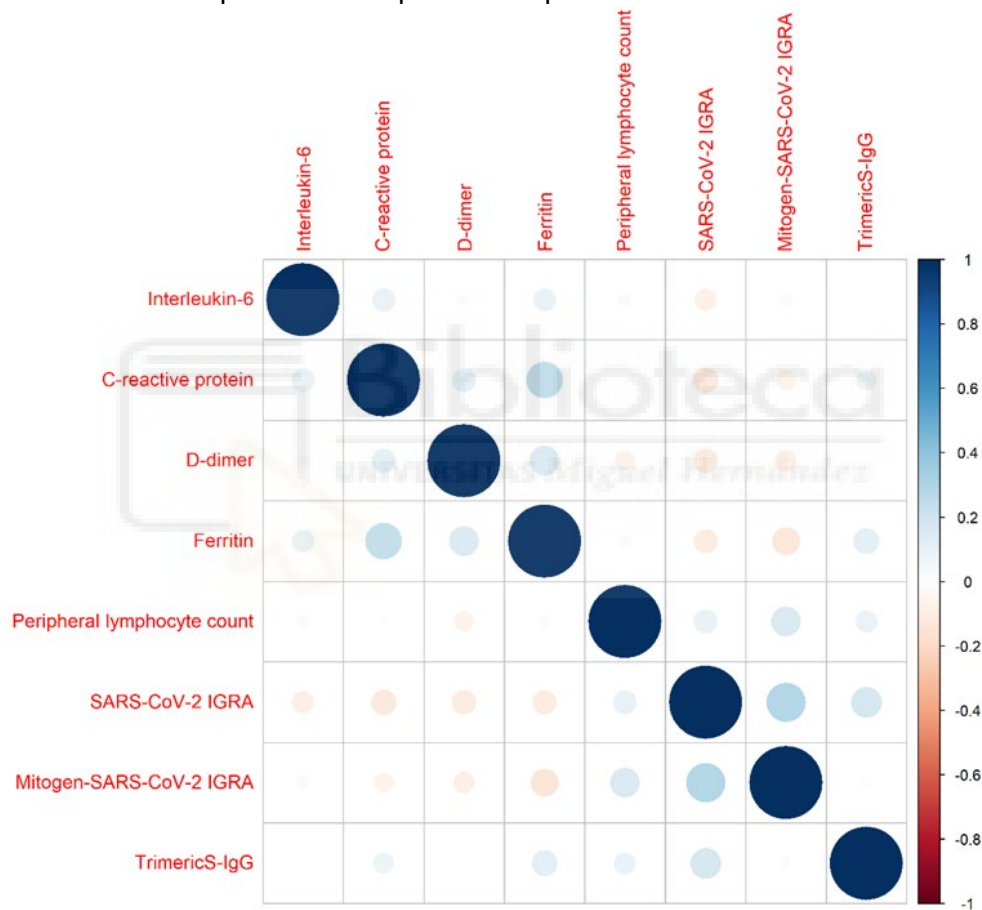


Tabla S-7. Correlación de biomarcadores con respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y células T en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Variable	Coefficiente	de	Coefficiente	de	Coefficiente	de
	correlación (IC 95%) *	p	correlación (IC 95%) *	p	correlación (IC 95%) *	p
	IGRA		Mitógeno IGRA		TrimericS-IgG	
Interleucina-6	-0.090 (-0.212, 0.035)	0.159	-0.026 (-0.150, 0.100)	0.689	-0.009 (-0.133, 0.116)	0.892
Proteína C reactiva	-0.112 (-0.233, 0.013)	0.079	-0.068 (-0.191, 0.057)	0.287	0.067 (-0.058, 0.190)	0.293

Dímero D	-0.107 (-0.229, 0.018)	0.093	-0.080 (-0.203, 0.045)	0.211	0.000 (-0.125, 0.124)	0.998
Ferritina	-0.100 (-0.223, 0.026)	0.120	-0.138 (-0.259, -0.012)	0.032	0.120 (-0.006, 0.242)	0.061
Recuento linfocitario	0.097 (-0.028, 0.220)	0.127	0.160 (0.035-0.279)	0.012	0.085 (-0.041, 0.207)	0.185

*Coeficiente de correlación de Pearson. IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2; IC, intervalo de confianza.

Las asociaciones ajustadas y no ajustadas con la muerte por cualquier causa desde el ingreso hospitalario hasta el día 28 o la necesidad de UCI en los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox se muestran en las Tablas suplementaria 8 y 4, respectivamente. Los factores significativamente asociados con un mayor riesgo de muerte a los 28 o la necesidad de UCI en el modelo ajustado final incluyeron una puntuación CCI más alta y una relación SpO2/FiO2 más baja al ingreso. Mientras que la infección causada por una variante de Omicron, tener respuesta positiva de IGRA para SARS-CoV-2, y tener respuesta positiva de anticuerpos se asociaron con mejores resultados respecto a mortalidad (Tabla 4). Se observaron tendencias similares para los desenlaces clínicos desfavorables (Tabla suplementaria 9). También se llevó a cabo un análisis multivariable ampliado post hoc que incluyó todos los biomarcadores inflamatorios con significación estadística ($p < 0,10$) en análisis univariantes (IL-6, PCR, ferritina y dímero D). En este modelo (Tabla suplementaria 10), la IL-6 y la ferritina fueron predictores adicionales de mortalidad a los 28 días o ingreso a la UCI.

Tabla 4. Asociaciones no ajustadas y ajustadas con la mortalidad a los 28 días o ingreso en UCI en personas hospitalizadas por COVID-19.*

Características	HR no ajustado (95% CI)	P Valor	HR ajustado (95% CI)	P Valor
Edad, años	1.04 (1.01-1.07)	0.003	0.99 (0.95-1.03)	0.678
Sexo femenino	1.04 (0.47-2.29)	0.927	1.64 (0.69-3.94)	0.266
Índice de comorbilidad de Charlson#	1.24 (1.11-1.39)	<0.001	1.29 (1.09-1.52)	0.003
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	2.80 (1.92-4.08)	<0.001	2.26 (1.46-3.50)	<0.001
Variante SARS-CoV-2, Omicron	0.55 (0.25-1.20)	0.133	0.40 (0.18-0.90)	0.027
IgG-S Trimérica, Positiva	0.44 (0.17-1.09)	0.077	0.34 (0.12-0.96)	0.041
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0.22 (0.08-0.58)	0.002	0.33 (0.12-0.95)	0.040
Remdesivir	0.41 (0.18-0.94)	0.034	0.54 (0.21-1.37)	0.197

* Las estimaciones se obtuvieron mediante el ajuste de modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariantes con ajuste multivariable. Se realizó el ajuste para edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), variante de SARS-CoV-2, TrimericS-IgG (punto de corte para positividad ≥ 33.8 BAU/mL), IGRA (punto de corte para positividad >200 mIU/mL) y uso de remdesivir. # Las estimaciones fueron similares cuando el índice de comorbilidad de Charlson fue reemplazado por el número de comorbilidades (aHR 1.43 [1.04-1.97]; p=0.027). UCI, unidad de cuidados intensivos; HR, razón de riesgo; IC, intervalo de confianza; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción de oxígeno inspirado; TrimericS-IgG, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma para SARS-CoV-2.

Tabla S-8. Asociaciones no ajustadas con la mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Característica	HR no ajustada (IC 95%)	P Valor
Sexo femenino	1.03 (0.47-2.26)	0.947
Edad, mediana (RIC), años	1.04 (1.01-1.07)	0.003
Índice de comorbilidad de Charlson, mediana (RIC)	1.24 (1.11-1.39)	<0.001
Número de comorbilidades, mediana (RIC)	1.60 (1.22-2.11)	<0.001
Infección previa por COVID-19	0.00 (0.00-∞)	0.997
Estado vacunal		
Días desde la última dosis de vacuna, mediana (RIC)	1.00 (1.00-1.00)	0.739
Recepción de dosis de refuerzo#	0.80 (0.36-1.75)	0.570
Presentación clínica		
Días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso, mediana (RIC)	0.92 (0.49-1.72)	0.790
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso, mediana (RIC)	2.80 (1.92-4.08)	<0.001
Escala de gravedad de la OMS, mediana (RIC)	11.1 (5.8-21.2)	<0.001
Infiltrados pulmonares bilaterales en radiografía	0.39 (0.09-1.66)	0.200
Datos microbiológicos		
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	0.55 (0.25-1.20)	0.140
Valor umbral de ciclo más bajo detectado en PCR, mediana (RIC)	0.96 (0.90-1.02)	0.232
IgG-TriméricaS, mediana (RIC), BAU/mL	1.00 (1.00-1.00)	0.057
IgG-TriméricaS, Positivo	0.42 (0.17-1.04)	0.061
IgG-TriméricaS >264 BAU/mL	0.66 (0.29-1.54)	0.338
IgG-N, Positivo	1.78 (0.67-4.74)	0.250
IGRA SARS-CoV-2, mediana (RIC), mUI/mL	1.00 (1.00-1.00)	0.040
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0.22 (0.08-0.58)	0.003
IGRA Mitógeno-SARS-CoV-2, & Positivo	0.21 (0.05-0.88)	0.033
Valores de laboratorio		
Interleucina-6, pg/mL	1.21 (1.08-1.36)	0.001
Proteína C reactiva, mg/L	1.96 (1.27-3.01)	0.002
Dímero D, µg/mL	1.71 (0.92-3.19)	0.089
Ferritina, ng/mL	1.11 (1.07-1.15)	<0.001
Recuento de linfocitos periféricos, células/µL	1.00 (0.96-1.05)	0.900
Recuento de linfocitos B, células/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.910
Recuento de linfocitos T, células/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.632
Recuento de linfocitos T CD4, células/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.500
Cociente de linfocitos CD4/CD8	0.88 (0.63-1.22)	0.432
Antivirales/inmunomoduladores		
Remdesivir	0.41 (0.18-0.94)	0.034
Anticuerpos monoclonales	1.54 (0.21-11.11)	0.675
Tocilizumab o baricitinib	0.66 (0.30-1.45)	0.295

*Las estimaciones se obtuvieron mediante regresión de riesgos proporcionales de Cox no ajustada. La razón de riesgo (HR) para variables ordinales y cuantitativas se expresó como sigue: edad (por año de incremento), índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), número de comorbilidades (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), escala de gravedad de la OMS (por unidad de incremento), IgG-TriméricaS (punto de corte para positividad $\geq 33,8$ BAU/mL), IGRA (punto de corte para positividad >200 mUI/mL), interleucina-6 (por incremento de 1 log₁₀ pg/mL), proteína C reactiva (por incremento de 100 mg/L), dímero D (por incremento de 10 mg/mL), ferritina (por incremento de 100 ng/mL), y recuento de linfocitos periféricos (por incremento de 100 células/mL). HR, razón de riesgo; IC, intervalo de confianza; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2.

Tabla S-9. Asociaciones ajustadas con la mortalidad a los 28, 60 y 90 días en pacientes hospitalizados por COVID-19. *

Característica N=181	Mortalidad global 28 días		Mortalidad global 60 días		Mortalidad global 90 días	
	aHR (95% CI)	P valor	aHR (95% CI)	P valor	aHR (95% CI)	P valor
Edad, años	1.00 (0.95-1.06)	0.887	1.03 (0.98-1.08)	0.205	1.03 (0.98-1.08)	0.256
Sexo femenino	1.67 (0.57-4.96)	0.352	1.01 (0.44-2.32)	0.974	1.10 (0.49-2.47)	0.822
Índice de comorbilidad de Charlson	1.53 (1.22-1.92)	<0.001*	1.34 (1.13-1.59)	<0.001*	1.36 (1.15-1.61)	<0.001*
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	3.28 (1.82-5.90)	<0.001*	2.08 (1.28-3.36)	0.003*	2.08 (1.30-3.34)	0.002*
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	0.78 (0.27-2.23)	0.642	0.85 (0.36-1.99)	0.707	0.90 (0.39-2.09)	0.803
IgG-TriméricaS, Positivo	0.37 (0.08-1.68)	0.199	0.66 (0.21-2.06)	0.477	0.68 (0.22-2.10)	0.500
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0.22 (0.06-0.86)	0.030*	0.43 (0.17-1.07)	0.069	0.38 (0.15-0.93)	0.034*
Remdesivir	0.50 (0.17-1.45)	0.199	0.56 (0.24-1.30)	0.177	0.50 (0.22-1.13)	0.093
Recuento de linfocitos periféricos	1.03 (0.98-1.08)	0.222	1.01 (0.97-1.05)	0.693	1.01 (0.97-1.05)	0.680

*Las estimaciones se obtuvieron mediante modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariable con ajuste multivariable. El ajuste se realizó para edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), variante SARS-CoV-2, IgG-TriméricaS (punto de corte para positividad $\geq 33,8$ BAU/mL), IGRA (punto de corte para positividad >200 mUI/mL), uso de remdesivir y recuento de linfocitos periféricos (por incremento de 100 células/mL). aHR, razón de riesgo ajustada; IC, intervalo de confianza; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2.

Tabla S-10. Asociaciones ajustadas con la mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19. *

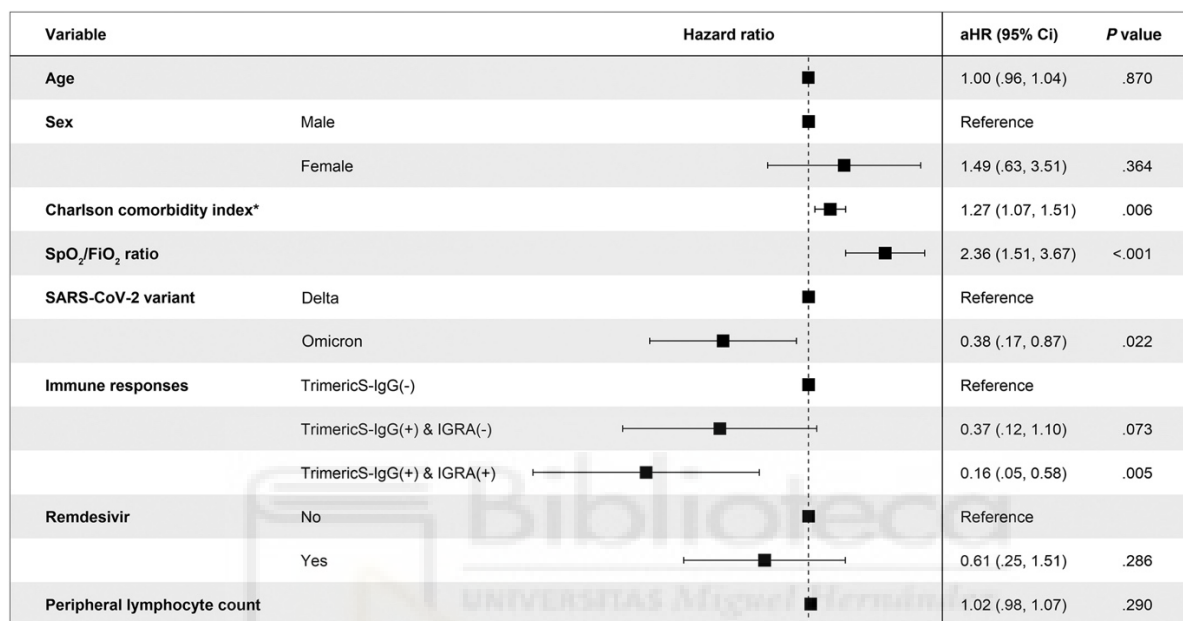
Característica	HR Ajustado (95% CI)	P Valor
Edad, años	0.98 (0.93-1.02)	0.247
Sexo femenino	1.32 (0.51-3.37)	0.565
Índice de comorbilidad de Charlson	1.23 (1.03-1.47)	0.021
SpO ₂ /FiO ₂	2.37 (1.40-4.03)	0.001
Variante SARS-CoV-2, Ómicron	0.51 (2.15-1.21)	0.126
IgG-TriméricaS, Positivo	0.19 (0.06-0.60)	0.005
IGRA SARS-CoV-2, Positivo	0.27 (0.08-0.89)	0.032

Remdesivir	0.45 (0.15-1.38)	0.165
Recuento de linfocitos periféricos	1.05 (0.99-1.10)	0.068
Interleucina-6	3.26 (1.51-7.04)	0.003
Proteína C reactiva	1.23 (0.66-2.31)	0.520
Dímero D	1.23 (0.66-4.52)	0.755
Ferritina	1.08 (1.03-1.14)	0.002

*Las estimaciones se obtuvieron mediante modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariable con ajuste multivariable. El ajuste se realizó para edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO2/FiO2 (por disminución de 100 unidades), variante SARS-CoV-2, IgG-TriméricaS (punto de corte para positividad $\geq 33,8$ BAU/mL), IGRA (punto de corte para positividad >200 mUI/mL), uso de remdesivir, recuento de linfocitos periféricos (por incremento de 100 células/mL), interleucina-6 (por incremento de 1 log10 pg/mL), proteína C reactiva (por incremento de 100 mg/L), dímero D (por incremento de 10 mg/mL) y ferritina (por incremento de 100 ng/mL). aHR, razón de riesgo ajustada; IC, intervalo de confianza; cociente SpO2/FiO2, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2.

Para evaluar los posibles efectos aditivos de las respuestas celulares y de anticuerpos sobre la protección frente a una evolución clínica desfavorable ajustamos los modelos de Cox incorporando las 3 variables que reflejan combinaciones de diferentes métricas de ambas respuestas: (1) respuesta de anticuerpos negativa, (2) respuesta de anticuerpos positiva y respuesta celular T-negativa, y (3) respuestas positivas de anticuerpos y células T. Encontramos que la puntuación del CCI (índice de riesgo ajustado [aHR], 1,27 [IC del 95%, 1,07–1,51]; $P = 0,006$), el número de comorbilidades (aHR, 1,45 [IC 95%, 1,04– 2,01]; $P = 0,026$), cociente SpO2/FiO2 al ingreso (aHR, 2,36 [IC 95%, 1,51–3,67]; $P < 0,001$) y la variante Omicron del SARS-CoV-2 (aHR, 0,38 [IC 95%, 0,17–0,87]; $P = 0,022$) se asociaron significativamente con la mortalidad a los 28 días o el ingreso en la UCI después de la hospitalización, pero la asociación más fuerte se observó para las respuestas compuestas positivas de anticuerpos y células T (aHR, 0,16 [IC 95%, 0,05–0,58]; $P = 0,005$) (Figuras 1 y 2 y Tabla suplementaria 11). Se observaron tendencias similares para los desenlaces clínicos desfavorables (Tabla suplementaria 12).

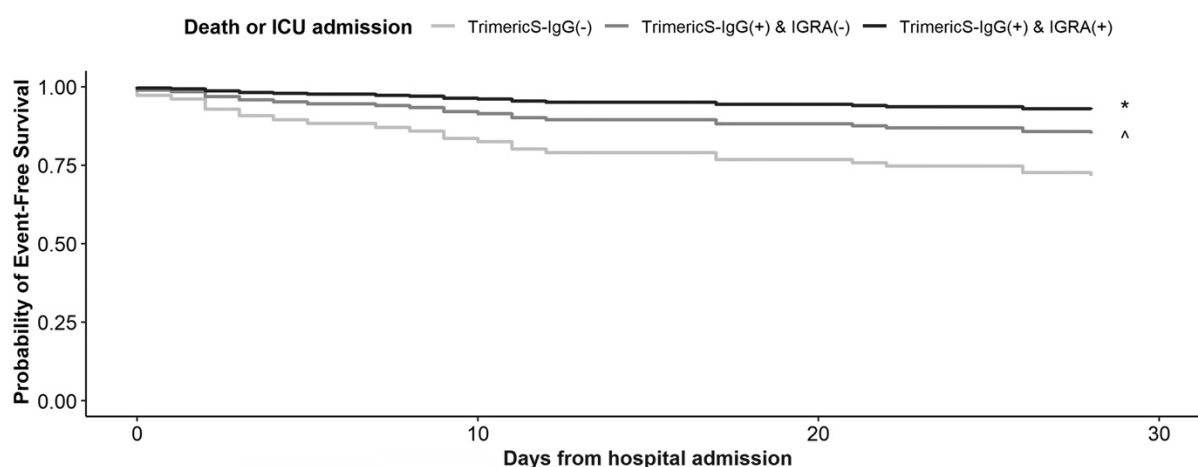
Figura 1. Predictores de mortalidad o ingreso en UCI a los 28 días en pacientes hospitalizados por COVID-19. Fuente: Elaboración propia.



* Las estimaciones se obtuvieron mediante un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariable que incorpora edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), variante SARS-CoV-2, uso de remdesivir y las tres variables que reflejan combinaciones de métricas de ambas respuestas inmunes: respuesta de anticuerpos negativa (Ab-), respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T negativa (Ab+T-), y respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T positiva (Ab+T+).

*Las estimaciones fueron similares cuando el índice de comorbilidad de Charlson fue reemplazado por el número de comorbilidades (aHR 1,43 [1,04-1,98]; p=0,028). aHR, razón de riesgo ajustada; UCI, unidad de cuidados intensivos; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno; IgG-TriméricaS, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma frente a SARS-CoV-2.

Figura 2. Curva de supervivencia del efecto de la inmunidad humoral y celular sobre la mortalidad a 28 días o el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) estimada mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Fuente: Elaboración propia.



*P = 0.004 para la comparación de la curva de supervivencia acumulada [TrimericS-IgG(+) e IGRA(+)] con la curva [TrimericS-IgG(-)]. ^P = 0.175 para la comparación de la curva de supervivencia acumulada [TrimericS-IgG(+) e IGRA(-)] con la curva [TrimericS-IgG(-)]. Abreviaturas: UCI, unidad de cuidados intensivos; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma para el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave; TrimericS-IgG, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína espicular trimérica.

Tabla S-11. Predictores de mortalidad a los 28 días o ingreso en UCI en personas hospitalizadas por COVID-19 incluyendo combinaciones de respuestas inmunes.*

Características	Mortalidad global a los 28 días o ingreso en UCI		
N=181	Nmortalidad o UCI/Ncohorta	aHR (95% CI)	p
Edad, años		0.99 (0.96-1.03)	0.763
Sexo femenino		1.52 (0.63-3.70)	0.351
Índice de comorbilidad de Charlson		1.29 (1.09-1.52)	0.002
Cociente SpO2/FiO2 al ingreso		2.28 (1.49-3.49)	<0.001
Variante SARS-CoV-2, Omicron		0.40 (0.18-0.90)	0.028
Respuestas inmunes			
IgG-S Trimérica negativa & IGRA negativo	6/18 (33.3%)	reference	reference
IgG-S Trimérica negativa & IGRA positivo	0/5 (0%)	0.00 (0.00-∞)	0.997
IgG-S Trimérica positiva & IGRA negativo	14/71 (19.7%)	0.24 (0.08-0.76)	0.015
IgG-S Trimérica positiva & IGRA positivo	5/87 (5.7%)	0.10 (0.03-0.38)	<0.001

Remdesivir	0.49 (0.19-1.00)	0.137
Recuento de linfocitos periféricos	1.03 (0.98-1.07)	0.250

* Las estimaciones se obtuvieron mediante un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariable que incorpora edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), variante de SARS-CoV-2, uso de remdesivir, linfocitos totales (por incremento de 100 células/μL) y CUATRO variables que reflejan combinaciones de métricas de ambas respuestas inmunes: respuesta de anticuerpos negativa y respuesta de células T negativa (Ab-T-), respuesta de anticuerpos negativa y respuesta de células T positiva (Ab-T+), respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T negativa (Ab+T-), y respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T positiva (Ab+T+). aHR, razón de riesgo ajustada; UCI, unidad de cuidados intensivos; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción de oxígeno inspirado; IgG-S Trimérica, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína spike trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma para SARS-CoV-2.

Tabla S-12. Predictores de mortalidad a los 28, 60 y 90 días en personas hospitalizadas por COVID-19.*

Características	Mortalidad global 28 días		Mortalidad global 60 días		Mortalidad global 90 días	
	aHR (95% CI)	p	aHR (95% CI)	p	aHR (95% CI)	p
N=181						
Edad, años	1.00 (0.95-1.06)	0.978	1.03 (0.99-1.09)	0.177	1.03 (0.98-1.08)	0.228
Sexo femenino	1.73 (0.58-5.13)	0.327	1.02 (0.44-2.35)	0.960	1.12 (0.49-2.52)	0.792
Índice de comorbilidad de Charlson	1.50 (1.20-1.88)	<0.001*	1.31 (1.11-1.55)	0.001*	1.34 (1.13-1.57)	<0.001*
Cociente SpO ₂ /FiO ₂ al ingreso	3.31 (1.81-6.04)	<0.001*	2.06 (1.27-3.36)	0.004*	2.06 (1.27-3.33)	0.003*
Variante SARS-CoV-2, Omicron	0.71 (0.25-2.06)	0.533	0.79 (0.35-1.85)	0.586	0.83 (0.36-1.94)	0.669
IgG-S Trimérica positiva & IGRA negativo	0.55 (0.12-2.45)	0.435	0.79 (0.24-2.55)	0.690	0.85 (0.27-2.74)	0.789
IgG-S Trimérica positiva & IGRA positivo	0.15 (0.02-0.95)	0.044*	0.42 (0.12-1.53)	0.189	0.40 (0.11-1.45)	0.164
Remdesivir	0.59 (0.21-1.70)	0.329	0.62 (0.27-1.44)	0.269	0.56 (0.25-1.26)	0.160
Recuento de linfocitos periféricos	1.03 (0.98-1.08)	0.235	1.01 (0.97-1.06)	0.691	1.01 (0.97-1.05)	0.684

* Las estimaciones se obtuvieron mediante un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariable que incorpora edad (por año de incremento), sexo, índice de comorbilidad de Charlson (por unidad de incremento), cociente SpO₂/FiO₂ (por disminución de 100 unidades), variante de SARS-CoV-2, uso de remdesivir, recuento de linfocitos periféricos (por incremento de 100 células/mL) y las tres variables que reflejan combinaciones de métricas de ambas respuestas inmunes: respuesta de anticuerpos negativa (Ab-), respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T negativa (Ab+T-), y respuesta de anticuerpos positiva y respuesta de células T positiva (Ab+T+). aHR, razón de riesgo ajustada; UCI, unidad de cuidados intensivos; cociente SpO₂/FiO₂, cociente entre saturación de oxígeno y fracción de oxígeno inspirado; IgG-S Trimérica, niveles séricos de inmunoglobulina G contra la proteína spike trimérica; IGRA, ensayo de liberación de interferón gamma para SARS-CoV-2.





7. DISCUSIÓN



7. DISCUSIÓN

Nuestro estudio es el primero en evaluar el papel de las respuestas de las células T en la gravedad de la enfermedad en el momento agudo de la COVID-19. Además del diseño prospectivo con un seguimiento estrecho y prolongado de los participantes, el estudio tiene varias fortalezas, incluido el uso de métricas objetivas para evaluar la gravedad de la enfermedad y la utilización de plataformas serológicas validadas, que miden tanto los anticuerpos como la inmunidad de las células T contra el SARS-CoV-2, para evaluar con precisión las respuestas inmunes humorales y celulares. La confirmación de la variante del SARS-CoV-2 con métodos moleculares en el 93% de los casos es otro de los puntos fuertes de este estudio. También es importante destacar que la validación de nuestros resultados sobre el rendimiento de un IGRA estandarizado para SARS-CoV-2 en otras cohortes de pacientes vacunados y no vacunados con COVID-19 grave en el momento del ingreso hospitalario potencialmente podría permitir un manejo personalizado del paciente basado en los resultados.

La principal implicación de nuestros hallazgos sobre la inmunidad preexistente y el riesgo de mala evolución clínica en pacientes vacunados es que medir la inmunidad puede agregar valor a la evaluación clínica actual basada en la edad y las comorbilidades. Nuestros resultados sugieren que, con la aparición de nuevas variantes, la presencia de anticuerpos podría ser insuficiente para estimar el grado de protección de una persona frente a un mal pronóstico o la muerte. Para caracterizar mejor la magnitud de la inmunidad protectora y la identificación de pacientes con alto riesgo de progresión, puede ser importante medir tanto la producción de anticuerpos como las respuestas de las células T. Otros pasos para utilizar estas pruebas para estimar el grado de protección de una persona frente a una mala evolución incluyen definir umbrales en una práctica rutinaria estandarizada y evaluar su desempeño en la práctica clínica.

Utilizando un IGRA para SARS-CoV-2 específico, nuestro estudio revela una proporción sustancial de resultados negativos al ingreso entre pacientes hospitalizados por COVID-19 durante la era de la vacunación. La edad avanzada, una mayor carga de comorbilidad, una mayor gravedad de la enfermedad, un menor recuento total de linfocitos T y la ausencia de infección previa se asociaron con una mayor frecuencia de resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2. Sin embargo, el estado de vacunación no afectó la probabilidad de resultados

negativos de IGRA para SARS-CoV-2. Ni los resultados de mitógenos ni la presencia de la variante Omicron o Delta del SARS-CoV-2 afectaron al desempeño de la prueba. La respuesta negativa al IFN- γ del SARS-CoV-2 al ingreso predijo un aumento de la mortalidad.

En el estudio de pacientes vacunados hospitalizados por COVID-19 causado por las variantes Delta y Omicron, la inmunidad de células T preexistente contra el SARS-CoV-2 se asoció fuertemente con los resultados de los pacientes. Las personas que mostraban respuestas tanto de anticuerpos como de células T tenían el menor riesgo de mortalidad o ingreso en la UCI, lo que sugiere que la doble contribución de la inmunidad humoral y celular es importante para prevenir la progresión de la enfermedad. Informes anteriores habían documentado que la enfermedad grave por COVID-19 entre personas completamente vacunadas ocurría con mayor frecuencia entre aquellos con factores de riesgo de enfermedad grave, incluida la edad avanzada y afecciones de salud subyacentes, pero se desconocía la importancia de la inmunidad al SARS-CoV-2 en la protección contra malos resultados.

El IGRA para SARS-CoV-2 comercial utilizado en este estudio ha demostrado previamente simplicidad y confiabilidad en la cuantificación de la respuesta de las células T [118], ofreciendo la ventaja de una fácil implementación y aplicabilidad potencial a una gran cantidad de muestras. Nuestros hallazgos revelaron una alta frecuencia de resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19, lo que influyó significativamente en los resultados de los pacientes. Los IGRA para el SARS-CoV-2 negativos fueron frecuentes entre pacientes de mayor edad y mayor carga de comorbilidad, lo que coincide con las respuestas reducidas de las células T informadas en ambos escenarios [109, 138]. El envejecimiento se ha asociado con una disminución de la competencia inmune de las células T, tanto a nivel de la población de células T como de su funcionalidad [139]. Inesperadamente, no hubo diferencias en los resultados de IGRA para SARS-CoV-2 según el estado de vacunación, y la mitad de los pacientes vacunados mostraron resultados negativos. Los pacientes vacunados eran mayores y tenían una mayor carga de comorbilidad. Si bien ninguna comorbilidad específica se asoció con resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2, la acumulación de comorbilidades predijo una menor liberación de IFN- γ . Nuestros resultados concuerdan con las respuestas Spike-específicas de las células T CD4+, reducidas y gradualmente más bajas después de la vacunación reportadas con una mayor prevalencia de comorbilidades y

edad avanzada [140]. Por lo tanto, las estrategias de vacunación actuales pueden ser insuficientes para inducir una respuesta inmune celular protectora para evitar la COVID-19 grave en grupos específicos de pacientes, en quienes pueden ser necesarias medidas preventivas alternativas, como vacunas diseñadas para inducir inmunidad de células T [141], además de la terapia anticipada. No encontramos diferencias en la proporción de resultados IGRA para SARS-CoV-2 negativos en los 33 pacientes inmunodeprimidos incluidos en nuestra cohorte, a lo que podrían haber contribuido diferentes factores, incluido el tamaño de la muestra y la definición de inmunosupresión.

Los resultados negativos de IGRA para SARS-CoV-2 se asociaron con una mayor gravedad de la enfermedad, una mayor linfocitopenia periférica y una disminución del recuento de células T y de células T CD4+. La linfocitopenia es una característica distintiva de la enfermedad grave en pacientes con COVID-19 [142], y afecta principalmente a las células T, tanto linfocitos CD4+ como CD8+ [143, 139, 144, 145], lo que puede explicar los niveles más bajos de IFN- γ detectados [139]. La reducción de los recuentos de linfocitos periféricos y, con menos frecuencia, la disminución de los recuentos de CD4+ se han relacionado con resultados falsos negativos de IGRA para SARS-CoV-2 en pacientes con tuberculosis [146] y resultados indeterminados del ensayo QuantiFERON-TB Gold Plus en pacientes con COVID-19 [147]. Si bien no se han informado resultados falsos negativos de IGRA para SARS-CoV-2 en pacientes graves con COVID-19, se observó un cambio de una respuesta de IFN- γ negativa a positiva a medida que la infección se resolvió y el recuento de linfocitos se recuperó en un subconjunto de pacientes con muestras de seguimiento, similar a los hallazgos con la prueba QuantiFERON-TB Gold Plus [148]. Es importante destacar que estos resultados negativos iniciales predijeron resultados más deficientes. Los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 negativo también mostraron recuentos de células B más bajos, lo que refleja una respuesta generalizada de linfocitos disminuida asociada con la infección aguda. Sin embargo, el 60% de ellos tenían niveles detectables de anticuerpos S-IgG, lo que respalda el mayor impacto de la infección aguda por SARS-CoV-2 en las respuestas de las células T que de las células B. En realidad, se ha informado que los cambios en las células B y las células NK en pacientes con enfermedad grave son mucho menos pronunciados que los observados con las células T, así como una considerable variación interindividual en el número de células B a pesar de la linfopenia [111, 139, 144, 145].

Se descubrió que los resultados de IGRA para SARS-CoV-2 estaban asociados con los resultados de mortalidad de los pacientes, como hemos visto en un análisis preliminar realizado en el grupo de pacientes vacunados. Las personas con IGRA para SARS-CoV-2 negativo mostraron tasas de mortalidad más altas, independientemente de la edad, la carga de comorbilidad, la gravedad inicial y la respuesta de anticuerpos. El interferón gamma desempeña un papel fundamental en la activación temprana de los macrófagos, lo que conduce a la fagocitosis y la eliminación del SARS-CoV-2 [149]. En consecuencia, una respuesta temprana inadecuada de las células T en pacientes con infección establecida contribuye a la persistencia y progresión de la enfermedad del SARS-CoV-2 [150].

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio hasta la fecha que evalúa de manera integral la inmunidad preexistente a nivel individual en pacientes hospitalizados por COVID-19 y determina cualquier efecto potencial sobre el resultado clínico. Nuestro estudio se centró en el papel desempeñado por los anticuerpos y las respuestas de las células T y exploró si el uso de estas métricas de inmunidad protectora en pacientes con COVID-19 ingresados en el hospital proporciona información útil sobre el riesgo de resultados graves o muerte. De acuerdo con cohortes de observación a gran escala, el riesgo de hospitalización y muerte debido a Omicron fue sustancialmente menor que para Delta [151-154] y, como se esperaba, la muerte ocurrió con mayor frecuencia entre personas con factores de riesgo de enfermedad grave, específicamente edad avanzada y condiciones de salud subyacentes que incluyen diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades renales crónicas, enfatizando el impacto de múltiples comorbilidades en el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad específica del SARS-CoV-2. En nuestros análisis, el aumento de la edad no permaneció asociado, lo que sugiere que la respuesta subóptima a las vacunas relacionada con la edad y/o la disminución de la inmunidad podrían explicar la asociación observada en estudios de cohortes anteriores.

Nuestros resultados sobre el papel protector de la inmunidad de las células T contra enfermedades graves sugieren que los anticuerpos desarrollados después de la inmunización con las vacunas COVID-19 actuales basadas en la cepa ancestral del SARS-CoV-2 pueden no ser suficientes para prevenir enfermedades graves tras una infección complicada causada por nuevas variantes. Estos hallazgos están alineados con datos de laboratorio anteriores que sugieren que la generación y el mantenimiento de respuestas sólidas de células T específicas

del SARS-CoV-2 podrían desempeñar un papel importante en la eficacia a largo plazo de la vacuna contra enfermedades graves causadas por nuevas variantes, dada la limitada capacidad del virus para escapar a la respuesta de las células T por las variantes Beta, Delta y Omicron a pesar de mutaciones extensas y susceptibilidad reducida a anticuerpos neutralizantes [155,156,157]. A diferencia de los epítomos de anticuerpos neutralizantes, los epítomos de células T son abundantes y están ubicados en toda la proteína Spike [158], lo que indica que la mayoría de las respuestas de células T específicas de la proteína Spike de SARS-CoV-2 están dirigidas contra epítomos conservados y que la evasión viral de las células T puede ser limitada.

A pesar de la edad más joven y la menor carga de comorbilidad de los pacientes infectados con la variante Delta, el rendimiento de IGRA para SARS-CoV-2 fue similar al observado en los pacientes infectados con la variante Omicron y en toda la cohorte. En pacientes infectados con la variante Delta, las diferencias en las tasas de mortalidad entre los resultados IGRA positivos y negativos para SARS-CoV-2 no alcanzaron significación estadística. Sin embargo, la proporción de muertes en el grupo IGRA para el SARS-CoV-2 negativo fue dos veces mayor que la del grupo positivo, y el número de muertes fue menor en comparación con el de la variante Omicron. Si bien los resultados sobre el desempeño de IGRA para el SARS-CoV-2 no se pueden extrapolar a otras variantes, nuestros datos se alinean con el bajo impacto de las variantes del SARS-CoV-2 en las respuestas de las células T en individuos infectados o vacunados [157].

Identificamos un umbral para el efecto protector del IGRA para el SARS-CoV-2. Aunque el área bajo la curva fue subóptima, un resultado de IFN- γ superior a 150 mUI/mL mostró un alto valor predictivo negativo contra la mortalidad. Los resultados de IGRA para el SARS-CoV-2 en el momento del ingreso hospitalario brindan a los médicos información valiosa sobre el pronóstico de los pacientes y pueden ayudar a guiar las decisiones sobre el momento y la intensidad de la terapia anti-COVID o la duración de la hospitalización.

En nuestra cohorte, hubo un porcentaje relativamente bajo de personas con antecedentes de COVID-19 confirmado. Sin embargo, este porcentaje se cuadruplicó al considerar a los pacientes que mostraron una respuesta inmune indicativa de una infección previa (es decir, títulos positivos de N-IgG). Este hallazgo sugiere una alta proporción de infecciones asintomáticas entre los pacientes. La infección previa y los anticuerpos N-IgG fueron más frecuentes entre los pacientes con resultados positivos de IGRA para el SARS-CoV-2, lo que sugiere que algunos pacientes tenían inmunidad híbrida inducida por una infección y

vacunación previas. Se ha demostrado que la inmunidad híbrida confiere protección sostenida contra el ingreso hospitalario o enfermedades graves en infecciones con la variante Omicron [159], y el mecanismo que sustenta dicho efecto protector podría ser la respuesta inmune de las células T. Sorprendentemente, la mitad de los pacientes no vacunados mostraron un IGRA para el SARS-CoV-2 positivo; de ellos, un tercio tenía anticuerpos TrimericS-IgG o anticuerpos N-IgG positivos, lo que sugiere una infección previa como la razón subyacente de la inmunidad de las células T contra el SARS-CoV-2. La respuesta inmune celular temprana desarrollada contra la infección aguda por SARS-CoV-2 también podría haber estado involucrada en las respuestas positivas de las células T observadas en el resto de los pacientes no vacunados con IGRA para el SARS-CoV-2 positivo con respuesta negativa de anticuerpos. Se han observado respuestas tempranas de células T CD8+ citotóxicas dentro de los 7 días posteriores a la infección aguda y se correlacionan con una eliminación viral efectiva y resultados favorables de la enfermedad [159, 160]. La edad significativamente más joven y la menor carga de comorbilidad de los pacientes con IGRA para el SARS-CoV-2 positivos podrían haber contribuido a una mayor frecuencia de respuestas tempranas de células T a la infección aguda por SARS-CoV-2 dentro de este grupo. Finalmente, una respuesta de anticuerpos disminuida que aumenta rápidamente después de la reinfección o la reactividad cruzada con coronavirus estacionales previamente infectados [161] también podría explicar los hallazgos.

Entre los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivos, solo un tercio mostró una respuesta concomitante no específica estimulada por mitógenos IFN- γ . La respuesta alterada del tubo de control positivo (mitógeno) a la fitohemaglutinina, un activador de linfocitos no específico, se ha correlacionado con la reducción de linfocitos T en la sangre periférica de pacientes gravemente enfermos [147]. En consecuencia, observamos un número significativamente menor de linfocitos totales, T y CD4 entre los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo con resultados de mitógeno indeterminados que en aquellos con mitógeno positivo. Además, la mayoría de un subgrupo de pacientes con resultados iniciales negativos de mitógenos cambiaron a positivos después de una mediana de 50 días. Aunque la interpretación de la respuesta positiva específica de INF- γ del SARS-CoV-2 en ausencia de resultados positivos concomitantes de mitógenos no está definida, la COVID-19 se ha asociado con porcentajes sin cambios de QuantiFERON-TB positivos a pesar de una mayor frecuencia de resultados bajos/muy bajos en la respuesta de IFN-gamma al mitógeno [162]. Esto podría sugerir que la

infección por SARS-CoV-2 induciría un mayor deterioro en las respuestas de las células T no estimuladas que de las células T estimuladas por el virus. Curiosamente, los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo, con o sin respuesta a mitógenos en nuestro estudio, mostraron un perfil clínico similar en comparación con los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 negativo. En ambos casos, los IGRA para SARS-CoV-2 positivos se asociaron con una edad más joven, una menor carga de comorbilidad y una menor gravedad inicial. Además, la mortalidad también fue menor en ambos grupos en comparación con los pacientes IGRA para SARS-CoV-2 negativos. Según nuestros resultados, el rendimiento de la respuesta de las células T específicas del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 grave no se vería influenciado por la respuesta no específica de las células T no estimuladas. Sorprendentemente, a pesar de la baja frecuencia de resultados positivos de mitógenos del IGRA para SARS-CoV-2, la mayoría de los pacientes de la cohorte mostraron mitógeno QuantiFERON-TB positivo. Esta inconsistencia entre ambas pruebas de mitógenos también puede sugerir criterios excesivamente estrictos para definir la positividad de mitógenos con los ensayos de SARS-CoV-2, lo que podría contribuir a explicar la discrepancia con los resultados de las respuestas específicas de IFN- γ del SARS-CoV-2. Alternativamente, la disparidad en las respuestas podría explicarse por la sensibilidad superior de la técnica de inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) utilizada para la cuantificación de QuantiFERON-TB en comparación con el método ELISA empleado en IGRA [163].

Los pacientes con resultados de IGRA para SARS-CoV-2 intermedios/límites mostraron varias similitudes con aquellos con IGRA para SARS-CoV-2 negativo en las características demográficas y la carga de comorbilidad, así como niveles más bajos similares de anticuerpos S-IgG y N-IgG en comparación con pacientes CoV-2 IGRA para SARS-CoV-2 positivos. También mostraron resultados más pobres que fueron comparables a los de los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 negativo, incluida una mayor frecuencia de ingreso a la UCI y muerte. Curiosamente, el grupo límite de IGRA para SARS-CoV-2 tuvo una mayor frecuencia de infección previa por SARS-CoV-2 y, aunque no significativa, de vacunación, y mayores recuentos de células T y células T CD4+, pero una frecuencia intermedia de positividad de mitógenos entre pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo e IGRA para SARS-CoV-2 negativo. Estos hallazgos sugieren una respuesta alterada de las células T que involucra anomalías no solo cuantitativas sino también cualitativas en las respuestas IGRA no positivas para SARS-CoV-2. Tanto la cantidad como la calidad de las respuestas de las células T se han relacionado con la gravedad de la enfermedad

[139, 160,164,165]. El envejecimiento se ha asociado con una funcionalidad alterada de las células T, incluida una señalización atenuada del receptor de células T, una respuesta debilitada del IFN tipo I o una disminución en la capacidad de respuesta de las células T a las citocinas [139]. Este grupo límite de IGRA para SARS-CoV-2 puede estar integrado por pacientes en los que el envejecimiento y la comorbilidad se asociaron con un predominio de respuestas inmunes de células T alteradas cualitativamente sobre cuantitativamente, lo que también implicaría un peor pronóstico. Esta funcionalidad alterada de las células T podría haber inducido una producción desequilibrada de mediadores/citocinas con un perfil proinflamatorio, contribuyendo a explicar los niveles más altos de IL-6 y ferritina al ingreso en este grupo. Nuestros resultados sugieren que los resultados límite por debajo de 150 mUI/mL deben considerarse negativos.

Los niveles más altos de protección contra la enfermedad grave de COVID-19 observados en nuestro estudio en individuos con respuestas tanto de anticuerpos como de células T están en línea con informes anteriores que muestran que una respuesta inmune humoral y celular coordinada es beneficiosa para los pacientes con COVID-19 [109]. Los resultados también concuerdan con los datos obtenidos en un estudio longitudinal de las respuestas de las células B y T contra las variantes ancestrales del SARS-CoV-2, Beta, Delta y Omicron después de la inmunización con la vacuna BNT162b2. En esa investigación, los títulos reducidos de anticuerpos contra el dominio de unión al receptor de la variante, combinados con las respuestas reducidas de las células T específicas de picos, se correlacionaron con la mayor susceptibilidad de las personas vacunadas al avance del COVID-19 causado por Omicron, lo que sugiere que la protección contra variantes altamente mutadas se basó en la contribución de la inmunidad humoral y celular [166].

Para determinar la inmunidad mediada por células contra el SARS-CoV-2, utilizamos un ensayo IGRA comercial, un método simple y confiable para cuantificar la respuesta de las células T en individuos convalecientes y vacunados [137,167]. El ensayo cuantifica las respuestas de IFN- γ que pueden estar impulsadas predominantemente por células T, pero las células T de tipo innato (células T asesinas naturales, células T invariantes asociadas a las mucosas) también pueden estar produciendo IFN- γ . El IGRA presenta ventajas prácticas sobre los métodos convencionales y, aunque podría tener una sensibilidad ligeramente menor que el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de puntos (ELISpot) convencional para estudiar las células

T después de la vacunación [168, 169], puede permitir la evaluación de las respuestas inmunes de las células T a SARS-CoV-2 en la práctica clínica diaria. Curiosamente, en nuestro estudio, la proporción de pacientes con una respuesta inespecífica estimulada por mitógenos de IFN- γ fue menor que la respuesta específica de células T después de la estimulación con antígenos de la proteína Spike del SARS-CoV-2. La menor respuesta a la estimulación inespecífica durante la fase aguda de la COVID-19 no fue inesperada. La linfocitopenia es una característica notable del COVID-19 [170] y en el paciente gravemente enfermo se ha observado una reducción sustancial de los niveles de IFN- γ con deterioro de la producción de IFN- γ frente a fitohemaglutinina, un potente mitógeno de IFN- γ que se ha correlacionado con la reducción de linfocitos T en la sangre periférica [147,148]. Estudios longitudinales han demostrado que una vez que se resuelve la fase aguda de COVID-19 y se normalizan los recuentos de linfocitos periféricos, se restablece la producción eficaz de IFN- γ por parte de los linfocitos T [148].

Limitaciones

En primer lugar, la población del estudio analizada es de un solo centro médico lo que limita la generalización a la población más amplia. En segundo lugar, el tamaño limitado de la muestra no nos permitió sacar conclusiones sobre el efecto diferencial de la inmunidad preexistente en cada variante del SARS-CoV-2, en subgrupos particulares de pacientes que recibieron diferentes vacunas COVID-19 ni permitió evaluar el IGRA del SARS-CoV-2 en pacientes no vacunados por separado, ya que representaban una fracción baja de la población. En tercer lugar, no examinamos a los pacientes en diferentes momentos desde la vacunación hasta la infección para determinar el período exacto de disminución de la inmunidad y no se obtuvieron muestras secuenciales durante la estancia hospitalaria para analizar los cambios en los resultados de IGRA del SARS-CoV-2 según la progresión o regresión de la enfermedad. En cuarto lugar, las respuestas de las células T específicas del SARS-CoV-2 se han interpretado a pesar de la baja respuesta inespecífica del mitógeno IFN- γ . Finalmente, se desconoce cómo estos resultados podrían aplicarse a futuras variantes del SARS-CoV-2 o a nuevas vacunas bivalentes de refuerzo. Se necesitan más investigaciones para confirmar la confiabilidad de los resultados positivos del SARS-CoV-2 en pacientes con respuestas indeterminadas de células T mitógenas.





8. CONCLUSIONES



8. **CONCLUSIONES**

1. El resultado de IGRA para SARS-CoV-2 fue positivo en la mitad de los pacientes hospitalizados con COVID-19, observándose este mismo patrón en el subgrupo de pacientes vacunados. Un 11,3% de los pacientes presentó un resultado intermedio/límite.
2. Comparados con los pacientes IGRA para SARS-CoV-2 negativo, los pacientes con IGRA para SARS-CoV-2 positivo presentan un perfil clínico más favorable: son más jóvenes, tienen menos comorbilidades (reflejado en un menor índice de Charlson), muestran menor gravedad clínica (con puntuación OMS ≤ 4) y mejor oxigenación (mayor cociente SpO₂/FiO₂) al ingreso. Su respuesta inmune también es más robusta, con mayores niveles de anticuerpos y recuentos linfocitarios periféricos. El perfil inflamatorio de estos pacientes se caracteriza por niveles más elevados de IL-6, tendencia a menor ferritina y una correlación negativa débil entre la respuesta de IFN- γ y los marcadores proteína C reactiva y dímero D. Los pacientes con resultados de IGRA para SARS-CoV-2 intermedio/límite muestran similitudes con aquellos con IGRA para SARS-CoV-2 negativo, manteniéndose esta tendencia también en la población vacunada.
3. No existen diferencias significativas en la positividad del IGRA para SARS-CoV-2 según el estado de vacunación ni según la variante del SARS-CoV-2 Delta u Omicron.
4. El rendimiento de la respuesta de las células T específicas del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 grave no se ve influenciado por la respuesta no específica de las células T, y los pacientes con respuesta discordante muestran un perfil superponible al del conjunto de los pacientes con respuesta positiva del IGRA para SARS-CoV-2.
5. Los pacientes que murieron a los 28 días mostraron una mayor frecuencia de IGRA para SARS-CoV-2 negativo, y se observó la misma tendencia entre los pacientes ingresados en la UCI.
6. Los pacientes previamente vacunados que exhiben tanto respuesta de anticuerpos como inmunidad celular (IGRA para SARS-CoV-2 positivo) en el momento del ingreso, tienen mejor pronóstico respecto a mortalidad a los 28 días o ingreso en UCI.





9. REFERENCIAS



REFERENCIAS

1. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. 2020 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44.
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
4. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-92.
5. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4):407-12.
6. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20.
7. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-70.
8. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-24.
9. Callaway E. The coronavirus is mutating - does it matter? *Nature.* 2021;585(7824):174-7.
10. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020;383(6):590-2.
11. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
12. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3.
13. World Health Organization. Timeline: WHO's COVID-19 response [Internet]. 2020 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>
14. Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufekci Z, Fisman D, Schooley R. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *Lancet.* 2021;397(10285):1603-5.
15. Goldman E. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(8):892-3.
16. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med.* 2020;172(9):577-82.
17. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med.* 2020;27(2):taaa021.
18. Billah MA, Miah MM, Khan MN. Reproductive number of coronavirus: A systematic review and meta-analysis based on global level evidence. *PLoS One.* 2020;15(11):e0242128.
19. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2021 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
20. Callaway E. The coronavirus is mutating - does it matter? *Nature.* 2021;585(7824):174-7.
21. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2023 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://covid19.who.int/>

22. Wang H, Paulson KR, Pease SA, Watson S, Comfort H, Zheng P, et al. Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020–21. *Lancet*. 2022;399(10334):1513-36.
23. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2021;76(2):428-55.
24. Chu DK, Akl EA, Duda S, Solo K, Yaacoub S, Schünemann HJ, et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2020;395(10242):1973-87.
25. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603-15.
26. Telenti A, Arvin A, Corey L, Corti D, Diamond MS, García-Sastre A, et al. After the pandemic: perspectives on the future trajectory of COVID-19. *Nature*. 2021;596(7873):495-504.
27. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861-80.
28. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):185-9.
29. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):102-11.
30. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136-48.
31. 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;181(7):1489-501.
32. Zhang N, Bevan MJ. CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011;35(2):161-8.
33. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):275-308.
34. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):749-61.
35. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020;21(11):1336-45.
36. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(4):229-38.
37. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2019;50(5):1063-78.
38. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:429-57.
39. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160-71.
40. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845-8.
41. 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;370(6521):1227-30.
42. 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*. 2021;13(577):eabd2223.
43. 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;584(7819):115-9.
44. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect Dis*. 2020;222(2):206-13.

45. Hachim A, Kavian N, Cohen CA, Chin AW, Chu DK, Mok CK, et al. ORF8 and ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2020;21(10):1293-301.
46. 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;183(4):1024-42.
47. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-74.
48. Gao T, Hu M, Zhang X, Li H, Zhu L, Liu H, et al. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation. *medRxiv [Preprint].* 2020 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20041962>
49. Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol.* 2020;5(10):1185-91.
50. Chen X, Pan Z, Yue S, Yu F, Zhang J, Yang Y, et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1-6.
51. Bartleson JM, Radenkovic D, Covarrubias AJ, Furman D, Winer DA, Verdin E. SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system. *Nat Aging.* 2021;1(9):769-82.
52. Aydillo T, Gonzalez-Reiche AS, Aslam S, van de Guchte A, Khan Z, Obla A, et al. Shedding of viable SARS-CoV-2 after immunosuppressive therapy for cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(26):2586-8.
53. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-24.
54. Masiá M, Fernández-González M, Telenti G, Agulló V, García JA, Padilla S, et al. Durable antibody response one year after hospitalization for COVID-19: A longitudinal cohort study. *J Autoimmun.* 2021;123:102703.
55. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;591(7851):639-44.
56. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature.* 2021;595(7867):421-5.
57. Krammer F, Simon V. Serology assays to manage COVID-19. *Science.* 2020;368(6495):1060-1.
58. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.* 2020;586(7830):516-27.
59. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):229-37.
60. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021;27(7):1205-11.
61. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384(5):403-16.
62. Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N Engl J Med.* 2021;384(15):1412-23.
63. 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;181(7):1489-501.
64. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-24.
65. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021;27(7):1205-11.
66. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.* 2020;586(7830):516-27.

67. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79.
68. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-15.
69. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861-80.
70. Wouters OJ, Shadlen KC, Salcher-Konrad M, Pollard AJ, Larson HJ, Teerawattananon Y, et al. Challenges in ensuring global access to COVID-19 vaccines: production, affordability, allocation, and deployment. *Lancet.* 2021;397(10278):1023-34.
71. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):181-92.
72. Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet.* 2020;395(10240):1845-54.
73. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen TH, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020;26(7):1033-6.
74. Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The role of antibody testing for SARS-CoV-2: is there one? *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):e00797-20.
75. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 2020;92(9):1518-24.
76. Perera RA, Mok CK, Tsang OT, Lv H, Ko RL, Wu NC, et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(16):2000421.
77. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Hoffmann HH, Michailidis E, Lorenzi JC, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med.* 2020;217(11):e20201181.
78. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol.* 2020;38(9):1073-8.
79. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, et al. Interferon-gamma release assay for accurate detection of SARS-CoV-2 T cell response. *Clin Infect Dis.* 2021;73(9):e3130-2.
80. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.* 2020;369(6508):eabc8511.
81. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2021;14(5):601-21.
82. McIntosh K. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): clinical features [Internet]. UpToDate; 2021 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-clinical-features>
83. Jin JM, Bai P, He W, Wu F, Liu XF, Han DM, et al. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. *Front Public Health.* 2020;8:152.
84. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):e26.
85. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045.

86. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;(6):CD013652.
87. Masiá M, Fernández-González M, Sánchez M, Carvajal M, García JA, Gonzalo-Jiménez N, et al. Nasopharyngeal Panbio COVID-19 antigen performed at point-of-care has a high sensitivity in symptomatic and asymptomatic patients with higher risk for transmission and older age. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8(3):ofab059.
88. O'Driscoll M, Ribeiro Dos Santos G, Wang L, Cummings DAT, Azman AS, Paireau J, et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;590(7844):140-5.
89. World Health Organization. COVID-19 clinical management: living guidance [Internet]. 2021 [cited 2024 Dec 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>
90. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: a review. *Allergy*. 2021;76(2):428-55.
91. Tjendra Y, Al Mana AF, Espejo AP, Akgun Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, et al. Predicting disease severity and outcome in COVID-19 patients: a review of multiple biomarkers. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(12):1465-74.
92. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, et al. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2020;180(8):1081-9.
93. Knight SR, Ho A, Pius R, Buchan I, Carson G, Drake TM, et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. *BMJ*. 2020;370:m3339.
94. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.
95. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):749-95.
96. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*. 1994;265(5168):106-9.
97. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7(1):145-73.
98. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*. 2011;1(6):519-25.
99. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 2018;9(1):64-79.
100. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity*. 2020;52(6):910-41.
101. 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;181(7):1489-501.
102. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TB, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463-9.
103. 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;371(6529):eabf4063.
104. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, et al. Interferon-gamma release assay for accurate detection of SARS-CoV-2 T cell response. *Clin Infect Dis*. 2021;73(9):e3130-2.

105. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(2):286.e7-286.e13.
106. 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;183(1):158-68.
107. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol.* 2021;22(5):620-6.
108. Moser DR, Harty JT, May BJ. Evaluation of a commercial interferon- γ release assay for detection of cellular immune responses to SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2022;60(4):e02249-21.
109. 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;183(4):996-1012.
110. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* 2020;586(7830):594-9.
111. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med.* 2020;26(10):1623-35.
112. Wang N, Zhan Y, Zhu L, Hou Z, Liu F, Song P, et al. Retrospective multicenter cohort study shows early interferon therapy is associated with favorable clinical responses in COVID-19 patients. *Cell Host Microbe.* 2020;28(3):455-64.
113. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, et al. Interferon-gamma release assay for accurate detection of SARS-CoV-2 T cell response. *Clin Infect Dis.* 2021;73(9):e3130-2.
114. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(2):286.e7-286.e13.
115. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med.* 2021;218(5):e20202617.
116. 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;183(1):158-68.
117. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* 2020;586(7830):594-9.
118. Fernández-González M, Agulló V, Padilla S, García JA, García-Abellán J, Botella Á, et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin Infect Dis.* 2022;75(1):e338-46.
119. 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;371(6529):eabf4063.
120. Wolfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Muller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020;581(7809):465-9.
121. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol.* 2020;5(49):eabd6160.
122. Wang L. C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. *Med Mal Infect.* 2020;50(4):332-4.
123. Aziz M, Fatima R, Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol.* 2020;92(11):2283-5.
124. Velavan TP, Meyer CG. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *Int J Infect Dis.* 2020;95:304-7.
125. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(6):1324-9.

126. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;18(4):844-7.
127. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1-3.
128. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J Transl Med.* 2020;18(1):206.
129. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, et al. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med.* 2020;38(9):1722-6.
130. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811-8.
131. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* 2020;97(5):829-38.
132. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020;505:190-1.
133. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci.* 2020;63(3):364-74.
134. Wynants L, Van Calster B, Collins GS, Riley RD, Heinze G, Schuit E, et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and critical appraisal. *BMJ.* 2020;369:m1328.
135. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature.* 2021;591(7848):92-8.
136. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci.* 2020;6(5):591-605.
137. Fernández-González M, Agulló V, Padilla S, García JA, García-Abellán J, Botella Á, et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin Infect Dis.* 2022;75:e338-46.
138. Yu KK, Fischinger S, Smith MT, Atyeo C, Cizmeci D, Wolf CR, et al. Comorbid illnesses are associated with altered adaptive immune responses to SARS-CoV-2. *JCI Insight.* 2021;6:e146242.
139. Zhang H, Weyand CM, Goronzy JJ. Hallmarks of the aging T-cell system. *FEBS J.* 2021;288:7123-42.
140. Dietz LL, Juhl AK, Søgaaard OS, Reekie J, Nielsen H, Johansen IS, et al. Impact of age and comorbidities on SARS-CoV-2 vaccine-induced T cell immunity. *Commun Med.* 2023;3:58.
141. Abbasi J. COVID-19 vaccine focused on T-cell response promising in early trial. *JAMA.* 2022;327:115.
142. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130:2620-9.
143. Moga E, Lynton-Pons E, Domingo P. The robustness of cellular immunity determines the fate of SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2022;13:904686.
144. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71:762-8.
145. Liu R, Wang Y, Li J, Han H, Xia Z, Liu F, et al. Decreased T cell populations contribute to the increased severity of COVID-19. *Clin Chim Acta.* 2020;508:110-4.
146. Yamasue M, Komiya K, Usagawa Y, Umeki K, Nureki SI, Ando M, et al. Factors associated with false negative interferon- γ release assay results in patients with tuberculosis: a systematic review with meta-analysis. *Sci Rep.* 2020;10:1607.
147. Ward JD, Cornaby C, Schmitz JL. Indeterminate QuantiFERON gold plus results reveal deficient interferon gamma responses in severely ill COVID-19 patients. *J Clin Microbiol.* 2021;59:e0081121.

148. Alessio G, Imeneo A, Di Lorenzo A, Rossi B, Sorace C, Compagno M, et al. Longitudinal evaluation of the QuantiFERON-TB gold plus assay in hospitalized COVID-19 patients with a first indeterminate result. *Microbiol Spectr*. 2022;10:e0185822.
149. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:533-5.
150. Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, Hanson AL, Kotagiri P, Dunmore BJ, et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity*. 2021;54:1257-75.
151. Nyberg T, Ferguson NM, Nash SG, Webster HH, Flaxman S, Andrews N, et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. *Lancet*. 2022;399:1303-12.
152. Veneti L, Bøås H, Bråthen Kristoffersen A, Stålcrautz J, Bragstad K, Hungnes O, et al. Reduced risk of hospitalisation among reported COVID-19 cases infected with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant compared with the Delta variant, Norway, December 2021 to January 2022. *Euro Surveill*. 2022;27:2200077.
153. Bager P, Wohlfahrt J, Bhatt S, Stegger M, Legarth R, Møller CH, et al. Risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 Omicron variant versus Delta variant in Denmark: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22:967-76.
154. Sheikh A, Kerr S, Woolhouse M, McMenamin J, Robertson C. Severity of Omicron variant of concern and effectiveness of vaccine boosters against symptomatic disease in Scotland (EAVE II): a national cohort study with nested test negative design. *Lancet Infect Dis*. 2022;22:959-66.
155. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, Baguma R, Benede N, Suzuki A, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature*. 2022;603:488-92.
156. Riou C, Keeton R, Moyo-Gwete T, Hermanus T, Kgagudi P, Baguma R, et al. Escape from recognition of SARS-CoV-2 variant spike epitopes but overall preservation of T cell immunity. *Sci Transl Med*. 2022;14:eabj6824.
157. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med*. 2021;2:100355.
158. Grifoni A, Sidney J, Vita R, Peters B, Crotty S, Weiskopf D, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe*. 2021;29:1076-92.
159. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. *Lancet*. 2020;395:497-506.
160. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022;23:186-93.
161. Fujii SI, Yamasaki S, Iyoda T, Shimizu K. Association of cellular immunity with severity of COVID-19 from the perspective of antigen-specific memory T cell responses and cross-reactivity. *Inflamm Regen*. 2022;42:50.
162. Palacios-Gutiérrez JJ, Rodríguez-Guardado A, Arias-Guillén M, Alonso-Arias R, Palacios-Penedo S, García-García JM, et al. Clinical and epidemiological correlates of Low IFN-gamma responses in mitogen tube of QuantiFERON assay in tuberculosis infection screening during the COVID-19 pandemic: a population-based marker of COVID-19 mortality? *Arch Bronconeumol*. 2022;58:649-59.
163. Bisognin F, Lombardi G, Re MC, Dal Monte P. QuantiFERON-TB gold plus with chemiluminescence immunoassay: do we need a higher cutoff. *J Clin Microbiol*. 2020;58:e00780-20.
164. Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, Chia WN, Tham CYL, Lim JM, et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med*. 2021;218:e20202617.
165. Shrotri M, van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: a systematic review. *PLoS One*. 2021;16:e0245532.

166. Brasu N, Elia I, Russo V, Montacchiesi G, Stabile SA, De Intinis C, et al. Memory CD8+ T cell diversity and B cell responses correlate with protection against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination. *Nat Immunol.* 2022;23:1445-56.
167. Vogrig M, Berger AE, Bourlet T, Waeckel L, Haccourt A, Chanavat A, et al. Monitoring of both humoral and cellular immunities could early predict COVID-19 vaccine efficacy against the different SARS-CoV-2 variants. *J Clin Immunol.* 2023;43:31-45.
168. Lochmanová A, Martinek J, Tomášková H, Zelená H, Dieckmann K, Grage-Griebenow E, et al. Comparison of two commercially available interferon- γ release assays for T-cell-mediated immunity and evaluation of humoral immunity against SARS-CoV-2 in healthcare workers. *Diagnostics.* 2023;13:637.
169. Johnson SA, Phillips E, Adele S, Longet S, Malone T, Mason C, et al. Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 interferon- γ release assay following SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Clin Exp Immunol.* 2023;212:249-61.
170. Domingo P, Mur I, Pomar V, Corominas H, Casademont J, de Benito N. The four horsemen of a viral apocalypse: the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *EBioMedicine.* 2020;58:1028.







10. ARTÍCULOS



Integrating SARS-CoV-2-specific interferon- γ release assay testing in the evaluation of patients hospitalized with COVID-19

Mar Masiá,^{1,2,3} Alba de la Rica,^{1,4} Marta Fernández-González,^{1,2} José Alberto García,^{1,2} Sergio Padilla,^{1,2,3} Javier García-Abellán,^{1,2,3} Ángela Botella,¹ Paula Mascarell,¹ Félix Gutiérrez^{1,2,3}

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 14.

ABSTRACT T cell-mediated immunity is crucial for protection against severe COVID-19. The performance of SARS-CoV-2-specific IFN- γ release assays (IGRAs) to measure T cell responses during severe acute infection is unknown. We conducted a prospective, longitudinal analysis of patients hospitalized for confirmed COVID-19. A standardized SARS-CoV-2-specific quantitative IGRA was measured on admission. Follow-up lasted 90 days. Two hundred forty-eight patients were included; 181 (73%) were vaccinated, 142 (57.3%) were infected with the Omicron variant, and 106 (42.7%) were infected with the Delta variant. The SARS-CoV-2-IGRA result was positive (>200 mIU/mL) in 125 (50.5%) patients, with 44 (35.2%) showing concomitant mitogen-induced IFN- γ response. Compared with patients with negative and borderline results, those with positive SARS-CoV-2 IGRA were younger and showed lower frequency of co-existing comorbidities, lower median Charlson comorbidity index, lower frequency of World Health Organization (WHO) severity score > 4 , higher peripheral arterial oxygen saturation to inspired fraction of oxygen (SpO₂/FiO₂) ratio on admission, higher S-IgG and N-IgG antibody responses, and lower mortality at 28/60/90 days. These findings were consistent for both the Omicron and Delta variants. Similar patterns to those described above were observed in the subset of patients with positive SARS-CoV-2-IGRA and indeterminate mitogen-induced responses, as well as in those exhibiting both positive SARS-CoV-2-specific and mitogen responses. Twenty-eight (11.3%) patients had borderline (100–200 mIU/mL) SARS-CoV-2-IGRA results and shared several similarities with patients with negative SARS-CoV-2 IGRA. In an adjusted Cox model, a negative SARS-CoV-2-IGRA result was found to be an independent predictor of mortality. Using a receiver operating characteristics curve analysis, we found that an IFN- γ value of 150 mIU/mL was identified as the optimal cut-off point for predicting mortality, with 79% [95% confidence interval (CI) 61–93] sensitivity, 61% (95% CI 55–68) specificity, 18% (95% CI 15–22) positive predictive value, 96% (95% CI 93–98) negative predictive value, and an area under the curve (AUC) of 70%. The assay's performance remained consistent regardless of mitogen results or the presence of the Delta or Omicron variants.

IMPORTANCE The cellular immune response is essential in the protection against severe disease in patients with established SARS-CoV-2 infection. The novelty of this study lies in the evaluation of the overall performance of a standardized assay to measure cellular immune response, the SARS-CoV-2-specific interferon- γ release assay (IGRA), in hospitalized patients with severe COVID-19. The SARS-CoV-2 IGRA was shown to accurately classify patients based on disease severity and prognosis, and the study revealed that test performance was not affected by the SARS-CoV-2 variant or control tube results. We identified an assay cut-off point with a high negative predictive value against mortality. The SARS-CoV-2 IGRA in patients hospitalized for COVID-19 may be a useful tool to assess cellular immunity and adopt targeted therapeutic and preventive measures.

Editor Kileen L. Shier, Quest Diagnostics Nichols Institute, Chantilly, Virginia, USA

Address correspondence to Mar Masiá, marmasiac@gmail.com.

Mar Masiá and Alba de la Rica contributed equally to this article. Author order was determined on the basis of seniority.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 14.

Received 8 June 2023

Accepted 6 September 2023

Published 19 October 2023

Copyright © 2023 Masiá et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

KEYWORDS interferon-gamma release, IGRA, T cell immunity, COVID-19, SARS-CoV-2, mitogen, Omicron, outcomes, mortality, Delta, performance, accuracy

The adaptive immune response is essential for the control and clearance of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 (1). T cell responses can be detected very early after SARS-CoV-2 infection, before the emergence of antibodies (2, 3), and provide long-lasting immunity against COVID-19 (4). Infection with SARS-CoV-2 elicits the activation of CD4⁺ and CD8⁺ cytolytic T lymphocytes, both of which induce the production of interferon-gamma (IFN- γ). Additionally, CD4⁺ T cells aid in the proliferation and antibody secretion of B lymphocytes (5, 6). Thus, cellular immunity emerges as a critical axis in the immune response against SARS-CoV-2, exerting direct antiviral effects and regulating both the humoral and innate immune responses (6). Emerging data suggest a prominent role for T cells in protection against severe disease. Mild disease is characterized by an early T cell response (2, 7, 8), while insufficient or exhausted T cell responses are associated with severe COVID-19, even in vaccinated patients (9–11). Assessment of the magnitude and determinants of T cell responses in patients with acute severe COVID-19 may help adopting targeted preventive and therapeutic measures.

Measuring the SARS-CoV-2-specific T cell immunity is challenging for routine large-scale testing. The IFN- γ release assay (IGRA) is a simple and easy-to-perform test to evaluate the cellular immune response. While IGRAs are commonly used for assessing cellular immunity in mycobacterial infections (12), specific assays have emerged to evaluate T cell responses to SARS-CoV-2 by measuring IFN- γ production (13). The SARS-CoV-2 IGRA has been shown to accurately distinguish between convalescent and healthy uninfected individuals (14–16), identify subjects with symptomatic and asymptomatic infection after seroconversion (7), and estimate the immunity after vaccination in convalescent and uninfected persons (17–19). However, the performance of the SARS-CoV-2 IGRA in patients with acute infection needing hospital admission is unknown. Understanding the SARS-CoV-2 IFN- γ responses in patients with severe COVID-19 in an era when the majority of the population is vaccinated is essential for accurately interpreting test results and tailoring patient management accordingly.

We assessed the performance of SARS-CoV-2-specific IFN- γ release assay testing in patients hospitalized with COVID-19.

MATERIALS AND METHODS

A prospective study was conducted on hospitalized COVID-19 patients between July 22, 2021, and April 23, 2022. Patients were selected based on microbiologically confirmed SARS-CoV-2 infection, abnormal chest x-ray findings, and/or severity criteria, including oxygen saturation < 93% and CURB-65 $\geq$ 2.

Clinical data and blood samples were collected according to a predefined protocol approved by the COVID-19 Institutional Committee (20, 21). The protocol included the standardized collection of clinical variables, nasopharyngeal samples (NPS) for SARS-CoV-2, and serial blood samples obtained on admission and every 48 h during hospital stay for routine blood tests and biomarker measurement, including levels of interleukin-6 (IL-6), ferritin, C-reactive protein (CRP), D-dimer, and lymphocyte counts and their subsets (AQUIOS CL Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA). QuantiFERON-TB Gold Plus (Qiagen, Hilden, Germany) was performed on admission for screening for latent tuberculosis infection following the manufacturer's instructions. Serum samples for the measurement of the levels of antibodies to SARS-CoV-2 were frozen at -80°C .

Patients received antiviral and/or immunomodulatory therapy containing dexamethasone $\pm$ remdesivir $\pm$ tocilizumab $\pm$ baricitinib according to pre-specified criteria (21, 22). All patients received antithrombotic prophylaxis with enoxaparin.

The study was approved by the Institutional Ethical Committee as part of the COVID-19 Elx/Spain project with Ethical Committee reference number PI 105/2021. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

Quantitative determination of IFN- γ release by SARS-CoV-2-specific T cells

Whole blood from lithium heparin tube was used for IGRA incubation within 4 h. SARS-CoV-2 cellular response was measured on the first day of admission using a specific quantitative IFN- γ release assay according to the manufacturer's instructions (Quan-T-Cell SARS-CoV-2, Euroimmun, Germany). Details are provided elsewhere (9, 17). Briefly, lithium-heparinized blood from each patient was incubated for 21 h at 37°C in the three tubes supplied: blank tube (unstimulated) for the individual IFN- γ background and mitogen tube for non-specific IFN- γ secretion as controls and stimulation tube coated with antigens of the SARS-CoV-2 spike protein for specific IFN- γ secretion. The IFN- γ concentration released in the plasma fraction obtained after centrifugation of the three tubes was then measured by ELISA (Quant-T-Cell ELISA, Euroimmun, Germany) with an automated instrument (Dynex DS2 ELISA system). For non-specific IFN- γ release (mitogen-SARS-CoV-2 IGRA), a positive result was defined according to the manufacturer's instructions as IFN- γ (mitogen) - IFN- γ (blank) $\geq$ 400 mIU/mL. For specific T cell response (SARS-CoV-2 IGRA), results were interpreted as follows: IFN- γ (SARS-CoV-2) - IFN- γ (blank) < 100 mIU/mL was considered negative, 100-200 borderline, and >200 positive. The performance of the specific SARS-CoV-2 IFN- γ response was assessed in both patients with and without a non-specific IFN- γ response. The upper limit of quantification achieved was 2500 mIU/mL.

IgG against SARS-CoV-2 trimeric spike and internal nucleocapsid proteins

IgG levels against TrimericS-IgG on day 1 were quantified using a LIAISON SARS-CoV-2 TrimericS IgG Kit (DiaSorin, Italy) on a LIAISON XL analyzer. Criteria are as follows: $\geq$ 33.8 binding antibody units (BAU)/mL was positive (quantitative). N-IgG levels against internal N protein were measured using SARS-CoV-2 IgG assay (Abbott Laboratories, USA) on an Alinity i system. Interpretation is as follows: relative light unit (RLU)/calibrator RLU ratio < 1.40 = negative, $\geq$ 1.40 = positive.

Characterization of SARS-CoV-2 variants

Confirmed SARS-CoV-2 PCR-positive NPS (Cobas 6800 System, Roche, Switzerland) were characterized either by sequencing or by multiplex PCR according to availability of resources. Genome sequencing was performed following the ARTIC amplicon sequencing protocol for MinION version V3 as previously described (23). Some NPS were characterized by a multiplex PCR (Novaplex SARSCoV2 Variants-VII Assay, Seegene, Korea), which targeted specifically the RdRP gene and E484A HV69/70del and N501Y mutations, following the manufacturer's protocol, in a CFX96 real-time thermocycler (Bio-Rad, USA). The methodological details of the multiple PCR are described in the supplemental section (Suppl_Methods).

Statistical analyses

Mann-Whitney-Wilcoxon or Student's *t*-tests were used for group comparison in continuous variables, according to the result of Shapiro Wilk's contrast of normality. For categorical variables, comparisons were performed using the χ^2 and Fisher's exact tests of 2 categories and dichotomous variables, respectively. The correlation between the IFN- γ responses and the levels of antibodies and biomarkers was assessed with Pearson's coefficient. We used multivariable adjusted Cox proportional hazard regression models to assess the association of the SARS-CoV-2 IGRA results with mortality incorporating covariates of interest. Receiver operating characteristics curves were used to select the best cut-off for IFN- γ concentration to predict mortality. Statistical analyses were performed with R version 4.0.3 software (R Foundation for Statistical Computing).

RESULTS

Study population

During the study period, 248 patients admitted to hospital met the criteria for inclusion in the study. The SARS-CoV-2 variant was Omicron in 142 (57.3%) patients and Delta in 106 (42.7%); in 155 (62.5%), it was confirmed by genome sequencing, in 74 (29.8%) by multiplex PCR, and in 19 (7.7%) cases with high real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) cycle threshold (Ct) values (≥ 35), it was assumed based on the prevalent variant circulating in our Department of Health at the time of infection. A total of 172 (69.4%) had a positive TrimericS-IgG antibody response. Patients' characteristics on admission are shown in Table 1.

Performance of the SARS-CoV-2 IFN- γ release assay

The SARS-CoV-2 IGRA result was positive (>200 mlU/mL) in 125 (50.5%) patients. Patients with positive SARS-CoV-2 IGRA results showed a differential clinical profile (Table 1). Compared with patients with either negative or borderline results, those with positive SARS-CoV-2 IGRA were younger, showed lower frequency of co-existing comorbidities, lower median Charlson comorbidity index, lower frequency of WHO severity score > 4 , and higher peripheral arterial oxygen saturation to inspired fraction of oxygen (SpO_2/FiO_2) ratio on admission (Table S5).

The TrimericS-IgG and N-IgG positive responses were more frequent among SARS-CoV-2 IGRA-positive patients, with no differences according to SARS-CoV-2 Ct values. There was a mild correlation between the TrimericS-IgG and SARS-CoV-2 IGRA values, with a $\rho = 0.17$ ($P < 0.001$) (Fig. S1). This correlation did not achieve statistical significance in the group of patients who died ($\rho = 0.017$; $P = 0.935$). The QuantiFERON-TB was positive in 3.6% of patients, indeterminate in 5.9% of patients (of them, 0.4% had a positive SARS-CoV-2 IGRA mitogen result and 2.2% had a positive value for the specific SARS-CoV-2-IGRA), and the QuantiFERON-TB mitogen test was positive in 94.1% of patients tested, with no differences according to SARS-CoV-2 IGRA results. Patient outcomes differed by SARS-CoV-2 IGRA status, with lower mortality at 28, 60 and 90 days after hospital admission among SARS-CoV-2 IGRA-positive patients and a trend to lower admission to the intensive care unit (ICU) ($P = 0.083$) (Table 1).

Table 2 shows the results of the SARS-CoV-2 IGRA according to lymphocyte counts and biomarker levels. Positive SARS-CoV-2 IGRA was associated with a higher number of total peripheral lymphocyte, B cell, T cell, and CD4+ T cell counts and a trend to a lower number of natural killer (NK) cells. Less than one-third of patients with T cells of less than $200/\mu\text{L}$ showed positive SARS-CoV-2 IGRA results, and 91.4% of them showed a negative result for the SARS-CoV-2 IGRA mitogen. Of the biomarkers measured, the positive SARS-CoV-2 IGRA was associated with higher IL-6 levels and a trend to lower ferritin levels on admission. There was a mild, negative correlation of the IFN- γ response with C-reactive protein and D-dimer ($\rho = -0.11$, $P < 0.05$ in both cases; Fig. S1).

Performance of the SARS-CoV-2 IGRA according to patients' demographic and clinical data is shown in Table S1. Results were consistent with those described above. There were no differences in the SARS-CoV-2 IGRA results by SARS-CoV-2 variant. Patients who died at all time points showed higher frequency of negative SARS-CoV-2 IGRA, and the same trend was observed among patients admitted to the ICU.

A total of 181 (73%) patients were vaccinated. There were no significant differences in the positivity of SARS-CoV-2 IGRA according to vaccination status or days since the last vaccine dose. Vaccinated patients were older, had a higher Charlson comorbidity index and higher burden of comorbidities, and showed a trend to higher frequency of positive mitogen (Table S2).

In the analysis by SARS-CoV-2 variant, patients infected with Delta variants were significantly younger and showed lower comorbidity burden, lower frequency of vaccination, and higher number of days since symptom initiation (Table S3). When positive and negative SARS-CoV-2 IGRA results were compared in patients with Omicron

TABLE 1 Characteristics of persons admitted to the hospital with COVID-19 according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission^a

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA (<100 mIU/mL)	Positive SARS-CoV-2 IGRA (>200 mIU/mL)	Borderline SARS-CoV-2 IGRA (100–200 mIU/mL)	All	P value
No, %	95 (38.3)	125 (50.4)	28 (11.3)	248	
Sex, male	54 (56.8)	64 (51.2)	16 (57.1)	134 (54.0)	0.672
Age, y	77 (58–85)	62 (49–79)	76 (63–83)	70 (52–83)	0.001
White, non-Hispanic	87 (91.6)	109 (87.2)	25 (89.3)	221 (89.1)	0.613
Charlson comorbidity index	4 (2–7)	3 (1–6)	4 (3–7)	4 (1–6)	0.078
Number of comorbidities ^a	2 (0–4)	1 (0–3)	2.5 (1–3)	2 (0–4)	0.056
Diabetes	27 (28.4)	27 (21.6)	6 (21.4)	60 (24.2)	0.506
Congestive heart failure	8 (8.4)	14 (11.2)	5 (17.9)	27 (10.9)	0.821
Coronary artery disease	15 (15.8)	12 (9.6)	3 (10.7)	30 (12.1)	0.411
Prior stroke	6 (6.3)	12 (9.6)	2 (7.1)	20 (8.1)	0.673
Peripheral arterial disease	5 (5.3)	9 (7.2)	1 (3.6)	15 (6.0)	0.803
Pulmonary disease	21 (22.1)	25 (20.0)	7 (25.0)	53 (21.4)	0.775
Chronic kidney disease	20 (21.1)	16 (12.8)	6 (21.4)	42 (16.9)	0.201
Malignant neoplasm	12 (12.6)	17 (13.6)	4 (14.3)	33 (13.3)	0.965
Immunosuppressive condition ^b	9 (9.5)	18 (14.4)	6 (21.4)	33 (13.3)	0.214
Prior COVID-19 infection	1 (1.1)	5 (4.0)	3 (10.7)	9 (3.6)	0.046
Vaccination status					
Unvaccinated	28 (29.5)	33 (26.4)	6 (21.4)	67 (27.0)	0.706
Vaccinated ^c	67 (70.5)	92 (73.6)	22 (78.6)	181 (73.0)	
Days since last vaccine dose	119 (68–186)	95 (59–175)	110 (81–175)	100 (67–178)	0.252
Clinical presentation					
Days from symptom onset to admission	5 (3–7)	6 (3–8)	5 (2–7)	5 (3–7)	0.632
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission	343 (283–354)	354 (343–462)	346 (294–417)	350 (309–457)	0.001
WHO severity score	4 (3.1–4.1)	4 (3.0–4.0)	4 (3.9–4.0)	4 (3.1–4.1)	0.386
WHO severity score > 4	12 (12.6)	4 (3.2)	2 (7.1)	18 (7.3)	0.022
X-Ray bilateral lung infiltrates	44 (46.3)	62 (49.6)	12 (42.9)	118 (47.6)	0.568
Microbiological data					
SARS-CoV-2 variant, Omicron	58 (61.1)	69 (55.2)	15 (53.6)	142 (57.3)	0.611
Lowest cycle threshold PCR	22 (17–26)	23 (19–28)	23 (19–29)	22 (18–29)	0.202
TrimericS-IgG, BAU/mL	143 (5–2535)	1090 (81–3650)	261 (6–2218)	581 (10–3278)	0.053
TrimericS-IgG, positive	56 (58.9)	99 (79.2)	17 (60.7)	172 (69.4)	0.003
TrimericS-IgG > 264 BAU/mL	45 (47.4)	82 (65.6)	14 (50.0)	141 (56.9)	0.019
N-IgG, positive	8 (8.4)	23 (18.4)	3 (10.7)	34 (13.7)	0.095
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	10 (0.5–43)	635 (337–1752)	163 (139–173)	206 (26–636)	<0.001
SARS-CoV-2 IGRA, positive	0 (0)	125 (100)	0 (0)	125 (50.4)	<0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA ^d	12 (12.6)	44 (35.2)	6 (21.4)	62 (25.0)	<0.001
positive					
Mitogen-QuantiferonTB, positive (≥0.50 IU/mL)	77/84 (91.7)	105/110 (95.5)	25/26 (96.2)	207/220 (94.1)	0.692
QuantiferonTB, positive	3 (3.5)	4 (3.6)	1 (3.7)	8 (3.6)	1.000
Antivirals/immunomodulators					
Remdesivir	79 (83.2)	98 (78.4)	24 (85.7)	201 (81.0)	0.573
Monoclonal antibodies	4 (4.2)	2 (1.6)	0 (0)	6 (2.4)	0.399
Tocilizumab or baricitinib	59 (62.1)	85 (68.0)	19 (67.9)	163 (65.7)	0.656
Outcomes					
Hospital stay, days	5 (3.5–9)	5 (3–7)	7 (4–8)	5 (3–8)	0.171
ICU admission	7 (7.4)	3 (2.4)	2 (7.1)	12 (4.8)	0.147
28-d mortality	15 (15.8)	5 (4.0)	4 (14.3)	24 (9.7)	0.006
60-d mortality	19 (20.0)	10 (8.0)	5 (17.9)	34 (13.7)	0.025

(Continued on next page)

TABLE 1 Characteristics of persons admitted to the hospital with COVID-19 according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission^a (Continued)

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA (<100 mIU/mL)	Positive SARS-CoV-2 IGRA (>200 mIU/mL)	Borderline SARS-CoV-2 IGRA (100–200 mIU/mL)	All	P value
90-d mortality	21 (22.1)	10 (8.0)	5 (17.9)	36 (14.5)	0.009

^aThis category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.

^bThis category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

^cOf 181 vaccinated patients, 103 (57%) were fully vaccinated and 78 (43%) had received a booster dose.

^dA positive result was defined according to the manufacturer as follows: IFN- γ (mitogen) - IFN- γ (blank) $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, binding antibody units; ICU, intensive care unit.

^eContinuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage).

and Delta variants separately, the patterns were similar to those observed in the entire cohort (Table 3). Among patients infected with the Delta variant, individuals with a negative SARS-CoV-2 IGRA result showed a 28-day mortality rate that was twice as high as those with a positive result (13.5% vs. 5.4%), but the disparity was not statistically significant.

TABLE 2 Lymphocyte counts and biomarker levels on admission^a

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA (<100 mIU/mL)	Positive SARS-CoV-2 IGRA (>200 mIU/mL)	Borderline SARS-CoV-2 IGRA (100–200 mIU/mL)	All	P value
Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	606 (419-951)	795 (498-1,070)	763 (544-957)	694 (461-1,013)	0.048
Peripheral lymphocyte count, categories, cells/ μ L					
<100	1 (1.1)	1 (0.8)	0 (0.0)	2 (0.8)	
100-199	2 (2.1)	4 (3.3)	0 (0.0)	6 (2.5)	
200-500	35 (37.2)	27 (22.0)	5 (19.2)	67 (27.6)	0.161
>500	56 (59.6)	91 (74.0)	21 (80.8)	168 (69.1)	
T cell count, cells/ μ L	367 (224-566)	468 (314-739)	503 (406-598)	435 (281-660)	0.013
T cell count, category, cells/ μ L					
<100	3 (3.2)	2 (1.6)	0 (0.0)	5 (2.1)	
100-199	19 (20.2)	9 (7.3)	2 (7.7)	30 (12.3)	
200-500	40 (42.6)	54 (43.9)	11 (42.3)	105 (43.2)	0.081
>500	32 (34.0)	58 (47.2)	13 (50.0)	103 (42.4)	
CD4+ T cell count, cells/ μ L	193 (110-327)	277 (153-414)	342 (272-373)	240 (146-376)	0.003
CD4+ T cell count, category, cells/ μ L					
<100	19 (20.2)	16 (13.0)	2 (7.7)	37 (15.2)	
100-199	29 (30.9)	30 (24.4)	2 (7.7)	61 (25.1)	
200-500	34 (36.2)	54 (43.9)	20 (76.9)	108 (44.4)	0.012
>500	12 (12.8)	23 (18.7)	2 (7.7)	37 (15.2)	
CD4+/CD8 lymphocyte ratio	1.4 (0.9-2.3)	1.6 (1.0-2.4)	2.0 (1.3-2.8)	1.6 (1.0-2.4)	0.102
B cell count, cells/ μ L	54 (23-89)	65 (38-126)	58 (36-103)	60 (28-113)	0.033
NK lymphocytes/ μ L	23 (14-34)	19 (12-29)	21 (14-30)	20 (13-31)	0.076
Interleukin-6, pg/mL	29 (6-131)	41 (16-134)	80 (42-280)	42 (12-139)	0.026
C-Reactive protein, mg/L	49 (23-103)	53 (24-88)	47 (29-104)	50 (24-97)	0.930
D-Dimer, μ g/mL	0.8 (0.4-2.3)	0.7 (0.4-1.1)	0.7 (0.5-1)	0.7 (0.4-1.4)	0.316
Ferritin, ng/mL	248 (104-519)	199 (100-441)	431 (167-609)	231 (108-503)	0.075

^aContinuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage).

TABLE 3 Characteristics of persons admitted to the hospital with the Omicron or Delta variant, according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission^d

Characteristics	Delta			Omicron		
	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	P Value	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	P Value
n (%)	50 (47.2)	56 (52.8)		73 (51.4)	69 (48.6)	
Sex, male	37 (74.0)	24 (42.9)	0.002	33 (45.2)	40 (58.0)	0.135
Age, y	67 (55-80)	56 (49-72)	0.006	81 (60-86)	73 (51-83)	0.014
Charlson comorbidity index	3 (1-7)	2 (1-3)	0.036	5 (3-7)	5 (1-7)	0.622
Number of comorbidities ^a	1 (0-4)	0.5 (0-2)	0.011	2 (1-4)	2 (0-4)	0.714
Diabetes	16 (32.0)	8 (14.3)	0.037	17 (23.3)	19 (27.5)	0.570
Congestive heart failure	3 (6.0)	4 (7.1)	1.000	10 (13.7)	10 (14.5)	1.000
Coronary artery disease	6 (12.0)	3 (5.4)	0.301	12 (16.4)	9 (13.0)	0.640
Prior stroke	3 (6.0)	2 (3.6)	0.665	5 (6.8)	10 (14.5)	0.176
Peripheral arterial disease	3 (6.0)	1 (1.8)	0.341	3 (4.1)	8 (11.6)	0.122
Pulmonary disease	7 (14.0)	9 (16.1)	0.793	21 (28.8)	16 (23.2)	0.567
Chronic kidney disease	10 (20.0)	4 (7.1)	0.082	16 (21.9)	12 (17.4)	0.533
Malignant neoplasm	5 (10.0)	5 (8.9)	1.000	11 (15.1)	12 (17.4)	0.821
Immunosuppressive condition ^b	3 (6.0)	5 (8.9)	0.720	2 (1-4)	(0-4)	0.714
Prior COVID-19 infection	3 (6.0)	0	3 (6.0)	1 (1.4)	5 (7.2)	0.109
Vaccination status						
Days since last vaccine dose	129 (80-180)	128 (62-180)	0.697	104 (73-188)	84 (56-157)	0.084
Unvaccinated	12 (24.0)	16 (28.6)	0.662	22 (30.1)	17 (24.6)	0.573
Fully vaccinated	38 (76.0)	40 (71.4)		51 (69.9)	52 (75.4)	
Clinical presentation						
Days from symptom onset admission	6 (5-7)	6 (4-7)	0.923	4 (2-7)	4 (2-8)	0.363
SpO2/FiO2 ratio at admission	346 (301-450)	350 (327-462)	0.119	343 (274-408)	354 (343-462)	0.003
WHO severity score > 4	8 (16.0)	2 (3.6)	0.044	6 (8.2)	2 (2.9)	0.276
X-Ray bilateral lung infiltrates	25 (50.0)	33 (58.9)	0.110	31 (42.5)	29 (42.0)	0.926
Microbiological data						
Lowest cycle threshold PCR	23 (18-30)	25 (21-29)	0.565	20 (17-27)	21 (18-28)	0.159
TrimericS-IgG, BAU/mL	196 (10-5495)	515 (85-4140)	0.521	143 (5-1800)	1470 (57-2920)	0.006
TrimericS-IgG, positive	32 (64.0)	46 (82.1)	0.047	41 (56.2)	53 (76.8)	0.013
TrimericS-IgG > 264 BAU/mL	24 (48.0)	34 (60.7)	0.242	35 (47.9)	48 (69.6)	0.011
N-IgG, positive	6 (12.0)	11 (19.6)	0.305	5 (6.8)	12 (17.4)	0.070
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	45 (12-113)	863 (343-1838)	<0.001	11 (0.5-63)	575 (337-1400)	<0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, ^c positive	3 (6.0)	20 (35.7)	<0.001	15 (20.5)	24 (34.8)	0.063
Laboratory values						
Interleukin-6, pg/mL	60 (12-147)	42 (24-116)	0.985	30 (6-140)	36 (11-143)	0.668
C-Reactive protein, mg/L	64 (29-99)	60 (32-98)	0.927	39 (19-104)	40 (21-75)	0.628
D-Dimer, µg/mL	0.7 (0.5-1.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.169	0.9 (0.4-2.2)	0.8 (0.5-1.4)	0.547
Ferritin, ng/mL	418 (229-598)	293 (154-535)	0.262	173 (91-529)	164 (80-321)	0.263
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	644 (424-940)	823 (519-1212)	0.056	633 (457-962)	708 (492-978)	0.470
B cell count, cells/µL	57 (29-109)	64 (36-110)	0.679	49 (19-85)	69 (40-133)	0.005
T cell count, cells/µL	370 (254-567)	562 (329-830)	0.024	440 (261-574)	425 (314-709)	0.444
CD4+ T cell count, cells/µL	206 (99-357)	326 (157-473)	0.003	231 (149-369)	214 (151-371)	0.861
CD4+/CD8 lymphocyte ratio	1.1 (0.7-2.2)	1.6 (1.0-2.4)	0.143	1.9 (1.1-2.4)	1.8 (1.2-2.3)	0.788
Antivirals/immunomodulators						
Remdesivir	43 (86.0)	43 (76.8)	0.320	60 (82.2)	55 (79.7)	0.831
Monoclonal antibodies	0	1 (1.8)	1.000	4 (5.5)	1 (1.4)	0.230
Tocilizumab or baricitinib	40 (80.0)	44 (78.6)	1.0	38 (52.1)	41 (59.4)	0.402

(Continued on next page)

TABLE 3 Characteristics of persons admitted to the hospital with the Omicron or Delta variant, according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission^d (Continued)

Characteristics	Delta			Omicron		
	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	P Value	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	P Value
Outcomes						
Hospital stay	5 (3-7)	4 (3-7)	0.594	6 (4-10)	5 (3-7)	0.115
28-d mortality	5 (13.5)	3 (5.4)	0.370	13 (17.8)	2 (2.9)	0.005
60-d mortality	6 (16.2)	4 (7.1)	0.358	17 (23.3)	6 (8.7)	0.023
90-d mortality	6 (16.2)	4 (7.1)	0.358	19 (26.0)	6 (8.7)	0.008

^aThis category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.

^bThis category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

^cA positive result was defined according to the manufacturer as follows: IFN- γ (mitogen) - IFN- γ (blank) $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, binding antibody units; ICU, intensive care unit.

^dContinuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage).

Borderline SARS-CoV-2 IFN- γ release assay results

A total of 28 (11.3%) patients showed borderline (100-200 mIU/mL) SARS-CoV-2 IGRA results. They shared several similarities with SARS-CoV-2 IGRA-negative patients in demographic characteristics, comorbidity burden, and TrimericS-IgG and N-IgG antibody responses, although they exhibited higher T cell and CD4+ T cell counts, higher ferritin and IL-6 levels, with the latter showing the highest numerical values observed among the groups, and higher frequency of prior COVID-19 (Table 1). The frequency rates of ICU admission and mortality at 28, 60, and 90 days were also similar to those of SARS-CoV-2 IGRA-negative patients.

Mitogen (non-specific) IFN- γ responses

Of 125 SARS-CoV-2 IGRA-positive patients, 44 (35.2%) had concomitant positive mitogen-induced IFN- γ response. These patients showed a lower WHO severity score, higher initial SpO₂/FiO₂, higher frequency of vaccination, and higher number of total, T, and CD4+ T lymphocytes than those with only SARS-CoV-2-specific IFN- γ responses (Table 4). The characteristics of the 81 (64.8%) SARS-CoV-2 IGRA-positive patients with indeterminate mitogen-induced response were compared with those of patients with negative SARS-CoV-2 IGRA. They exhibited numerous similarities to the overall group of SARS-CoV-2 IGRA-positive patients in terms of demographics, comorbidities, severity criteria upon admission, and TrimericS-IgG and N-IgG antibody responses. They also showed lower mortality at all time points (Table 4). Comparison of patients with positive SARS-CoV-2 IGRA and either specific or non-specific IFN- γ responses, with patients with negative SARS-CoV-2 IGRA, showed similar results (Table 4). A second sample for SARS-CoV2 IGRA was obtained from 53 patients during follow-up [median Q1-Q3, 54 (48-57) days]. Of 41 (77.3%) patients with indeterminate initial mitogen response, 36 (87.8%) switched to positive response, and of 23 with initial negative specific response, 13 (57%) changed to positive response.

Accuracy of the SARS-CoV-2 IFN- γ release assay to predict patient outcomes

A total of 24 (9.7%) patients died within 28 days after hospital admission. Patients' characteristics according to disease outcomes are shown in Table S4. Mortality was associated with older age, higher comorbidity burden, higher disease severity, lower frequency of therapy with remdesivir, and higher levels of all biomarkers. In a Cox model adjusted for age, comorbidity burden, WHO severity score, positive TrimericS-IgG, lymphocyte counts, and remdesivir therapy, the negative SARS-CoV-2 IGRA was an independent predictor of mortality. Additionally, the comorbidity burden and a WHO severity score > 4 were also identified as independent predictors of mortality (Table 5). The sensitivity rate of a negative SARS-CoV-2 IGRA result to predict mortality was 63%

TABLE 4 Characteristics of persons hospitalized with COVID-19 with SARS-CoV-2 IGRA-positive and concomitant positive mitogen-SARS-CoV-2 IGRA[†]

Characteristic	S-IGRA (+) & [†] H-IGRA (+)	S-IGRA (+) & M-IGRA (-)	P ^a	S-IGRA (-)	P ^b	P ^c
n (%)	44 (31.7)	81 (46.0)		95 (68.3)		
Sex, male	20 (45.5)	44 (54.3)	0.356	54 (56.8)	0.273	0.763
Age	62 (48-79)	62 (50-79)	0.924	77 (58-85)	0.011	0.001
Charlson comorbidity index	2 (1-6)	2 (1-6)	0.697	4 (2-7)	0.243	0.032
Number of comorbidities ^d	1 (0-4)	1 (0-3)	0.910	2 (0-4)	0.186	0.111
Diabetes	11 (25.0)	16 (19.8)	0.503	27 (28.4)	0.838	0.219
Congestive heart failure	5 (11.4)	9 (11.1)	1.000	8 (8.4)	0.549	0.614
Coronary artery disease	5 (11.4)	7 (8.6)	0.752	15 (15.8)	0.608	0.176
Prior stroke	6 (13.6)	6 (7.4)	0.342	6 (6.3)	0.195	0.775
Peripheral arterial disease	2 (4.5)	7 (8.6)	0.491	5 (5.3)	1.000	0.389
Pulmonary disease	7 (15.9)	18 (22.2)	0.498	21 (22.1)	0.498	1.000
Chronic kidney disease	4 (9.1)	12 (14.8)	0.416	20 (21.1)	0.096	0.330
Malignant neoplasm	5 (11.4)	12 (14.8)	0.786	12 (12.6)	1.000	0.826
Immunosuppressive condition ^e	6 (13.6)	12 (14.8)	0.550	9 (9.5)	0.558	0.352
Prior COVID-19 infection	1 (2.3)	4 (4.9)	0.656	1 (1.1)	0.534	0.182
Vaccination status						
Days since last vaccine dose	83 (54-157)	99 (64-179)	0.317	119 (68-186)	0.149	0.496
Unvaccinated	6 (13.6)	27 (33.3)	0.047	28 (29.5)	0.056	0.626
Clinical presentation						
Days from symptom onset admission	5 (2-7)	6 (3-8)	0.195	5 (3-7)	0.545	0.174
SpO ₂ /FIO ₂ ratio at admission	452 (350-467)	350 (323-457)	0.005	343 (275-413)	<0.001	0.036
WHO severity score > 4	1 (2.3)	3 (3.7)	0.038	12 (12.6)	0.001	0.323
X-Ray bilateral lung infiltrates	16 (36.4)	46 (56.8)	0.220	44 (46.3)	0.374	0.115
Microbiological data						
SARS-CoV-2 variant, Omicron	24 (54.5)	45 (55.6)	1.000	58 (61.1)	0.578	0.540
Lowest cycle threshold PCR	23 (18-26)	24 (19-30)	0.198	22 (17-26)	0.262	0.100
TrimericS-IgG, BAU/mL	1420 (334-4723)	608 (19-2800)	0.087	143 (4.8-2535)	0.008	0.152
TrimericS-IgG, positive	39 (88.6)	60 (74.1)	0.067	56 (58.9)	<0.001	0.039
TrimericS-IgG > 264 BAU/mL	33 (75.0)	49 (60.5)	0.007	45 (47.4)	0.003	0.096
N-IgG, positive	4 (9.1)	19 (23.5)	0.055	8 (8.4)	1.000	0.007
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	1269 (551-2500)	521 (310-1334)	<0.001	10 (0.5-43)	<0.001	<0.001
Laboratory values						
Interleukin-6, pg/mL	45 (16-177)	37 (16-106)	0.330	29 (6-131)	0.125	0.290
C-Reactive protein, mg/L	48 (22-74)	54 (26-97)	0.220	49 (23-103)	0.292	0.828
D-Dimer, µg/mL	0.5 (0.3-1.0)	0.8 (0.5-1.2)	0.012	0.8 (0.4-2.3)	0.014	0.660
Ferritin, ng/mL	175 (97-244)	279 (117-545)	0.009	248 (104-519)	0.023	0.598
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	835 (655-1508)	712 (420-980)	0.008	606 (419-951)	<0.001	0.414
B cell count, cells/µL	77 (41-147)	64 (37-120)	0.296	54 (23-89)	0.010	0.052

(Continued on next page)

TABLE 4 Characteristics of persons hospitalized with COVID-19 with SARS-CoV-2 IGRA-positive and concomitant positive mitogen-SARS-CoV-2 IGRA[†] (Continued)

Characteristic	S-IGRA (+) & M-IGRA (+)	S-IGRA (+) & M-IGRA (-)	P ^a	S-IGRA (-)	P ^b	P ^c
T cell count, cells/ μ L	636 (429-1058)	405 (270-591)	0.001	367 (224-566)	<0.001	0.269
CD4+ T cell count, cells/ μ L	371 (192-624)	211 (145-359)	0.001	193 (110-327)	<0.001	0.206
CD4+/CD8 lymphocyte ratio	2.0 (1.3-2.5)	1.5 (1.0-2.2)	0.100	1.4 (0.9-2.3)	0.051	0.519
Antiviral/immunomodulator						
Remdesivir	35 (79.5)	63 (77.8)	0.664	79 (83.2)	0.639	0.444
Monoclonal antibodies	43 (97.7)	1 (1.2)	0.578	91 (95.8)	1.000	0.376
Tocilizumab or baricitinib	15 (34.1)	25 (30.9)	0.630	36 (37.9)	0.709	0.345
Outcomes						
28-d mortality	1 (2.3)	4 (4.9)	0.656	15 (15.8)	0.021	0.027
60-d mortality	4 (9.1)	6 (7.4)	0.740	19 (20.0)	0.142	0.018
90-d mortality	4 (9.1)	6 (7.4)	0.740	21 (22.1)	0.095	0.011

^aP for the comparison of positive mitogen and negative mitogen results among SARS-CoV-2 IGRA-(+) patients.^bP for the comparison of IGRA(+) & mitogen(+) patients with IGRA(-) patients.^cP for the comparison of IGRA(+) & mitogen(-) patients with IGRA(-) patients.[†]This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.[‡]This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.[§]A positive result was defined according to the manufacturer as follows: IFN- γ (mitogen) - IFN- γ (blank) $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, interferon gamma release assay; S-IGRA, SARS-CoV-2 IGRA; M-IGRA, non-specific (mitogen) IGRA response; SpO₂/FIO₂ ratio, oxygen saturation-fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, binding antibody units; ICU, intensive care unit.[¶]Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage).

TABLE 5 Adjusted Cox model of predictors of 28-day mortality in persons admitted to the hospital with COVID-19^a

Variable	Unadjusted HR (95% CI)	Unadjusted P	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted P
Age >64 y	9.51 (2.24-40.43)	P = 0.002	1.99 (0.43-9.29)	0.381
Charlson comorbidity index	1.32 (1.18-1.48)	P < 0.001	1.42 (1.18-1.69)	<0.001
WHO severity score > 4	4.02 (1.50-10.78)	P = 0.006	3.34 (1.14-9.74)	0.028
Positive SARS-CoV-2 IGRA	0.24 (0.09-0.65)	P = 0.005	0.24 (0.08-0.75)	0.009
Borderline SARS-CoV-2 IGRA	0.88 (0.29-2.65)	P = 0.817	1.04 (0.33-3.28)	0.946
Positive Trimeric-IgG	4.02 (1.50-10.78)	P = 0.006	0.47 (0.18-1.22)	0.122
Peripheral lymphocyte count (log 10), cells/ μ L	0.45 (0.18-1.14)	P = 0.093	0.92 (0.35-2.38)	0.857
Remdesivir	0.36 (0.16-0.83)	P = 0.016	0.41 (0.17-0.97)	0.053

^aHR, hazard ratio; CI, confidence interval.

[95% confidence interval (CI) 57-69], specificity 54% (95% CI 48-60), positive predictive value (PPV) 16% (95% CI 11-21), and negative predictive value (NPV) 96% (95% CI 93-98). Using a receiver operating characteristics (ROC) curve, an IFN- γ cut-off value of 150 mIU/mL had a 79% (95% CI 61-93) sensitivity, 61% (95% CI 55-68) specificity, 18% (95% CI 15-22) PPV, 96% (95% CI 93-98) NPV, and area under the curve (AUC) of 70% to predict mortality (Fig. S2).

DISCUSSION

Using a specific standardized SARS-CoV-2 IGRA, our study reveals a substantial proportion of negative results upon admission among patients hospitalized for COVID-19 during the vaccination era. Older age, greater comorbidity burden, increased disease severity, lower total and T lymphocyte counts, and absence of prior infection were associated with a higher frequency of negative SARS-CoV-2 IGRA results. However, vaccination status did not impact the likelihood of negative IGRA outcomes. Neither the mitogen results nor the presence of SARS-CoV-2 Omicron or Delta variant affected the performance of the test. Initial negative SARS-CoV-2 IFN- γ response was predictive of increased mortality.

To assess the role of T cells to provide protection and limit disease severity in SARS-CoV-2 infection, the magnitude and timing of the immune response should be analyzed in individuals with acute disease. The novelty of this study lies in the evaluation of the overall performance of a standardized SARS-CoV-2 IGRA in a non-selected cohort of vaccinated and unvaccinated patients with severe COVID-19 upon hospital admission, potentially enabling tailored patient management based on the results. The commercial SARS-CoV-2 IGRA utilized in this study has previously demonstrated simplicity and reliability in quantifying T cell response (17), offering the advantage of easy implementation and potential applicability to a large number of samples. Our findings revealed a high frequency of negative SARS-CoV-2 IGRA results in hospitalized COVID-19 patients, which significantly influenced patient outcomes. Negative SARS-CoV-2 IGRA was frequent among patients with older age and higher comorbidity burden, consistent with the reduced T cell responses reported in both scenarios (24, 25). Aging has been associated with waning T cell immune competence, at the level of both the T cell population and its functionality (23). Unexpectedly, there were no differences in the SARS-CoV-2 IGRA results by vaccination status, with half of the vaccinated patients showing negative results. Vaccinated patients were older and had a higher burden of comorbidity. While no specific comorbidity was associated with negative SARS-CoV-2 IGRA results, the accumulation of comorbidities predicted lower IFN- γ release. Our results are in agreement with the reduced and gradually lower CD4⁺ spike-specific T cell responses after vaccination reported with higher prevalence of comorbidities and older age (26). Current vaccination strategies may therefore be insufficient to induce a protective cellular immune response to avoid severe COVID-19 in specific groups of patients, in whom alternative preventive measures such as vaccines designed to induce T cell immunity (27) in addition to anticipated therapy may be considered. We did not find differences in the proportion of negative IGRA results in the 33 immunosuppressed

patients included in our cohort, to which different factors including the sample size and the definition of immunosuppression might have accounted for.

Negative SARS-CoV-2 IGRA results were associated with increased disease severity, higher peripheral lymphocytopenia, and decreased T cell and CD4⁺ T cell counts. Lymphocytopenia is a hallmark of severe disease in patients with COVID-19 (28), primarily involving T cells, both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes (6, 23, 29, 30), which may account for the lower IFN- γ levels detected (23, 30). Reduced peripheral lymphocyte counts and, less frequently, decreased CD4⁺ counts have been linked to false-negative IGRA results in patients with tuberculosis (31) and indeterminate *QuantiFERON-TB Gold Plus* assay results in COVID-19 patients (32). While false-negative SARS-CoV-2 IGRA results have not been reported in severe COVID-19 patients, a shift from negative to positive IFN- γ response was observed as the infection resolved and lymphocyte count recovered in a subset of patients with follow-up samples, similar to findings with the *QuantiFERON-TB Gold Plus* test (33). Importantly, these initial negative results were predictive of poorer outcomes. Patients with negative SARS-CoV-2 IGRA also showed lower B cell counts, reflecting a generalized blunted lymphocyte response associated with acute infection. However, 60% of them had detectable S-IgG antibody levels, which supports the greater impact of acute SARS-CoV-2 infection on T cell than B cell responses. Actually, changes in B cells and NK cells in patients with severe disease have been reported to be much less pronounced than those observed with T cells, as well as considerable inter-individual variation in B cell numbers despite lymphopenia (23, 29, 30, 34).

SARS-CoV-2 IGRA results were found to be associated with patient outcomes, as we have seen in a preliminary analysis conducted in the vaccinated patient group (9). SARS-CoV-2 IGRA-negative persons exhibited higher mortality rates, irrespective of age, comorbidity burden, initial severity, and the antibody response. Interferon- γ plays a critical role in early macrophage activation, leading to the phagocytosis and clearance of SARS-CoV-2 (35). Accordingly, an inadequate early T cell response in patients with established infection contributes to SARS-CoV-2 persistence and disease progression (8). We identified a threshold for the protective effect of the SARS-CoV-2 IGRA. Although the area under the curve was suboptimal, an IFN- γ result above 150 mIU/mL showed a high negative predictive value against mortality. The SARS-CoV-2 IGRA results at hospital admission provide clinicians with valuable information regarding patients' prognosis and may assist in guiding decisions about the timing and intensity of anti-COVID therapy or duration of hospitalization.

Despite the younger age and lower comorbidity burden of patients infected with the Delta variant, the performance of SARS-CoV-2 IGRA was similar to that observed in patients infected with the Omicron variant and the entire cohort. In patients infected with the Delta variant, the differences in mortality rates between positive and negative SARS-CoV-2 IGRA results did not reach statistical significance. However, the proportion of deaths in the SARS-CoV-2 IGRA-negative group was twice as high as that in the positive group, and the number of deaths was lower compared with that of the Omicron variant. While results regarding the performance of SARS-CoV-2 IGRA cannot be extrapolated to other variants, our data align with the low impact of SARS-CoV-2 variants on T cell responses in infected or vaccinated individuals (36).

In our cohort, there was a relatively low percentage of individuals with a history of confirmed COVID-19. However, this percentage increased fourfold when considering patients who displayed an immune response indicative of prior infection (i.e., positive N-IgG titers). This finding suggests a high proportion of asymptomatic infections among the patients. Previous infection and N-IgG antibodies were more frequent among patients with positive SARS-CoV-2 IGRA results, which suggests that some patients had hybrid immunity induced from previous infection and vaccination. Hybrid immunity has been shown to confer sustained protection against hospital admission or severe disease in infections with the Omicron variant (37), and the mechanism underpinning such protective effect could be the T cell immune response. Remarkably, half of non-vaccinated patients showed a positive SARS-CoV-2 IGRA; of them, one-third had positive

TrimericS-IgG antibodies or N-IgG antibodies, which suggests previous infection as the subjacent reason for T cell immunity against SARS-CoV-2. Early cellular immune response developed against acute SARS-CoV-2 infection might have also been involved in the positive T cell responses observed in the rest of the unvaccinated SARS-CoV-2 IGRA-positive patients with negative antibody response. Early cytotoxic CD8⁺ T cell responses have been observed within 7 days after acute infection and correlated with effective viral clearance and favorable disease outcomes (1, 38). The significantly younger age and lower comorbidity burden of the SARS-CoV-2 IGRA-positive patients might have contributed to a higher frequency of early T cell responses to acute SARS-CoV-2 infection within this group. Finally, a waned antibody response that quickly boosts after reinfection or cross-reactivity with previously infected seasonal coronaviruses (39) could also explain the findings.

Among the SARS-CoV-2 IGRA-positive patients, only one-third showed concomitant non-specific IFN- γ mitogen-stimulated response. The impaired response of the positive control tube (mitogen) to phytohemagglutinin, a non-specific lymphocyte activator, has been correlated with T lymphocyte reduction in the peripheral blood of severely ill patients (32). Accordingly, we observed a significantly lower number of total, T, and CD4 lymphocytes among SARS-CoV-2 IGRA-positive patients with indeterminate mitogen results than in those with positive mitogen. Moreover, the majority of a subgroup of patients with initial negative mitogen results switched to positive after a median of 50 days. Although the interpretation of the positive specific SARS-CoV-2 INF- γ response in the absence of concomitant positive mitogen results is undefined, COVID-19 has been associated with unchanged percentages of positive QuantiFERON-TB despite an increased frequency of low/very low IFN-gamma responses to mitogen (40). This might suggest that SARS-CoV-2 infection would induce a greater impairment in the responses of unstimulated T cells than of viral-stimulated T cells. Interestingly, positive SARS-CoV-2 IGRA patients either with or without mitogen response in our study showed a similar clinical profile when compared with IGRA-negative patients. In both cases, the positive IGRA was associated with younger age, lower comorbidity burden, and lower initial severity. Moreover, mortality was also lower in both groups compared with IGRA-negative patients. According to our results, the performance of the specific SARS-CoV-2 T cell response in patients with severe COVID-19 would not be influenced by the non-specific response of the unstimulated T cells. Remarkably, despite the low frequency of positive mitogen results of the SARS-CoV-2 IGRA, the majority of patients in the cohort showed positive QuantiFERON-TB mitogen. This inconsistency between both mitogen tests may also suggest excessively stringent criteria to define mitogen positivity with the SARS-CoV-2 assays, which could contribute to explain the discrepancy with the results of the specific SARS-CoV-2 IFN- γ responses. Alternatively, the disparity in responses might be explained by the superior sensitivity of the chemiluminescence immunoassay (CLIA) technique used for the quantification of QuantiFERON-TB in comparison to the ELISA method employed in SARS-CoV-2 IGRA (41).

Patients with intermediate/borderline SARS-CoV-2 IGRA results showed several similarities with those with negative SARS-CoV-2 IGRA in demographic characteristics and comorbidity burden, as well as similar lower levels of S-IgG and N-IgG antibodies compared with SARS-CoV-2 IGRA-positive patients. They also exhibited poorer outcomes that were comparable to those of patients with negative SARS-CoV-2 IGRA, including higher frequency of ICU admission and death. Interestingly, the borderline SARS-CoV-2 IGRA group had higher frequency of previous SARS-CoV-2 infection and, although non-significant, of vaccination, and higher T cell and CD4⁺ T cell counts, but an intermediate frequency of mitogen positivity between SARS-CoV-2 IGRA-positive and SARS-CoV-2 IGRA-negative patients. These findings suggest an impaired T cell response involving not only quantitative but also qualitative abnormalities in the non-positive SARS-CoV-2 IGRA responses. Both the quantity and quality of T cell responses have been linked with disease severity (1, 7, 23, 42). Aging has been associated with altered T cell functionality, including blunted T cell receptor signaling, weakened type I IFN response,

or a decline in T cell responsiveness to cytokines (23). This borderline IGRA group may be integrated by patients in whom aging and comorbidity were associated with a predominance of qualitatively over quantitatively impaired T cell immune responses, which would also involve a worse prognosis. This impaired T cell functionality might have induced an imbalanced production of mediators/cytokines with a pro-inflammatory profile, contributing to explain the higher levels of IL-6 and ferritin on admission in this group. Our results suggest that borderline results under 150 mIU/mL should be considered as negative.

The sample size of the study did not allow the evaluation of the SARS-CoV-2 IGRA in unvaccinated patients separately, since they represented a low fraction of the population, and this may be a limitation of the study. We only characterized the test in patients with Omicron and Delta variants, and the performance may not be generalizable to other SARS-CoV-2 variants. Sequential samples were not obtained during hospital stay to analyze changes in the SARS-CoV-2 IGRA results according to disease progression or regression. Further research is needed to confirm the reliability of the SARS-CoV-2-positive results in patients with indeterminate mitogen T cell responses. Strengths are the real-life cohort included in the study, the great number of patients with diverse clinical characteristics and representative of the overall population requiring hospital admission, and the evaluation of the test with different thresholds and types of T cell responses and in more than one confirmed genetic variant.

In conclusion, a specific SARS-CoV-2 IGRA performed during the acute phase of COVID-19 in hospitalized patients revealed a significant proportion of negative results, even among vaccinated individuals. The assay did properly classify patients according to disease severity and prognosis, and testing performance was not influenced by the mitogen results or the Omicron vs. Delta variant. An IFN- γ cut-off > 150 mIU/mL showed a high negative predictive value against mortality. The SARS-CoV-2 IGRA in patients hospitalized for COVID-19 may be a useful tool to assess T cell immunity and adopt targeted therapeutic and preventive measures.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

²CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain

⁴Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

AUTHOR ORCIDS

Mar Masía  <http://orcid.org/0000-0001-9878-2458>

Alba de la Rica  <http://orcid.org/0000-0001-5289-9271>

Marta Fernández-González  <http://orcid.org/0000-0001-9949-8504>

José Alberto García  <http://orcid.org/0000-0002-1203-7260>

Sergio Padilla  <http://orcid.org/0000-0002-8420-7310>

Javier García-Abellán  <http://orcid.org/0000-0002-5217-3726>

Ángela Botella  <http://orcid.org/0000-0002-1599-0030>

Paula Mascarell  <http://orcid.org/0000-0002-0566-0935>

Félix Gutiérrez  <http://orcid.org/0000-0002-9485-6867>

FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	CB21/13/00011	Félix Gutiérrez
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	COV20/00005	Félix Gutiérrez
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	CM21/00186	Alba de la Rica

Funder	Grant(s)	Author(s)
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	CM22/00026	Ángela Botella
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	CM20/00066	Javier García-Abellán
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	PI22/01949	Mar Masiá
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	PI16/01740	Mar Masiá
MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	PI18/01861	Félix Gutiérrez
GVA Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública (Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana)	AICO/2021/205	Mar Masiá

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mar Masiá, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Validation, Writing - review and editing | Alba de la Rica, Data curation, Investigation, Writing - original draft | Marta Fernández-González, Data curation, Methodology, Validation, Writing - original draft, Writing - review and editing | José Alberto García, Data curation, Formal analysis | Sergio Padilla, Conceptualization, Investigation, Methodology | Javier García-Abellán, Investigation, Methodology | Ángela Botella, Conceptualization, Investigation, Resources | Paula Mascarell, Conceptualization, Data curation, Methodology | Félix Gutiérrez, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Writing - review and editing

ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

Supplemental Material

Supplemental material (Spectrum02419-23-s0001.docx). Tables S1 to S5, Fig. S1 to S3, and supplemental methods.

REFERENCES

- Moss P. 2022. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 23:186-193. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>
- Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, Zhuang Y, Tham CYL, Chia A, Smith GJD, Young B, Kalimuddin S, Low JGH, Lye D, Wang LF, Bertoletti A. 2021. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep* 34:108728. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108728>
- Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, Cuzzi G, Navarra A, Gualano G, Mosti S, Pierelli L, Nicastri E, Goletti D. 2021. Spike is the most recognized antigen in the whole blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis* 106:338-347. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.04.034>
- Wrapp KM, Lee WS, Koutsakos M, Tan HX, Amarasekera T, Reynaldi A, Gare G, Konstantopoulos P, Field KR, Esterbauer R, Kent HE, Davenport MP, Wheatley AK, Kent SJ, Juno JA. 2022. Establishment and recall of SARS-CoV-2 spike epitope-specific CD4⁺ T cell memory. *Nat Immunol* 23:768-780. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01175-5>
- Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, Rawlings SA, Sutherland A, Premkumar L, Jadi RS, Marrama D, de Silva AM, Frazier A, Carlin AF, Greenbaum JA, Peters B, Krammer F, Smith DM, Crotty S, Sette A. 2020. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 181:1489-1501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
- Moga E, Lynton-Pons E, Domingo P. 2022. The robustness of cellular immunity determines the fate of SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol* 13:904686. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.904686>
- Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, Chia WN, Tham CYL, Lim JM, Kunasegaran K, Tan LWL, Dutertre CA, Shankar N, Lim JME, Sun LJ, Zahari M, Tun ZM, Kumar V, Lim BL, Lim SH, Chia A, Tan YJ, Tambyah PA, Kalimuddin S, Lye D, Low JGH, Wang LF, Wan WY, Hsu LY, Bertoletti A, Tam CC. 2021. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med* 218:e20202617. <https://doi.org/10.1084/jem.20202617>
- Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, Hanson AL, Kotagiri P, Dunmore BJ, Ruffieux H, De Sa A, Huhn O, Morgan MD, Gerber PP, Wills MR, Baker S, Calero-Nieto FJ, Doffinger R, Dougan G, Elmer A, Goodfellow IG, Gupta RK, Hosmillo M, Hunter K, Kingston N, Lehner PJ, Matheson NJ, Nicholson JK, Petrunkina AM, Richardson S, Saunders C, Thaventhiran JED, Toonen EJM, Weekes MP, Göttgens B, Toshner M, Hess C, Bradley JR, Lyons PA, Smith KGC, Cambridge Institute of Therapeutic Immunology and Infectious Disease-National Institute of Health Research (CITI-ID-NIHR) COVID BioResource Collaboration. 2021. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8⁺ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity* 54:1257-1275. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.010>
- Fernández-González M, Agulló V, García JA, Padilla S, García-Abellán J, de la Rica A, Mascarell P, Masiá M, Gutiérrez F. 2023. T-cell immunity against SARS-CoV-2 measured by an interferon- γ release assay is strongly associated with patient outcomes in vaccinated persons hospitalized with Delta or Omicron variants. *J Infect Dis* 7:jiad260. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad260>
- Luo M, Liu J, Jiang W, Yue S, Liu H, Wei S. 2020. IL-6 combined with CD8⁺ T cell count early predict in-hospital mortality for patients with

- COVID-19. JCI Insight 5:e139024. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139024>
11. Hermens JM, Kesmir C. 2023. Role of T cells in severe COVID-19 disease, protection, and long term immunity. Immunogenetics 75:295-307. <https://doi.org/10.1007/s00251-023-01294-9>
 12. Lalvani A. 2007. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. Chest 131:1898-1906. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2471>
 13. Renaudineau Y, Abravanel F, Izopet J, Bost C, Treiner E, Congy N, Blancher A. 2022. Novel T cell interferon gamma release assay (IGRA) using spike recombinant protein for COVID19 vaccine response and Nucleocapsid for SARS-CoV2 response. Clin Immunol 237:108979. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.108979>
 14. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, Parsonnet J, Andrews JR, Weiskopf D, Sette A, Pinsky BA, Singh U, Banaei N. 2021. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. Clin Infect Dis 73:e3130-e3132. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
 15. Ham JY, Lee NY, Hwang N, Song KE. 2023. Diagnostic performance of interferon gamma release assay (IGRA) for cell-mediated immune responses to SARS-CoV-2. Clin. Lab 69:3. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2022.220643>
 16. Fonseca Brito L, Tödter S, Kottlau J, Cermann K, Spier A, Petersen E, Schäfer I, Twerenbold R, Aepfelbacher M, Lütgehetmann M, Stahl FR. 2023. Performance of an interferon - γ release assay-based test for cell-mediated immunity to SARS-CoV-2. Front Immunol 14:1069968. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1069968>
 17. Fernández-González M, Agulló V, Padilla S, García JA, García-Abellán J, Botella Á, Mascarell P, Ruiz-García M, Masiá M, Gutiérrez F. 2022. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. Clin Infect Dis 75:e338-e346. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1021>
 18. Tormo N, Navalpotro D, Martínez-Serrano M, Moreno M, Grosson F, Tur I, Guna MR, Soriano P, Tornero A, Gimeno C. 2022. Commercial interferon-gamma release assay to assess the immune response to first and second doses of mRNA vaccine in previously COVID-19 infected versus uninfected individuals. Diagn Microbiol Infect Dis 102:115573. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115573>
 19. Barreiro P, Sanz JC, San Román J, Pérez-Abeledo M, Carretero M, Megias G, Viñuela-Prieto JM, Ramos B, Canora J, Martínez-Peromingo FJ, Barba R, Zapatero A, Candel FJ. 2022. A pilot study for the evaluation of an interferon gamma release assay (IGRA) to measure T-cell immune responses after SARS-CoV-2 infection or vaccination in a unique clustered cohort. J Clin Microbiol 60:e0219921. <https://doi.org/10.1128/jcm.02199-21>
 20. Guillén L, Padilla S, Fernández M, Agulló V, García JA, Telenti G, García-Abellán J, Botella Á, Gutiérrez F, Masiá M. 2020. Preemptive interleukin-6 blockade in patients with COVID-19. Sci Rep 10:16826. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74001-3>
 21. Padilla S, Polotskaya K, Fernández M, Gonzalo-Jiménez N, de la Rica A, García JA, García-Abellán J, Mascarell P, Gutiérrez F, Masiá M. 2022. Survival benefit of remdesivir in hospitalized COVID-19 patients with high SARS-CoV-2 viral loads and low-grade systemic inflammation. J Antimicrob Chemother 77:2257-2264. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac144>
 22. Masiá M, Fernández-González M, García JA, Padilla S, García-Abellán J, Botella Á, Mascarell P, Agulló V, Gutiérrez F. 2022. Robust long-term immunity to SARS-CoV-2 in patients recovered from severe COVID-19 after interleukin-6 blockade. EBioMedicine 82:104153. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104153>
 23. Zhang H, Weyand CM, Goronzy JJ. 2021. Hallmarks of the aging T-cell system. 2021. FEBS J 288:7123-7142. <https://doi.org/10.1111/febs.15770>
 24. Rydznski M, Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, Belanger S, Abbott RK, Kim C, Choi J, Kato Y, Crotty EG, Kim C, Rawlings SA, Mateus J, Tse LPV, Frazier A, Baric R, Peters B, Greenbaum J, Ollmann Saphire E, Smith DM, Sette A, Crotty S. 2020. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. Cell 183:996-1012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
 25. Yu KK, Fischinger S, Smith MT, Atyeo C, Cizmeci D, Wolf CR, Layton ED, Logue JK, Aguilar MS, Shuey K, Loos C, Yu J, Franko N, Choi RY, Wald A, Barouch DH, Koelle DM, Lauffenburger D, Chu HY, Alter G, Seshadri C. 2021. Comorbid illnesses are associated with altered adaptive immune responses to SARS-CoV-2. JCI Insight 6:e146242. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146242>
 26. Dietz LL, Juhl AK, Søgaard OS, Reekie J, Nielsen H, Johansen IS, Benfield T, Wiese L, Stærke NB, Jensen TØ, Jakobsen SF, Olesen R, Iversen K, Fogh K, Bodilsen J, Petersen KT, Larsen L, Madsen LW, Lindvig SO, Holden IK, Raben D, Andersen SD, Hvidt AK, Andreassen SR, Baerends EAM, Lundgren J, Østergaard L, Tolstrup M, the ENFORCE Study Group, Sponsor, Lundgren J, Principal Investigator, Østergaard LJ, Study personnel, Benfield T, Krohn-Dehli L, Petersen DK, Fogh K, Højmark E, Iversen K, Klastrop V, Larsen F, Stærke NB, Schieber S, Søndergaard A, Tøusgaard M, Yehdego Y, Bodilsen J, Nielsen H, Petersen KT, Ruwald M, Thisted RK, Caspersen SF, Iversen M, Knudsen LS, Meyerhoff JL, Sander LG, Wiese L, Abildgaard C, Holden IK, Johansen IS, Larsen L, Lindvig SO, Madsen LW, Øvrehus A, Scientific Steering Committee, Kruse NA, Lomholdt H, Krause TG, Valentiner-Branth P, Søborg B, Fischer TK, Erikstrup C, Ostrowski SR, Tolstrup M, Søgaard OS, Raben D, Operational Group, Benfield T, Jylling E, Hougaard D, Coordinating Centre, Andersen SD, Lykkegaard K, ENFORCE Lab, Andreassen SR, Baerends E, Dietz LL, Hvidt AK, Juhl AK, Olesen R, Data and Statistical Centre, Andersen KK, Bannister W, Bjørnved C, Esmann FV, Gravholdt E, Jensen CM, Jakobsen SF, Jakobsen ML, Jensen TØ, Kristensen D, Matthews C, Normand N, Olsson C, Reekie J, Traytel A. 2023. Impact of age and comorbidities on SARS-CoV-2 vaccine-induced T cell immunity. Commun Med 3:58. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00277-x>
 27. Abbasi J. 2022. COVID-19 vaccine focused on T-cell response promising in early trial. JAMA 327:115. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.24118>
 28. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, Wang T, Zhang X, Chen H, Yu H, Zhang X, Zhang M, Wu S, Song J, Chen T, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q. 2020. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. J Clin Invest 130:2620-2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
 29. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. 2020. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. Clin Infect Dis 71:762-768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
 30. Liu R, Wang Y, Li J, Han H, Xia Z, Liu F, Wu K, Yang L, Liu X, Zhu C. 2020. Decreased T cell populations contribute to the increased severity of COVID-19. Clin Chim Acta 508:110-114. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2020.05.019>
 31. Yamasue M, Komiya K, Usagawa Y, Umeki K, Nureki SI, Ando M, Hiramatsu K, Nagai H, Kadota JI. 2020. Factors associated with false negative interferon- γ release assay results in patients with tuberculosis: a systematic review with meta-analysis. Sci Rep 10:1607. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58459-9>
 32. Ward JD, Cornaby C, Schmitz JL. 2021. Indeterminate QuantiFERON gold plus results reveal deficient interferon gamma responses in severely ill COVID-19 patients. J Clin Microbiol 59:e0081121. <https://doi.org/10.1128/JCM.00811-21>
 33. Alessio G, Imeneo A, Di Lorenzo A, Rossi B, Sorace C, Compagno M, Coppola L, Campogiani L, Crea MA, Malagnino V, Buccisano F, Andreoni M, Sarmati L, Iannetta M. 2022. Longitudinal evaluation of the QuantiFERON-TB gold plus assay in hospitalized COVID-19 patients with a first indeterminate result: resolution of inflammation and restoration of T-lymphocyte counts and interferon-gamma production. Microbiol Spectr 10:e0185822. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01858-22>
 34. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, Muñoz-Ruiz M, McKenzie DR, Hayday TS, Francos-Quijorna I, Kamdar S, Joseph M, Davies D, Davis R, Jennings A, Zlatareva I, Vantourout P, Wu Y, Sofra V, Cano F, Greco M, Theodoridis E, Freedman JD, Gee S, Chan JNE, Ryan S, Bugallo-Blanco E, Peterson P, Kisand K, Haljasmägi L, Chadli L, Moingeon P, Martinez L, Merrick B, Bisnauthsing K, Brooks K, Ibrahim MAA, Mason J, Lopez Gomez F, Babalola K, Abdul-Jawad S, Cason J, Mant C, Seow J, Graham C, Doores KJ, Di Rosa F, Edgeworth J, Shankar-Hari M, Hayday AC. 2020. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. Nat Med 26:1623-1635. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01186-5>
 35. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, Xu Y, Tian Z. 2020. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients.

- Cell Mol Immunol 17:533-535. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
36. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, Goodwin B, Rubiro P, Sutherland A, Wang E, Frazier A, Ramirez SI, Rawlings SA, Smith DM, da Silva Antunes R, Peters B, Scheuermann RH, Weiskopf D, Crotty S, Grifoni A, Sette A. 2021. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med* 2:100355. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100355>
 37. Bobrovitz N, Ware H, Ma X, Li Z, Hosseini R, Cao C, Selemón A, Whelan M, Premji Z, Issa H, Cheng B, Abu Raddad LJ, Buckeridge DL, Van Kerkhove MD, Piechotta V, Higdon MM, Wilder-Smith A, Bergeri I, Feikin DR, Arora RK, Patel MK, Subissi L. 2023. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet Infect Dis* 23:556-567. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00801-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00801-5)
 38. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. *Lancet* 395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
 39. Fujii SI, Yamasaki S, Iyoda T, Shimizu K. 2022. Association of cellular immunity with severity of COVID-19 from the perspective of antigen-specific memory T cell responses and cross-reactivity. *Inflamm Regen* 42:50. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00239-1>
 40. Palacios-Gutiérrez JJ, Rodríguez-Guardado A, Arias-Guillén M, Alonso-Arias R, Palacios-Penedo S, García-García JM, Balbín M, Pérez-Hernández D, Sandoval-Torrientes M, Torreblanca-Gil A, Melón S, Asensi-Álvarez V, Clain JM, Escalante P. 2022. Clinical and epidemiological correlates of Low IFN-gamma responses in mitogen tube of QuantiFERON assay in tuberculosis infection screening during the COVID-19 pandemic: a population-based marker of COVID-19 mortality? *Archivos de Bronconeumología* 58:649-659. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2022.01.011>
 41. Bisognin F, Lombardi G, Re MC, Dal Monte P. 2020. QuantiFERON-TB gold plus with chemiluminescence immunoassay: do we need a higher cutoff? *J Clin Microbiol* 58:e00780-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00780-20>
 42. Shrotri M, van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, Rigby S, Williams SV, Bermingham WH, Kellam P, Maher J, Shields AM, Amirthalingam G, Peacock SJ, Ismail SA. 2021. T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: a systematic review. *PLoS One* 16:e0245532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245532>



Supplementary Material

Assessing the performance of SARS-CoV-2 specific interferon- γ release assay testing in patients hospitalized with COVID-19

Table of contents

Supplemental Table S-12

Supplemental Table S-25

Supplemental Table S-36

Supplemental Table S-47

Supplemental Table S-59

Supplemental Figure S1 10

Supplemental Figure S2 11

Supplemental Figure S3 11

Supplemental Methods12

Table S1. SARS-CoV-2 interferon- γ release assay results according to patients' characteristics at hospital admission with COVID-19.

Characteristic	All N (%)	Median (Q1- Q3) SARS-CoV-2 IGRA value (mIU/mL)	P	N (%) Positive SARS-CoV-2 IGRA (>200 mIU/mL)	P	N (%) Positive Mitogen- IGRA	P
N	248	206 (26-636)		125 (50.4)		62 (25.0)	
Sex, Male	134 (54.0)	185 (24-585)	0.674	64 (47.8)	0.376	27 (20.1)	0.077
Female	114 (46.0)	249 (30-714)		61 (53.5)		35 (30.7)	
Age, ≤ 65 y	114 (46.0)	303 (56-1348)	<0.001	69 (60.5)	0.004	31 (27.2)	0.467
>65 y	134 (54.0)	145 (13-430)		56 (41.8)		31 (23.1)	
Race, White non Hispanic	221 (89.1)	185 (19- 638)	0.350	109 (49.3)	0.416	56 (25.3)	0.818
other	27 (10.9)	246 (77-578)		16 (59.3)		6 (22.2)	
Charlson comorbidity index, <4	119 (48.0)	269 (55-1167)	0.004	68 (57.1)	0.043	29 (24.4)	0.884
≥ 4	129 (52.0)	163 (10-463)		57 (44.2)		33 (25.6)	
No. of comorbidities*, ≤ 2	156 (62.9)	254 (44-775)	0.043	86 (55.1)	0.066	37 (23.7)	0.548
>2	92 (37.1)	154 (10-542)		39 (42.4)		25 (27.2)	
Diabetes, Yes	60 (24.2)	163 (14-542)	0.172	27 (45.0)	0.375	17 (28.3)	0.497
No	188 (75.8)	233 (32-741)		98 (52.1)		45 (23.9)	
Congestive heart failure, Yes	27 (10.9)	221 (44-844)	0.625	14 (51.9)	1.000	7 (25.9)	1.000
No	221 (89.1)	203 (27-627)		111 (50.2)		55 (24.9)	
Coronary artery disease, Yes	30 (12.1)	98 (6-573)	0.136	12 (40.0)	0.247	6 (20.0)	0.654
No	218 (87.9)	239 (40-637)		113 (51.8)		56 (25.7)	
Prior stroke, Yes	20 (8.1)	309 (54-761)	0.483	12 (60.0)	0.485	7 (35.0)	0.288
No	228 (91.9)	198 (22-629)		113 (49.6)		55 (24.1)	
Peripheral arterial disease, Yes	15 (6.0)	275 (59-519)	0.731	9 (60.0)	0.596	3 (20.0)	0.768
No	233 (94.0)	198 (22-638)		116 (49.8)		59 (25.3)	
Pulmonary disease, Yes	53 (21.4)	184 (4-528)	0.258	25 (47.2)	0.644	12 (22.6)	0.723
No	195 (78.6)	212 (41-704)		100 (51.3)		50 (25.6)	
Chronic kidney disease, Yes	42 (16.9)	148 (12-274)	0.023	16 (38.1)	0.092	10 (23.8)	1.000
No	206 (83.1)	247 (34-842)		109 (52.9)		52 (25.2)	
Malignant neoplasm, Yes	33 (13.3)	212 (30-467)	0.795	17 (51.5)	1.000	7 (21.2)	0.671
No	215 (86.7)	203 (25-651)		108 (50.2)		55 (25.6)	

Immunosuppressive condition [‡] , Yes	33 (13.3)	272 (42-588)	0.569	18 (54.5)	0.709	8 (24.2)	1.000
No	215 (86.7)	198 (25-637)		107 (49.8)		54 (25.1)	
Prior COVID-19 infection, Yes	9 (3.6)	209(156-339)	0.782	5 (55.6)	1.000	1 (11.1)	0.457
No	239 (96.4)	203(21-671)		120 (50.2)		61 (25.5)	
Vaccination status, Vaccinated	181 (73.0)	221 (33-635)	0.649	92 (50.8)	0.887	51 (28.2)	0.069
Unvaccinated	67 (27.0)	183 (15-644)		33 (49.3)		11 (16.4)	
Clinical presentation							
Days from symptom onset to admission, ≥6	134 (54.7)	191 (18-585)	0.353	65 (48.5)	0.522	41 (30.6)	0.040
<6	111 (45.3)	246 (45-722)		59 (53.2)		21 (18.9)	
SpO2/FiO2 ratio at admission, ≤350	138 (55.6)	159 (14-490)	0.002	57 (41.3)	0.001	24 (17.4)	0.003
>350	110 (44.4)	303 (56-1141)		68 (61.8)		38 (34.5)	
WHO severity score, ≤4	143 (57.7)	237 (25-775)	0.458	73 (51.0)	0.898	44 (30.8)	0.017
>4	105 (42.3)	182 (27-528)		52 (49.5)		18 (17.1)	
X-Ray bilateral lung infiltrates, Yes	18 (47.6)	232 (40-720)	0.441	62 (52.5)	0.528	21 (17.8)	0.013
No	130 (52.4)	184 (18-611)		63 (48.5)		41 (31.5)	
Microbiological data							
SARS-CoV-2 variant, Omicron	142 (57.3)	191 (11-561)	0.095	69 (48.6)	0.524	39 (27.5)	0.374
Delta	106 (42.7)	253 (47-916)		56 (52.8)		23 (21.7)	
Lowest cycle threshold PCR, ≤20	84 (33.9)	153 (10-407)	0.037	43 (40.2)	0.007	21 (19.6)	0.104
>20	164 (66.1)	256 (45-713)		82 (58.2)		41 (29.1)	
TrimericS-IgG, Positive	172 (69.4)	277 (46-871)	<0.001	99 (57.6)	0.001	50 (29.1)	0.027
Yes	76 (30.6)	85 (4-273)		26 (34.2)		12 (15.8)	
No							
TrimericS-IgG >264 BAU/mL, Yes	141 (56.9)	293 (49-1087)	0.001	82 (58.2)	0.001	41 (29.1)	0.104
No	107 (43.1)	145 (6-343)		43 (40.2)		21 (19.6)	
N-IgG Positive, Yes	34 (13.7)	488 (131-1347)	0.005	23 (67.6)	0.041	5 (14.7)	0.199
No	214 (86.3)	182 (18-572)		102 (47.7)		57 (26.6)	
Mitogen-TB-Quantiferon, <0.5	13 (5.9)	92 (4-704)	0.327	5 (38.5)	0.569	1 (7.7)	0.197
≥0.50	207 (94.1)	209 (38-637)		105 (50.7)		52 (25.1)	
Laboratory values							
Interleukin-6, pg/mL (-Inf,15]	68 (27.4)	115 (14-431)	0.057	29 (42.6)	0.155	12 (17.6)	0.138
(15, Inf]	180 (72.6)	243 (45-856)		96 (53.4)		50 (28.1)	
C-reactive protein, mg/L, ≤20	51 (20.6)	135 (10-925)	0.677	25 (49.0)	0.876	14 (27.5)	0.717
>20	197 (79.4)	209 (42-627)		100 (50.8)		48 (24.4)	

D-dimer, $\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,7$	118 (48.0)	239 (45-1047)	0.150	62 (52.5)	0.527	34 (28.8)	0.241
>0,7	128 (52.0)	183 (19 -498)		62 (48.4)		28 (21.9)	



Ferritin, ng/mL, ≤200	109 (44.0)	254 (16-739)	0.76	60 (55.0)	0.03	36 (33.0)	0.012
>200	139 (56.0)	180 (43-545)		65 (46.8)		26 (18.7)	
Total lymphocyte count, cells/μL, ≤700	123 (50.6)	161 (18-508)	0.058	54 (43.9)	0.040	20 (16.3)	0.002
>700	120 (49.4)	268 (47-943)		69 (57.5)		41 (34.2)	
B-cell count, cells /μL, ≤65	136 (56.2)	169 (16-496)	0.012	62 (45.6)	0.071	29 (21.3)	0.136
>65	106 (43.8)	271 (52-1141)		61 (57.5)		32 (30.2)	
T-cell count, cells /μL, ≤500	140 (57.6)	171 (18-464)	0.033	65 (46.4)	0.153	20 (14.3)	<0.001
>500	103 (42.4)	275 (47-1137)		58 (56.3)		41 (39.8)	
CD4 T-cell count, cells /μL	98 (40.3)	150(12-491)	0.017	46 (46.9)	0.363	13 (13.3)	<0.001
≤200	145 (59.7)	268 (48-874)		77 (53.1)		48 (33.1)	
>200							
Antivirals/immunomodulators							
Remdesivir, Yes	201 (81.0)	185 (29-635)	0.730	98 (48.8)	0.332	50 (24.9)	1.000
No	47 (19.0)	252 (25-634)		27 (57.4)		12 (25.5)	
Monoclonal antibodies, Yes	6 (2.4)	6 (1.4-349)	0.205	2 (33.3)	0.445	1 (16.7)	1.000
No	242 (97.6)	211 (31-637)		123 (50.8)		61 (25.2)	
Tocilizumab/baricitinib, Yes	163 (65.7)	229 (45-650)	0.259	85 (52.1)	0.504	38 (23.3)	0.441
No	85 (34.3)	182 (8-618)		40 (47.1)		24 (28.2)	
Outcomes							
Hospital stay, ≤4 days	108 (43.5)	277 (44-1156)	0.020	61 (56.5)	0.098	33 (30.6)	0.103
>4 days	140 (56.5)	171 (14-518)		64 (45.7)		29 (20.7)	
In hospital death, Yes	21 (8.5)	10 (0.5-56)	<0.001	3 (14.3)	<0.001	0 (0.0)	0.003
No	227 (91.5)	248 (43-722)		122 (53.7)		62 (27.3)	
ICU admission, Yes	12 (4.8)	54 (22-200)	0.126	3 (25.0)	0.083	1 (8.3)	0.304
No	236 (95.2)	225 (28-674)		122 (51.7)		61 (25.8)	
28-day mortality, Yes	24 (9.7)	20 (2-145)	0.001	5 (20.8)	0.002	1 (4.2)	0.012
No	224 (90.3)	247 (43-713)		120 (53.6)		61 (27.2)	
60-day mortality, Yes	34 (13.7)	52 (5-299)	0.006	10 (29.4)	0.010	5 (14.7)	0.199
No	214 (86.3)	247 (43-730)		115 (53.7)		57 (26.6)	
90-day mortality, Yes	36 (14.5)	49 (4-278)	0.002	10 (27.8)	0.004	6 (16.7)	0.297
No	212 (85.5)	250 (43-741)		115 (54.2)		56 (26.4)	

Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage).

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [£] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving

immunosuppression, or active chemotherapy. & A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.



Table S2. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19 according to the vaccination status at hospital admission.

Characteristic	SARS-CoV-2 unvaccinated	SARS-CoV-2 vaccinated	All	P Value
No. (%)	67 (27.0)	181 (73.0)	248	
Sex, male	32 (47.8)	102 (56.4)	134 (54.0)	0.253
Age, y	66 (48-79)	74 (54-83)	70 (52-83)	0.045
White, non-Hispanic	59 (88.1)	162 (89.5)	221 (89.1)	0.819
Charlson comorbidity index	3 (0-5)	4 (1-7)	4 (1-6)	0.004
Number of comorbidities *	1 (0-3)	2 (0-4)	2 (0-4)	0.073
Diabetes	9 (13.4)	51 (28.2)	60 (24.2)	0.019
Congestive heart failure	5 (7.5)	22 (12.2)	27 (10.9)	0.363
Coronary artery disease	10 (14.9)	20 (11.0)	30 (12.1)	0.390
Prior stroke	4 (6.0)	16 (8.8)	20 (8.1)	0.603
Peripheral arterial disease	2 (3.0)	13 (7.2)	15 (6.0)	0.367
Pulmonary disease	15 (22.4)	38 (21.0)	53 (21.4)	0.862
Chronic kidney disease	6 (9.0)	36 (19.9)	42 (16.9)	0.055
Malignant neoplasm	4 (6.0)	29 (16.0)	33 (13.3)	0.056
Immunosuppressive condition†	3 (4.5)	30 (16.6)	33 (13.3)	0.011
Prior COVID-19 infection	0 (0)	9 (5.0)	9 (3.6)	0.118
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission	7.0 (4.0-8.0)	5.0 (3.0-7.0)	5.0 (3.0-7.0)	0.009
SpO2/FiO2 ratio at admission	3460 (275-452)	350 (309-457)	350 (302-457)	0.109
WHO severity score	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.1-4.1)	0.420
X-Ray bilateral lung infiltrates	41 (61.2)	77 (42.5)	118 (47.6)	0.067
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	39 (58.2)	103 (56.9)	142 (57.3)	0.886
Lowest cycle threshold PCR	23.8 (19.0-28.8)	22.1 (17.7-27.3)	22.3 (18.0-28.5)	0.186
TrimericS-IgG, BAU/mL	4.8 (4.8-15)	1710 (266-5670)	581 (10-3278)	<0.001
TrimericS-IgG, Positive	14 (20.9)	158 (87.3)	172 (69.4)	<0.001
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	5 (7.5)	136 (75.1)	141 (56.9)	<0.001
N-IgG, Positive	11 (16.4)	23 (12.7)	34 (13.7)	0.533
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	183 (15-644)	221 (33-635)	206 (26-636)	0.649
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	33 (49.3)	92 (50.8)	125 (50.4)	0.887
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, & Positive	11 (16.4)	51 (28.2)	62 (25.0)	0.069
First available laboratory values				
Interleukin-6, pg/mL	45 (21-140)	42 (12-139)	42 (12-139)	0.531
C-reactive protein, mg/L	48 (26-92)	52 (23-98)	50 (24-97)	0.839
D-dimer, µg/mL	0.7 (0.5-1.4)	0.8 (0.4-1.4)	0.7 (0.4-1.4)	0.833
Ferritin, ng/mL	296 (150-624)	221 (99-487)	238 (109-511)	0.051

Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	659 (404-1021)	699 (487-999)	694 (461-1013)	0.428
B-cell count, cells / μ L	71 (38-105)	54 (25-117)	60 (28-113)	0.143
T-cell count, cells / μ L	366 (255-598)	455 (304-703)	435 (281-660)	0.094
CD4 T-cell count, cells / μ L	214 (127-371)	249 (154-376)	240 (146-376)	0.384
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.9 (1.1-2.6)	1.5 (1.0-2.3)	1.6 (1.0-2.4)	0.107
Antivirals/immunomodulators				
Remdesivir	57 (85.1)	144 (79.6)	201 (81.0)	0.367
Monoclonal antibodies	1 (1.5)	5 (2.8)	6 (2.4)	1.000
Tocilizumab or baricitinib	45 (67.2)	118 (65.2)	163 (65.7)	0.880
Outcomes				
Hospital stay, days	6.0 (4.0-8.0)	5.0 (3.0-8.0)	5.0 (3.0-8.0)	0.478
ICU admission	4 (6.0)	8 (4.4)	12 (4.8)	0.739
28-day mortality	7 (10.4)	17 (9.4)	24 (9.7)	0.811
60-day mortality	7 (10.4)	27 (14.9)	34 (13.7)	0.413
90-day mortality	8 (11.9)	28 (15.5)	36 (14.5)	0.548

Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage). *This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy. & A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S3. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19 according to the SARS-CoV-2 variant at hospital admission.

Characteristic	Delta variant	Omicron variant	All	P Value
No. (%)	106 (42.7)	142 (57.3)	248	
Sex, male	61 (57.5)	73 (51.4)	134 (54.0)	0.369
Age, y	61 (50-76)	77 (57-85)	70 (52- 83)	<0.001
White, non Hispanic	91 (85.8)	130 (91.5)	221 (89.1)	0.216
Charlson comorbidity index	2 (1-5)	5 (2-7)	4 (1- 6)	<0.001
Number of comorbidities*	1 (0-3)	2 (0.2-4)	2 (0-4)	<0.001
Diabetes	24 (22.6)	36 (25.4)	60 (24.2)	0.655
Congestive heart failure	7 (6.6)	20 (14.1)	27 (10.9)	0.067
Coronary artery disease	9 (8.5)	21 (14.8)	30 (12.1)	0.169
Prior stroke	5 (4.7)	15 (10.6)	20 (8.1)	0.105
Peripheral arterial disease	4 (3.8)	11 (7.7)	15 (6.0)	0.282
Pulmonary disease	16 (15.1)	37 (26.1)	53 (21.4)	0.042
Chronic kidney disease	14 (13.2)	28 (19.7)	42 (16.9)	0.231
Malignant neoplasm	10 (9.4)	23 (16.2)	33 (13.3)	0.134
Immunosuppressive condition [‡]	8 (7.5)	25 (17.6)	33 (13.3)	0.023
Prior COVID-19 infection	3 (2.8)	6 (4.2)	9 (3.6)	0.736
Vaccination status				
Unvaccinated	28 (26.4)	39 (27.5)	67 (27.0)	0.886
Days since last vaccine dose	129 (69-180)	94 (67-176)	110 (67-178)	0.239
Clinical presentation				
Days from symptom onset to	6 (4-7)	4 (2-7)	5 (3-7)	0.004

SpO2/FiO2 ratio at admission	346 (306-457)	350 (300-452)	350 (302-457)	0.984
WHO severity score	4.0 (3.1 to 4.1)	3.9 (3.0 to 4.0)	4.0 (3.1 to 4.1)	0.287
Bilateral lung infiltrates on X Ray	58 (54.7)	60 (42.3)	118 (47.6)	0.098
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	0	142	142	
Lowest cycle threshold PCR detected	24 (19-30)	21 (18-28)	22 (18-29)	0.040
Sampling time from admission, days	1 (1-2)	1 (1 -1)	1 (1-1)	0.050
TrimericS-IgG, BAU/mL	488 (18-4748)	745 (8-2308)	581 (10-3278)	0.455
TrimericS-IgG, Positive	78 (73.6)	94 (66.2)	172 (69.4)	0.265
TrimericS-IgG >264 BAU/mL				
N-IgG, Positive	17 (16.0)	17 (12.0)	34 (13.7)	0.359
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	253 (47-916)	191 (11-561)	206 (26-636)	0.095
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	56 (52.8)	69 (48.6)	125 (50.4)	0.524
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, &	23 (21.7)	39 (27.5)	62 (25.0)	0.374
First available laboratory values				
Interleukin-6, pg/mL	49 (18-133)	34 (8-140)	42 (12-139)	0.133
C-reactive protein, mg/L	61 (29-99)	39 (20-89)	50 (24-97)	0.019
D-dimer, μ g/mL	0.6 (0.4 to 1.0)	0.8 (0.5 to 1.9)	0.7 (0.4 to 1.4)	0.016
Ferritin, ng/mL	378 (163-546)	172 (84- 462)	238 (109-511)	<0.001
Total lymphocyte count, cells/ μ L	798 (456-1066.0)	673 (461-973.5)	694 (461-1013)	0.213
B-cell count, cells / μ L	59 (32-109)	60 (24-114)	60 (28-113)	0.580
T-cell count, cells / μ L	452 (280-738)	430 (285-626)	435 (281-660)	0.446
CD4 T-cell count, cells / μ L	264 (140-414.0)	225 (150-370.8)	240 (146-376)	0.702
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.4 (0.9 to 2.3)	1.8 (1.2 to 2.4)	1.6 (1.0 to 2.4)	0.042
Antivirals/immunomodulators				
Remdesivir	86 (81.1)	115 (81.0)	201 (81.0)	1.000
Monoclonal antibodies	1 (0.9)	5 (3.5)	6 (2.4)	0.243
Tocilizumab or baricitinib	84 (79.2)	79 (55.6)	163 (65.7)	<0.001
Outcomes				
Hospital stay, days	4.5 (3.0 to 7.0)	6.0 (4.0 to 8.0)	5.0 (3.0 to 8.0)	0.197
ICU admission	8 (7.5)	4 (2.8)	12 (4.8)	0.132
28-day mortality	9 (8.5)	15 (10.6)	24 (9.7)	0.667
60-day mortality	11 (10.4)	23 (16.2)	34 (13.7)	0.198
90-day mortality	11 (10.4)	25 (17.6)	36 (14.5)	0.145

Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage). *This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy. & A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO2/FiO2 ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S4. Univariate analysis of 28-day mortality in persons admitted-hospital with COVID-19.

Characteristic	28-day death	Non-28-day	All	P Value
n (%)	24 (9.7)	224 (90.3)	248	
Sex, male	11 (45.8)	123 (54.9)	134	0.519
Age, y	87 (81-89)	66 (51-81)	70 (52-83)	<0.001
Charlson comorbidity index	7 (5-9)	3 (1-6)	4 (1-6)	<0.001
Number of comorbidities,*	4 (2-5)	1 (0-3)	2 (0-4)	<0.001
Diabetes	8 (33.3)	52 (23.2)	60 (24.2)	0.315
Congestive heart failure	4 (16.7)	23 (10.3)	27 (10.9)	0.310
Coronary artery disease	9 (37.5)	21 (9.4)	30 (12.1)	0.001
Prior stroke	5 (20.8)	15 (6.7)	20 (8.1)	0.032

Peripheral arterial disease	2 (8.3)	13 (5.8)	15 (6.0)	0.645
Pulmonary disease	5 (20.8)	48 (21.4)	53 (21.4)	1.000
Chronic kidney disease	9 (37.5)	33 (14.7)	42 (16.9)	0.009
Malignant neoplasm	7 (29.2)	26 (11.6)	33 (13.3)	0.025
Immunosuppressive condition [‡]	4 (16.7)	29 (12.9)	33 (13.3)	0.538
Prior COVID-19 infection	0	9 (4.0)	9 (3.6)	1.000
Vaccination status				
Days since last vaccine dose	118 (85-61)	105 (66-179)	110 (67-78)	0.475
Unvaccinated	7 (29.2)	60 (26.8)	67 (27.0)	0.811
Full vaccinated	17 (70.8)	164 (73.2)	181 (73.0)	
Clinical presentation				
Days from symptom onset	4 (3-8)	5 (3-7)	5 (3-7)	0.563
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission	2.7 (2.3-3.5)	3.5 (3.1-4.6)	3.5 (3.0-4.6)	0.563
WHO severity score >4	5 (20.8)	13 (5.8)	18 (7.3)	0.020
X-Ray bilateral lung infiltrates	12 (50.0)	106 (47.3)	118 (47.6)	0.615
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	15 (62.5)	127 (56.7)	142 (57.3)	0.667
Lowest cycle threshold PCR	22 (17-26)	23 (18-29)	22 (18-29)	0.319
TrimericS-IgG, BAU/mL	978 (5-5673)	580 (14-2808)	581 (10-3278)	0.994
TrimericS-IgG, Positive	14 (58.3)	158 (70.5)	172 (69.4)	0.246
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	13 (54.2)	128 (57.1)	141 (56.9)	0.830
N-IgG, Positive	4 (16.7)	30 (13.4)	34 (13.7)	0.753
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	20 (2-145)	247 (43-713)	206 (26-636)	0.001
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	5 (20.8)	120 (53.6)	125 (50.4)	0.002
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, &	1 (4.2)	61 (27.2)	62 (25.0)	0.012
Mitogen-QuantiferonTB,	7.0 (1.1-9.8)	9.7 (3.4-10.0)	9.7 (3.2-10.0)	0.143
Laboratory values				
Interleukin-6, pg/mL	140 (55-450)	38 (11-123)	42 (12-139)	<0.001
C-reactive protein, mg/L	75 (45-159)	48 (22-93)	50 (24-97)	0.022
D-dimer, µg/mL	1.1 (0.7-3.6)	0.7 (0.4-1.3)	0.7 (0.4-1.4)	0.001
Ferritin, ng/mL	620 (190-910)	229 (101-489)	238 (109-511)	0.003
Peripheral lymphocyte count,	681 (429-962)	697 (462-1024)	694 (461-1013)	0.532
B-cell count, cells/µL	29 (20-59)	61 (31-117)	60 (28-113)	0.015
T-cell count, cells/µL	455 (269-574)	431 (281-684)	435 (281-660)	0.686
CD4 T-cell count, cells/µL	257 (160-382)	239 (145-376)	240 (146-376)	0.903
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.6 (1.1-2.1)	1.6 (1.0-2.4)	1.6 (1.0-2.4)	0.799
Antivirals/immunomodulators				
Remdesivir	15 (62.5)	186 (83.0)	201 (81.0)	0.025
Monoclonal antibodies	0 (0.0)	6 (2.7)	6 (2.4)	1.000
Tocilizumab or baricitinib	12 (50.0)	151 (67.4)	163 (65.7)	0.113

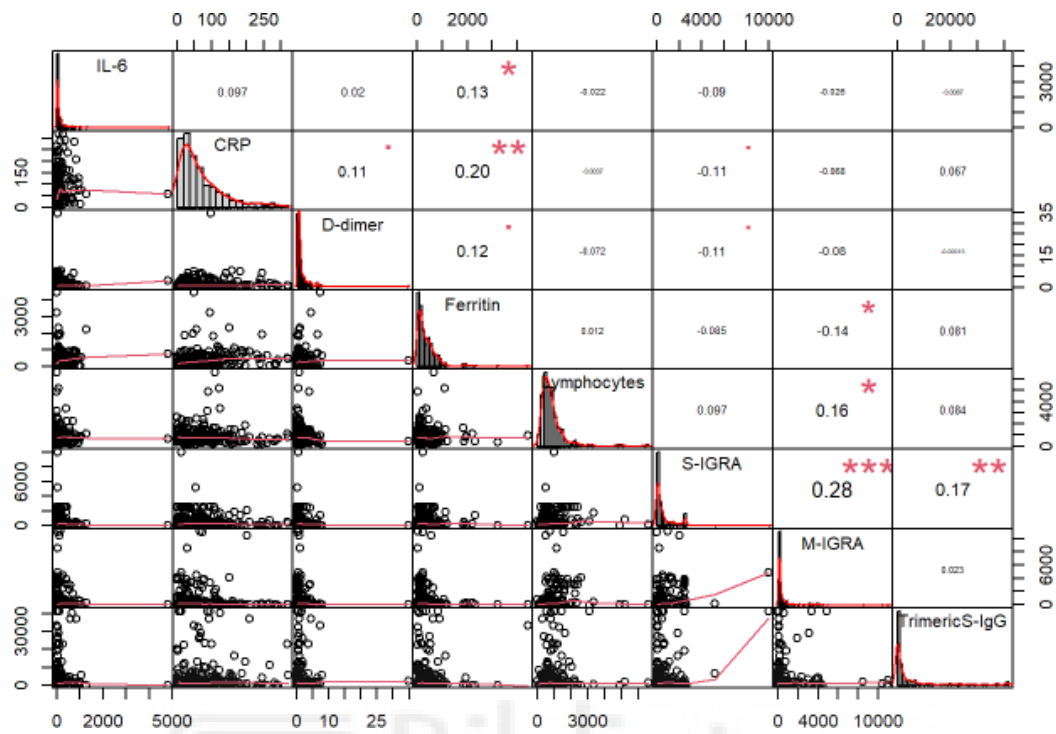
Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage). *This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN-γ[mitogen] – IFN-γ[blank] ≥ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S5. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19 according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission

Characteristic	Negative/ borderline SARS-CoV-2 IGRA (<200 mIU/mL)	Positive SARS-CoV-2 IGRA (>200 mIU/mL)	All	P Value
No, %	123 (49.6)	125 (50.4)	248	
Sex, male	70 (56.9)	64 (51.2)	134 (54.0)	0.376
Age, y	76 (59-85)	62 (49-79)	70 (52-83)	<0.001
White, non-Hispanic	112 (91.1)	109 (87.2)	221 (89.1)	0.416
Charlson comorbidity index	4 (2-7)	3 (1-6)	4 (1-6)	0.024
Number of comorbidities*	2 (1-4)	1 (0-3)	2 (0-4)	0.024
Diabetes	33 (26.8)	27 (21.6)	60 (24.2)	0.375
Congestive heart failure	18 (14.6)	12 (9.6)	30 (12.1)	0.247
Coronary artery disease	13 (10.6)	14 (11.2)	27 (10.9)	1.000
Prior stroke	8 (6.5)	12 (9.6)	20 (8.1)	0.485
Peripheral arterial disease	6 (4.9)	9 (7.2)	15 (6.0)	0.596
Pulmonary disease	28 (22.8)	25 (20.0)	53 (21.4)	0.644
Chronic kidney disease	26 (21.1)	16 (12.8)	42 (16.9)	0.092
Malignant neoplasm	16 (13.0)	17 (13.6)	33 (13.3)	1.000
Immunosuppressive condition [†]	15 (12.2)	18 (14.4)	33 (13.3)	0.709
Prior COVID-19 infection	4 (3.3)	5 (4.0)	9 (3.6)	1.000
Vaccination status				
Unvaccinated	34 (27.6)	33 (26.4)	67 (27.0)	0.887
Vaccinated [‡]	89 (72.4)	92 (73.6)	181 (73.0)	
Days since last vaccine dose	12 (73-184)	95 (59-175)	110 (67-178)	0.117
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission	5 (3-7)	6 (3-8)	5 (3-7)	0.377
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission (*100)	3.4 (2.8-4.1)	3.5 (3.4-4.6)	3.5 (3.0-4.6)	<0.001
WHO severity score	4.0 (3.1-4.1)	4.0 (3.0-4.0)	4.0 (3.1-4.1)	0.187
WHO severity score >4	14 (11.4)	4 (3.2)	18 (7.2)	0.03
X-Ray bilateral lung infiltrates	56 (45.5)	62 (49.6)	118 (47.6)	0.298
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	73 (59.3)	69 (55.2)	142 (57.3)	0.524
Lowest cycle threshold PCR	22 (17-29)	23 (19-28)	22 (18-29)	0.130
TrimericS-IgG, BAU/mL	173 (4.8-2535)	1090 (81-3650)	581 (10-3278)	0.015
TrimericS-IgG, Positive	73 (59.3)	99 (79.2)	172 (69.4)	0.001
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	59 (48.0)	82 (65.6)	141 (56.9)	0.007
N-IgG, Positive	11 (8.9)	23 (18.4)	34 (13.7)	0.041
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	22 (0.5-80)	635 (337-1752)	206 (26-636)	<0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA [§] & Positive	18 (14.6)	44 (35.2)	62 (25.0)	<0.001
Mitogen-QuantiferonTB	8.6 (2.4-10.0)	9.8 (3.4-9.9)	9.7 (3.2-10.0)	0.827
QuantiferonTB, Positive	4 (3.5)	4 (3.6)	8 (3.6)	0.902
Outcomes				
Hospital stay, days	6 (4-9)	5 (3-7)	5 (3-8)	0.092
ICU admission	9 (7.3)	3 (2.4)	12 (4.8)	0.083
28-day mortality	19 (15.4)	5 (4.0)	24 (9.7)	0.002
60-day mortality	24 (19.5)	10 (8.0)	34 (13.7)	0.010
90-day mortality	6 (21.1)	10 (8.0)	36 (14.5)	0.004

Continuous variables are expressed as median (interquartile range). Categorical variables are expressed as number (percentage). *This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [†]This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy. [‡]Of 181 vaccinated patients, 103 (57%) were fully vaccinated and 78 (43%) had received a booster dose. [§]A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Fig. S1. Correlation of interferon- γ levels with inflammatory biomarkers and IgG anti-spike antibodies in persons hospitalized with COVID-19.



IL-6, Interleukin-6; CRP, C-reactive protein; Lymphocytes, total peripheral lymphocyte count; S-IGRA, SARS-CoV-2 IGRA; M-IGRA, non-specific (mitogen) IGRA response; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$.

Fig. S2. Receiver operating characteristic curve to assess the performance of SARS-CoV-2 interferon- γ assay to predict 28-day mortality.

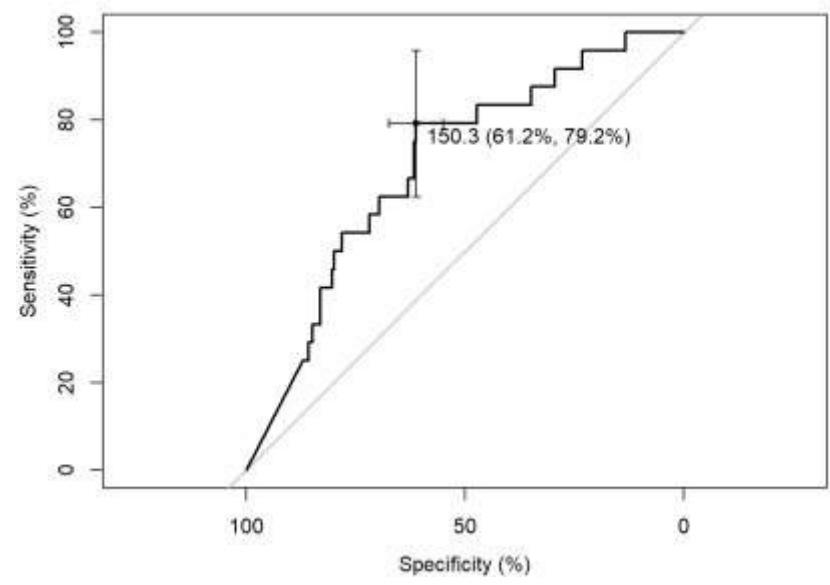
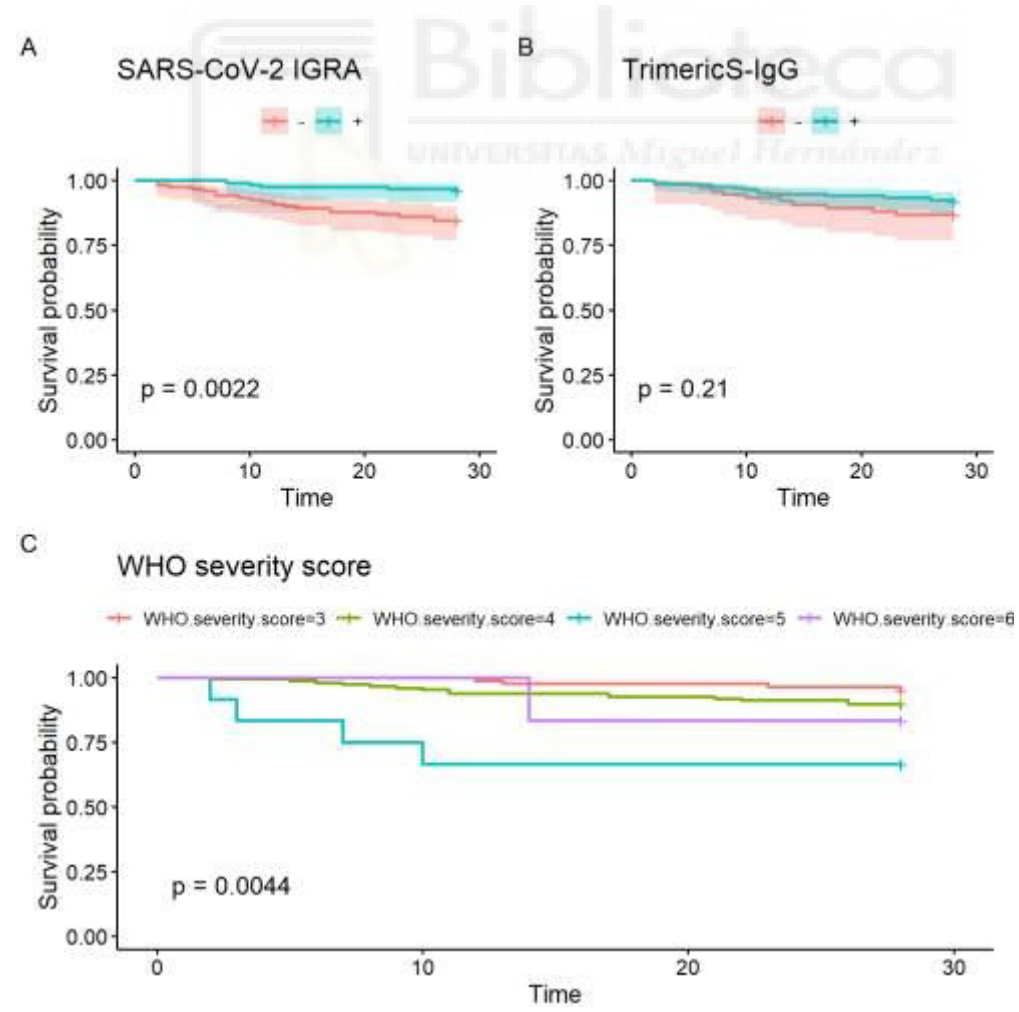


Fig. S3 Kaplan Meier estimated survival at 28 days curves according to the variables of interest.



Methods

Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII Assay (RUO) - Specifications and Methodology

The Novaplex™ assay targets specific nucleic acid sequences associated with critical Spike protein mutations (E484A, N501Y, and HV69/70 deletion) and the RdRP gene of SARS-CoV-2.

Multiplex Real-time PCR:

The assay employs a multiplex real-time PCR approach, allowing simultaneous amplification of multiple target sequences in a single reaction. This streamlined process not only saves time and resources but also ensures the sensitivity and specificity of the detection, reducing the risk of false-negative or false-positive results.

To achieve superior accuracy and efficiency in target amplification and detection, Seegene's proprietary DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) and TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) technologies are employed. DPO™ technology enhances the specificity and sensitivity of primer binding, reducing non-specific amplification, while TOCE™ technology enables robust and accurate target detection.

Please note that the primer sequences used in this assay are proprietary and considered confidential information of Seegene.

Thermal Conditions

The PCR amplification is performed using the following thermal cycling conditions:

Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	3	95°C	10 sec
4		60°C	40 sec
5		72°C	20 sec
6	GOTO Step 3, 2 more times		
7	42	95°C	10 sec
8*		60°C	15 sec
9*		72°C	10 sec
10	GOTO Step 7, 41 more times		

* **Plate Read at Step 8 and 9.** Fluorescence is detected at 60°C and 72°C.

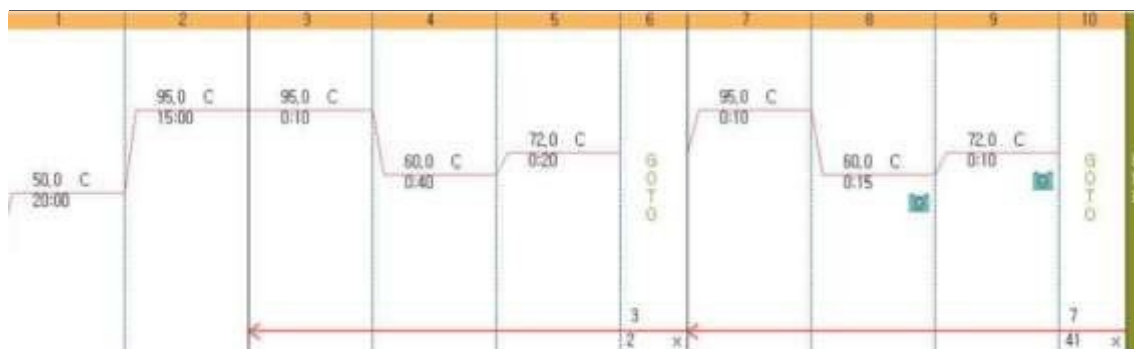


Fig. M1. Protocol Editor Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII Assay.



T-Cell Immunity Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Measured by an Interferon- γ Release Assay Is Strongly Associated With Patient Outcomes in Vaccinated Persons Hospitalized With Delta or Omicron Variants

Marta Fernández-González,^{1,2,✉} Vanesa Agulló,^{1,2,✉} José Alberto García,^{1,2,✉} Sergio Padilla,^{1,2,3,✉} Javier García-Abellán,^{1,2,3,✉} Alba de la Rica,^{1,4,✉} Paula Mascarell,^{1,✉} Mar Masía,^{1,2,3,a,✉} and Félix Gutiérrez^{1,2,3,a,✉}

¹Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Elche; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid; ³Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante; and ⁴Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain

Background. We measured T-cell and antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in vaccinated patients hospitalized for coronavirus disease 2019 (COVID-19) and explored their potential value to predict outcomes.

Methods. This was a prospective, longitudinal study including vaccinated patients hospitalized with Delta and Omicron SARS-CoV-2 variants. TrimericS-IgG antibodies and SARS-CoV-2 T-cell response were measured using a specific quantitative interferon- γ release assay (IGRA). Primary outcome was all-cause 28-day mortality or need for intensive care unit (ICU) admission. Cox models were used to assess associations with outcomes.

Results. Of 181 individuals, 158 (87.3%) had detectable SARS-CoV-2 antibodies, 92 (50.8%) showed SARS-CoV-2-specific T-cell responses, and 87 (48.1%) had both responses. Patients who died within 28 days or were admitted to ICU were less likely to have both unspecific and specific T-cell responses in IGRA. In adjusted analyses (adjusted hazard ratio [95% confidence interval]), for the entire cohort, having both T-cell and antibody responses at admission (0.16 [.05–.58]) and Omicron variant (0.38 [.17–.87]) reduced the hazard of 28-day mortality or ICU admission, whereas higher Charlson comorbidity index score (1.27 [1.07–1.51]) and lower oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio (2.36 [1.51–3.67]) increased the risk.

Conclusions. Preexisting immunity against SARS-CoV-2 is strongly associated with patient outcomes in vaccinated individuals requiring hospital admission for COVID-19. Persons showing both T-cell and antibody responses have the lowest risk of severe outcomes.

Keywords. T-cell immunity; COVID-19; IGRA; mortality; Omicron.

Although vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is highly effective at preventing coronavirus disease 2019 (COVID-19)-associated hospitalization and death, up to 180 per 100 000 vaccinated persons develop breakthrough infections and up to 15% of them may have severe outcomes [1–3]. Immune pathogenesis underlying the diverse clinical course of COVID-19 after

vaccination is unclear. Cohort studies conducted in the United States (US) have shown that the risk for severe outcomes after completing a primary COVID-19 vaccination series increases with age and is higher in those with immunocompromising conditions and multiple comorbidities [2, 4]. Potential host factors that could contribute to severe outcomes in populations at risk include suboptimal response to vaccination, waning immunity [5–8], and evasion of vaccine-induced immunity by the new variants [9–14].

Understanding protective immunity against SARS-CoV-2 after COVID-19 vaccination may be important for predicting the risk of severe breakthrough infections. While neutralizing antibodies have been associated with protection from reinfection [15] and severe COVID-19 [16–18], the protective role of T-cell responses remains undefined. Because T-cell reactivity to SARS-CoV-2 peptides appears largely preserved across variants [19,20], T-cell immune responses might be instrumental

Received 30 March 2023; editorial decision 01 July 2023; accepted 06 July 2023; published online 7 July 2023

*M. M. and F. G. contributed equally to this work as joint senior authors.

Correspondence: Félix Gutiérrez, MD, Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad S/N, 03202, Elche, Alicante, Spain (gutierrez_fel@gva.es); Mar Masía, MD, Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad S/N, 03202, Elche, Alicante, Spain (mmasias@umh.es).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiad260>

to protection from reinfection or severe disease, particularly with the new variants. Interferon-gamma (IFN- γ) release assays (IGRAs) allow the quantification of these responses in a simple and accurate way [21–26]. Unfortunately, most studies characterizing severe breakthrough SARS-CoV-2 infections among vaccinated individuals did not assess preexisting immunity in the patients and did not attempt to identify potential markers of disease severity. Moreover, they were performed during periods of pre-Omicron variant predominance.

With a large proportion of the population vaccinated against SARS-CoV-2, it is important to characterize patients who remain at high risk of poor outcome in daily clinical practice. In the present work, we measured both antibody and T-cell responses to assess SARS-CoV-2 immunity in fully vaccinated patients hospitalized with COVID-19 caused by the Delta and Omicron variants, and explored their potential value to predict severe outcomes.

METHODS

Study Design, Setting, and Participants

This was a prospective, longitudinal cohort study conducted in a cohort of patients hospitalized for COVID-19 at Hospital General Universitario de Elche, Spain, between 22 July 2021 and 23 April 2022, a period that includes intervals during which the Delta variant (July 22–20 December 2021) and Omicron variant (January 1–23 April 2022) were predominant. Patients were eligible for inclusion in the study if they had SARS-CoV-2 infection confirmed through real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); abnormal findings on chest radiograph (CXR) and/or severity criteria, including oxygen saturation <93% and CURB-65 score for pneumonia severity ≥ 2 ; and had completed a primary COVID-19 vaccination series with any of the Spanish Ministry of Health–authorized messenger RNA (mRNA) (BNT162b2, Pfizer-BioNTech; or mRNA-1273, Moderna) or viral vector (AZD1222, AstraZeneca; or Ad26.COV2.S, Janssen/J&J) vaccines confirmed by the centralized immunization registry. Partially vaccinated participants (<14 days since completing the primary series or not completing the series before the specimen collection date) and those who did not have vaccination records were excluded.

Patients were managed according to a predefined diagnostic and therapeutic local protocol approved by the COVID-19 Institutional Committee. Details of the medical management during hospital stay are provided elsewhere [27, 28]. The protocol included standardized collection of clinical variables and serial blood and nasopharyngeal sampling (NPS) obtained on admission and during the hospital stay for laboratory measurements, including levels of interleukin 6 (IL-6), ferritin, C-reactive protein (CRP), D-dimer, and lymphocyte counts and their subsets (AQUIOS CL Flow Cytometer, Beckman

Coulter). Patients received antiviral and/or immunomodulatory therapy containing dexamethasone $\pm$ remdesivir $\pm$ tocilizumab $\pm$ baricitinib according to prespecified criteria [28, 29]. All patients received antithrombotic prophylaxis with enoxaparin. Patients were followed up at months 1, 3, 6, and 12 after discharge.

The primary outcome was all-cause 28-day mortality or need for intensive care unit (ICU) admission following hospitalization. Secondary outcomes evaluated were 28-, 60-, and 90-day mortality.

Ethics

The study was approved by the Institutional Ethical Committee as part of the COVID-19 Elx/Spain project. Written informed consent for participation was not required for this study, in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

Specimen Collection and Processing

Serum and lithium heparin whole blood specimens were obtained for measuring SARS-CoV-2–specific antibodies and IGRAs, respectively. Heparin tube was used for IGRA incubation within 4 hours.

Humoral Immune Response: Anti-SARS-CoV-2 IgG Measurement

IgG Against SARS-CoV-2 Trimeric Spike and Internal Nucleocapsid Proteins

Immunoglobulin G (IgG) antibody serum levels against the trimeric spike protein (TrimericS-IgG) were quantified at first day of admission using a quantitative immunoassay (LIAISON SARS-CoV-2 TrimericS-IgG assay, DiaSorin, Italy) in an automated analyzer (LIAISON XL). Results were interpreted according to the manufacturer's criteria: ≥ 33.8 binding antibody units (BAU)/mL was considered positive with a numeric value for quantitative measurement. IgG serum levels against the internal nucleocapsid (N) protein (N-IgG) were measured using a semi-quantitative chemiluminescent immunoassay (SARS-CoV-2 IgG, Abbott Laboratories) in an automated Alinity-i system and interpreted as follows: (sample relative light unit [RLU]/calibrator RLU) ratio <1.40 was defined as negative and ratio ≥ 1.40 as positive.

Cellular Immune Response: Quantitative Determination of IFN- γ Release by SARS-CoV-2–Specific T Cells

SARS-CoV-2 cellular response was measured at first day of admission using a specific quantitative IGRA following the manufacturer's instructions (Quan-T-Cell SARS-CoV-2, Euroimmun, Germany). Details are provided elsewhere [23, 24]. For unspecific IFN- γ release (mitogen-SARS-CoV-2 IGRA), a positive result was defined according to the manufacturer's instructions as IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] ≥ 400 mIU/mL. For specific T-cell response (SARS-CoV-2 IGRA), results were as follows: IFN- γ [SARS-CoV-2] – IFN- γ [blank]

<100 mIU/mL was considered negative, 100–200 mIU/mL was borderline, and >200 mIU/mL was positive; for the analyses as a dichotomous variable, we categorized the results as positive (>200 mIU/mL) or negative ($\leq$ 200 mIU/mL). Specific interferon SARS-CoV-2 responses were evaluated in both patients with positive mitogen ($\geq$ 400 mIU/mL) and patients with an indeterminate result (<400 mIU/mL). The upper limit of quantification achieved was 2500 mIU/mL.

Characterization of SARS-CoV-2 Variants

Confirmed SARS-CoV-2 PCR-positive NPS (Cobas 6800, Roche, Switzerland) was characterized either by sequencing or multiplex PCR according to the availability of resources. Genome sequencing was performed following the ARTIC amplicon sequencing protocol for MinION version V3 as previously described [30]. Some NPS was characterized by a multiplex PCR (Novaplex SARS-CoV-2 Variants-VII Assay, Seegene, Korea), which targeted specifically the *RdRp* gene and E484A, HV69/70del, and N501Y mutations, following the manufacturer's protocol, in a CFX96 real-time thermocycler (Bio-Rad).

Statistical Analyses

Main analyses were based on time-to-event methods, considering the date of hospital admission for COVID-19 as the cohort entry date. We used multivariable adjusted Cox proportional hazard regression models to assess the association of the variables measuring preexisting humoral (TrimericS-IgG) and T-cell (IGRA) immunity. We fitted the final model with the best set of predictors selected by the potential clinical impact and their unadjusted associations ($P \leq .1$) with the primary outcome. Additionally, we included lymphocyte count as an independent variable. In case of collinearity among predictors, the variable more likely to influence clinical decisions was chosen. For calculations, we considered TrimericS-IgG as both a continuous variable and a categorical variable with 2 different cutoffs ($\geq$ 33.8 BAU/mL and $\geq$ 264 BAU/mL) [31] and considered IGRA as both specific T-cell responses (SARS-CoV-2 IGRA) and unspecific IFN- γ release (mitogen-SARS-CoV-2 IGRA). Covariables incorporated in the analyses included demographic characteristics (age, sex), underlying medical conditions (comorbidities, Charlson comorbidity index [CCI]), vaccination status (time from last vaccination to hospitalization, receipt of booster dose), clinical presentation (baseline oxygen saturation to fraction of inspired oxygen [$\text{SpO}_2/\text{FiO}_2$] ratio, World Health Organization [WHO] 7-point ordinal scale, bilateral lung infiltrates on CXR), microbiological data (SARS-CoV-2 variant, SARS-CoV-2 viral load expressed by the PCR cycle threshold [Ct]), first available laboratory values including peripheral lymphocyte subpopulations, and antiviral and immunomodulatory therapy administered.

Statistical analyses were performed with R version 4.0.3 software (R Foundation for Statistical Computing).

RESULTS

Description of the Study Population

Of 537 patients admitted to hospital due to PCR-confirmed COVID-19 during the study period, 393 (73.2%) had received any dose of SARS-CoV-2 vaccines. Among them, 181 (46.1%) met the eligibility criteria and were included in the study. The median time from last vaccine dose to hospital admission was 110 days (interquartile range [IQR], 67–178 days), with no significant difference between mRNA and viral vector vaccines. SARS-CoV-2 variant (103 Omicron, 78 Delta) was confirmed by genome sequencing in 115 (64%) cases and by multiplex PCR in 53 (29%) cases, and in 13 (7%) cases with high RT-PCR Ct values ($\geq$ 35), it was assumed based on the prevalent variant circulating in our Department of Health at the time of infection.

Supplementary Table 1 summarizes the baseline characteristics, vaccination and clinical status on admission, therapy administered during hospital stay, and outcomes of the patients. Twenty-five (13.8%) patients died from any cause from hospital admission through day 28 or required ICU admission. Specimens for measuring SARS-CoV-2 immune responses were collected a median of 1 day (IQR, 1–1 day) after hospital admission, 6 days (IQR, 4–8 days) after initiation of symptoms, and 3.7 months (IQR, 2.3–6 months) after last vaccine dose (Supplementary Table 1).

A total of 158 of the 181 patients (87.3%) had detectable SARS-CoV-2 antibodies, 92 (50.8%) showed specific T-cell responses in IGRA, and 87 (48.1%) had both antibodies and T-cell responses.

Characteristics of the Patients According to Preexisting Humoral and Cellular Immunity to SARS-CoV-2

Supplementary Table 2 shows the characteristics of patients grouped by whether or not they had TrimericS-IgG antibodies. Seronegative patients were more likely to have immunocompromising conditions, had lower RT-PCR Ct values, and were less likely to have positive IGRA and positive N-IgG. They also had lower total peripheral lymphocyte, B-cell, and CD4 T-cell counts, with higher percentage of CD8 T cells and higher CD4/CD8 ratio. No other significant differences in clinical presentation or outcomes according to seropositivity were observed (Supplementary Table 2).

The characteristics of individuals according to T-cell SARS-CoV-2-specific reactivity in IGRA are shown in Table 1. Patients with negative IGRA results were significantly older and tended to have a higher CCI score. There were no significant differences between both groups regarding their vaccination status, prior SARS-CoV-2 infection, or time from onset

Table 1. Characteristics of Persons Admitted to Hospital With Coronavirus Disease 2019 According to the Presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Cellular Response at Hospital Admission

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	All	P Value
No. (%)	89 (49.2)	92 (50.8)	181	
Sex, male	53 (59.6)	49 (53.3)	102 (56.4)	.454
Age, y, median (IQR)	78 (60–85)	65 (51–80)	74 (55–83)	.002
Race/ethnicity, non-Hispanic White	83 (93.3)	79 (85.9)	162 (89.5)	.168
CCI score, median (IQR)	5 (2–7)	3 (1–7)	4 (1–7)	.060
Comorbidities				
No. of comorbidities ^a , median (IQR)	2 (1–4)	2 (0–3)	2 (1–3)	.156
Diabetes	26 (29.2)	25 (27.2)	51 (28.2)	.869
Congestive heart failure	10 (11.2)	12 (13.0)	22 (12.2)	.821
Coronary artery disease	11 (12.4)	9 (9.8)	20 (11)	.640
Prior stroke	7 (7.9)	9 (9.8)	16 (8.8)	.795
Peripheral arterial disease	6 (6.7)	7 (7.6)	13 (7.2)	1.000
Pulmonary disease	20 (22.5)	18 (19.6)	38 (21)	.716
Chronic kidney disease	22 (24.7)	14 (15.2)	36 (19.9)	.137
Malignant neoplasm	14 (15.7)	15 (16.3)	29 (16.0)	1.000
Immunosuppressive condition ^b	14 (15.7)	16 (17.4)	30 (16.6)	.843
Prior COVID-19 infection	4 (4.5)	5 (5.4)	9 (5.0)	1.000
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	112 (73–184)	95 (59–174)	110 (67–178)	.125
Receipt of booster dose ^c	39 (43.8)	39 (42.4)	78 (43.1)	.881
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	4.5 (2–7)	5 (3–7)	5 (3–7)	.626
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (283–354)	354 (343–462)	350 (309–457)	<.001
WHO severity score, median (IQR)	4 (4–4)	4 (3–4)	4 (3–4)	.001
Bilateral lung infiltrates on CXR	38 (42.7)	39 (42.4)	77 (42.5)	.254
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	51 (57.3)	52 (57.3)	103 (56.9)	1.000
Lowest Ct PCR detected, median (IQR)	22 (17–28)	23 (18–27)	22 (18–27)	.351
Sampling time from admission, d, median (IQR)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	.749
TrimericS-IgG, BAU/mL, median (IQR)	1600 (63–4970)	1820 (601–5933)	1710 (266–5670)	.060
TrimericS-IgG, positive	71 (79.8)	87 (94.6)	158 (87.3)	.003
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	59 (66.3)	77 (83.7)	136 (75.1)	.009
N-IgG, positive	10 (11.2)	13 (14.1)	23 (12.7)	.657
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL, median (IQR)	30 (0.5–96)	631 (338–1729)	221 (33–635)	<.001
SARS-CoV-2 IGRA, positive	0 (0)	92 (100)	92 (50.8)	
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA ^d , positive	13 (14.6)	38 (41.3)	51 (28.2)	<.001
First available laboratory value, median (IQR)				
IL-6, pg/mL	44 (9–141)	41 (14–138)	42 (12–139)	.748
C-reactive protein, mg/L	50 (23–104)	53 (25–85)	52 (23–98)	.786
D-dimer, µg/mL	0.8 (0.5–2.1)	0.7 (0.4–1)	0.8 (0.4–1.4)	.099
Ferritin, ng/mL	371 (113–539)	182 (97–350)	221 (99–487)	.035
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	644 (458–926)	797 (542–1165)	699 (487–999)	.036
B-cell count, cells/µL	48 (22–87)	64 (30–137)	54 (25–117)	.018
T-cell count, cells/µL	410 (294–559)	511 (350–778)	455 (304–703)	.018
CD4 T-cell count, cells/µL	226 (123–359)	289 (177–414)	249 (154–376)	.025
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.4 (0.84–2.30)	1.6 (1.06–2.29)	1.5 (0.98–2.29)	.263
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	73 (82)	71 (77.2)	144 (79.6)	.464
Monoclonal antibodies	4 (4.5)	1 (1.1)	5 (2.8)	.206
Tocilizumab or baricitinib	57 (64)	61 (66.3)	118 (65.2)	.758
Outcomes				
Hospital stay, d, median (IQR)	6 (4–9)	4 (3–7)	5 (3–8)	.039
In-hospital death	12 (13.5)	1 (1.1)	13 (7.2)	.001
28-d mortality or ICU admission	20 (22.5)	5 (5.4)	25 (13.8)	.001
28-d mortality	14 (15.7)	3 (3.3)	17 (9.4)	.005

Table 1. Continued

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	All	P Value
60-d mortality	19 (21.3)	8 (8.7)	27 (14.9)	.021
90-d mortality	20 (22.5)	8 (8.7)	28 (15.5)	.013

Data are presented as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: BAU, binding antibody units; CCI, Charlson comorbidity index; COVID-19, coronavirus disease 2019; Ct, cycle threshold; CXR, chest radiograph; ICU, intensive care unit; IGRA, interferon-gamma release assay; IL-6, interleukin 6; IQR, interquartile range; N, nucleocapsid; PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; WHO, World Health Organization.

*This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.

†This category included human immunodeficiency virus, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

‡Completed primary vaccination plus a booster dose.

§A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN-γ[mitogen] – IFN-γ[blank] ≥ 400 mIU/mL.

of symptoms to hospital admission. Compared with patients showing specific T-cell responses in IGRA, those with negative IGRA results were in a poorer clinical status on admission, with lower SpO₂/FiO₂ ratio and higher WHO 7-point ordinal, and they had lower peripheral lymphocyte, B-cell, T-cell, and CD4 T-cell counts. In addition, they were more likely to require ICU admission or die from any cause through day 28, and had significantly higher 28-, 60-, and 90-day mortality. Similar trends were observed when comparing only patients infected with the Omicron variant (Supplementary Table 3) and when only persons exhibiting both specific T-cell responses (SARS-CoV-2 IGRA) and unspecific IFN-γ release (mitogen-SARS-CoV-2 IGRA) were included in the analysis (Supplementary Table 4).

Table 2 shows the characteristics of the patients (n = 87) who had both SARS-CoV-2 antibodies and specific T-cell responses. Compared with cases with antibody response only (n = 71), individuals with both immune responses were younger, had a better clinical status on admission with higher SpO₂/FiO₂ ratio and lower WHO 7-point ordinal scale, and were more likely to be alive at 28, 60, and 90 days after hospitalization (Table 2). They had higher B-cell count, with no significant differences in total lymphocyte and T-cell counts. A similar trend in clinical outcomes was observed when only patients exhibiting both specific T-cell responses (SARS-CoV-2 IGRA) and unspecific IFN-γ release (mitogen-SARS-CoV-2 IGRA) were included in the analysis, with significantly higher lymphocyte subpopulations (B-cell [*P* = .047], T-cell [*P* = .027], and CD4 T-cell [*P* = .044] counts) in those showing positive TrimericS-IgG, SARS-CoV-2 IGRA, and mitogen-SARS-CoV-2 IGRA than in those with positive TrimericS-IgG and negative IGRA (Supplementary Table 5).

Outcomes

Table 3 shows the characteristics of persons according to the primary outcome. Patients who died from any cause within 28 days or needed ICU admission were older and had more

underlying medical conditions, with a higher CCI score. They were in a poorer clinical status on admission with lower SpO₂/FiO₂ ratio and higher WHO 7-point ordinal scale, had higher levels of inflammatory biomarkers (IL-6, CRP, and ferritin), and less frequently received antiviral therapy with remdesivir. Compared with cases with a favorable outcome, they were less likely to have unspecific IFN-γ release and specific T-cell responses in the IGRA, and had quantitatively lower IFN-γ responses (Table 3 and Supplementary Table 6). There were no significant differences between these groups in SARS-CoV-2 antibody levels or lymphocyte counts.

Correlations of humoral and cellular responses with inflammatory biomarkers and lymphocyte count are shown in Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 7.

Unadjusted and adjusted associations with death from any cause from hospital admission through day 28 or need for ICU in Cox proportional hazards regression models are shown in Supplementary Table 8 and Table 4, respectively. Factors significantly associated with increased risk of death within 28 days or need for ICU in the final adjusted model included a higher CCI score and poor SpO₂/FiO₂ ratio on admission, whereas infection caused by an Omicron variant, SARS-CoV-2-specific T-cell responses in IGRA, and antibody responses were associated with better outcomes (Table 4). Similar trends were observed for secondary outcomes (Supplementary Table 9). We also carried out a post hoc expanded multivariable analysis including all inflammatory biomarkers with statistical significance (*P* < .10) in univariate analyses (IL-6, CRP, ferritin, and D-dimer). In this model (Supplementary Table 10), IL-6 and ferritin were additional predictors of 28-day mortality or ICU admission.

To evaluate the potential additive effects of cellular and antibody responses on protection against severe outcomes, we adjusted Cox models incorporating the 3 variables reflecting combinations of metrics of both responses: (1) negative antibody response, (2) positive antibody response and negative T-cell response, and (3) positive antibody and T-cell responses.

Table 2. Characteristics of Persons Admitted to Hospital With Coronavirus Disease 2019 and Positive Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Response According to the Presence of Cellular Response at Hospital Admission

Characteristic	Positive SARS-CoV-2 TrimericS-IgG		All	P Value
	Negative IGRA	Positive IGRA		
No. (%)	71 (44.9)	87 (55.1)	158	
Sex, male	41 (57.7)	47 (54)	88 (55.7)	.748
Age, y, median (IQR)	78 (62–86)	68 (52–81)	74 (55–84)	.002
CCI score, median (IQR)	5 (2–8)	3 (1–7)	4 (1–7)	.073
Comorbidities				
No. of comorbidities ^a , median (IQR)	2 (1–4)	2 (0–3)	2 (0–3)	.392
Diabetes	18 (25.4)	25 (28.7)	43 (27.2)	.720
Congestive heart failure	7 (9.9)	11 (12.6)	18 (11.4)	.624
Coronary artery disease	9 (12.7)	8 (9.2)	17 (10.8)	.607
Prior stroke	6 (8.5)	9 (10.3)	15 (9.5)	.789
Peripheral arterial disease	5 (7)	7 (8)	12 (7.6)	1.000
Pulmonary disease	15 (21.1)	17 (19.5)	32 (20.3)	.844
Chronic kidney disease	15 (21.1)	13 (14.9)	28 (17.7)	.403
Malignant neoplasm	12 (16.9)	12 (13.8)	24 (15.2)	.659
Immunosuppressive condition ^b	7 (9.9)	13 (14.9)	20 (12.7)	.471
Prior COVID-19 infection	4 (5.6)	5 (5.7)	9 (5.7)	1.000
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	120 (70–195)	101 (65–177)	116 (67–181)	.267
Receipt of booster dose ^c	31 (43.7)	36 (41.4)	67 (42.4)	.872
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	4 (2–7)	5 (3–7)	4.5 (2–7)	.391
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (291–354)	354 (343–462)	350 (314–457)	<.001
WHO severity score, median (IQR)	4 (4–4)	4 (3–4)	4 (3–4)	.027
Bilateral lung infiltrates on CXR	28 (39.4)	37 (42.5)	65 (41.1)	.243
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	41 (57.7)	50 (57.5)	91 (57.6)	1.000
Lowest Ct PCR detected, median (IQR)	22 (18–29)	23 (18–27)	22 (18–28)	.911
Sampling time from admission, d, median (IQR)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	.967
TrimericS-IgG, BAU/mL, median (IQR)	1930 (604–6230)	1910 (790–6530)	1920 (733–6325)	.860
TrimericS-IgG, positive	71 (100)	87 (100)	158 (100)	
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	59 (83.1)	77 (88.5)	136 (86.1)	.362
N-IgG, positive	10 (14.1)	13 (14.9)	23 (14.6)	1.000
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL, median (IQR)	42 (0.5–89)	635 (344–1597)	265 (45–704)	<.001
SARS-CoV-2 IGRA, positive	0 (0)	87 (100)	87 (55.1)	<.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA ^d , positive	11 (15.5)	37 (42.5)	48 (30.4)	<.001
First available laboratory values, median (IQR)				
IL-6, pg/mL	45 (10–127)	40 (13–139)	43 (12–138)	.928
C-reactive protein, mg/L	60 (25–107)	54 (24–88)	55 (24–100)	.621
D-dimer, µg/mL	0.8 (0.5–2.1)	0.7 (0.4–1)	0.7 (0.4–1.4)	.149
Ferritin, ng/mL	371 (118–531)	183 (98–350)	223 (100–474)	.059
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	694 (502–961)	796 (562–1080)	748 (516–998)	.288
B-cell count, cells/µL	50 (26–97)	65 (39–137)	59 (29–118)	.050
T-cell count, cells/µL	452 (304–586)	511 (350–748)	467 (326–711)	.129
CD4 T-cell count, cells/µL	240 (155–371)	285 (177–414)	262 (160–387)	.270
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.7 (0.99–2.40)	1.6 (1.05–2.29)	1.6 (1.02–2.36)	.944
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	57 (80.3)	67 (77)	124 (78.5)	.699
Monoclonal antibodies	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.6)	.449
Tocilizumab or baricitinib	45 (63.4)	58 (66.7)	103 (65.2)	.738
Outcomes				
Hospital stay, d, median (IQR)	6 (3–8)	4 (3–7)	5 (3–8)	.168
In-hospital death	9 (12.7)	1 (1.1)	10 (6.3)	.005
28-d mortality or ICU admission	14 (19.7)	5 (5.7)	19 (12.0)	.012
28-d mortality	11 (15.5)	3 (3.4)	14 (8.9)	.011

Table 2. Continued

Characteristic	Positive SARS-CoV-2 TrimericS-IgG		All	P Value
	Negative IGRA	Positive IGRA		
60-d mortality	15 (21.1)	8 (9.2)	23 (14.6)	.042
90-d mortality	16 (22.5)	8 (9.2)	24 (15.2)	.026

Data are presented as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: BAU, binding antibody units; CCI, Charlson comorbidity index; COVID-19, coronavirus disease 2019; Ct, cycle threshold; CXR, chest radiograph; ICU, intensive care unit; IGRA, interferon-gamma release assay; IL-6, interleukin 6; IQR, interquartile range; N, nucleocapsid; PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; WHO, World Health Organization.

^aThis category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.

^bThis category included human immunodeficiency virus, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

^cCompleted primary vaccination plus a booster dose.

^dA positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL.

We found that the CCI score (adjusted hazard ratio [aHR], 1.27 [95% confidence interval {CI}, 1.07–1.51]; $P = .006$) or the number of comorbidities (aHR, 1.45 [95% CI, 1.04–2.01]; $P = .026$), SpO₂/FiO₂ ratio on admission (aHR, 2.36 [95% CI, 1.51–3.67]; $P < .001$), and SARS-CoV-2 Omicron variant (aHR, 0.38 [95% CI, .17–.87]; $P = .022$) were significantly associated with 28-day mortality or ICU admission following hospitalization, but the strongest association was observed for the composite positive antibody and T-cell responses (aHR, 0.16 [95% CI, .05–.58]; $P = .005$) (Figures 1 and 2 and Supplementary Table 11). Similar trends were observed for secondary outcomes (Supplementary Table 12).

DISCUSSION

In this study of vaccinated patients hospitalized for COVID-19 caused by the Delta and Omicron variants, preexisting T-cell immunity against SARS-CoV-2 was strongly associated with patient outcomes. Persons showing both antibody and T-cell responses had the lowest risk of mortality or ICU admission, suggesting that dual contribution of humoral and cellular immunity is important to prevent against disease progression. Previous reports had documented that severe COVID-19 illness among fully vaccinated persons occurred more commonly among those with risk factors for severe disease including older age and underlying health conditions, but the importance of SARS-CoV-2 immunity in protection against poor outcomes was unknown.

To our knowledge, this is the first study to date to evaluate comprehensively preexisting immunity at the individual level in patients hospitalized for COVID-19 and to determine any potential effect on the clinical outcome. Our study focused on the role played by antibodies and T-cell responses and explored whether using these metrics of protective immunity in vaccinated patients with COVID-19 admitted to hospital provides useful information about risk for severe outcome or

death. Consistent with large-scale observational cohorts, the risk of hospitalization and death due to Omicron was substantially lower than for Delta [32–35] and, as expected, death occurred more commonly among persons with risk factors for severe disease, specifically older age and underlying health conditions including diabetes, cardiovascular disease, and chronic renal disease, emphasizing the impact of multiple comorbidities on developing and maintaining SARS-CoV-2-specific immunity. In our analyses, increasing age did not remain associated, suggesting that age-related suboptimal response to vaccines and/or waning immunity might account for the association observed in prior cohort studies.

Our results on the protective role of T-cell immunity against severe outcomes suggest that antibodies developed after immunization with the current COVID-19 vaccines based on the ancestral strain of SARS-CoV-2 may not be sufficient to prevent against serious disease upon breakthrough infection caused by new variants. These findings are aligned with previous laboratory data suggesting that the generation and maintenance of robust SARS-CoV-2-specific T-cell responses could play a significant role in long-term vaccine efficacy against severe disease caused by new variants, given the limited T-cell escape by the Beta, Delta, and Omicron variants despite extensive mutations and reduced susceptibility to neutralizing antibodies [20, 36, 37]. In contrast to neutralizing antibody epitopes, T-cell epitopes are abundant and located across the entire spike protein [38], indicating that most SARS-CoV-2 spike-specific T-cell responses are directed against conserved epitopes and that SARS-CoV-2 viral evasion from T cells may be limited.

The highest levels of protection against severe COVID-19 illness observed in our study in individuals with both antibody and T-cell responses is in line with prior reports showing that a coordinated humoral and cellular immune response is beneficial for COVID-19 patients [39]. The results are also concordant with data obtained in a longitudinal study of B-cell and T-cell responses against ancestral SARS-CoV-2, Beta,

Table 3. Univariate Analysis of 28-Day Mortality or Intensive Care Unit Admission in Persons Admitted to Hospital With Coronavirus Disease 2019

Characteristic	Non-28-d Death or ICU Admission	28-d Death or ICU Admission	All	P Value
No. (%)	156 (86.2)	25 (13.8)	181	
Sex, male	88 (56.4)	14 (56.0)	102 (56.4)	1.000
Age, y, median (IQR)	70 (52–83)	82 (74–89)	74 (54–83)	.002
CCI score, median (IQR)	3 (1–7)	7 (5–9)	4 (1–7)	<.001
Comorbidities				
No. of comorbidities ^a , median (IQR)	2 (0–3)	3 (2–4)	2 (1–3)	.001
Diabetes	38 (24.4)	13 (52)	51 (28)	.008
Congestive heart failure	19 (12.2)	3 (12)	22 (12.2)	1.000
Coronary artery disease	11 (7.1)	9 (36)	20 (11)	<.001
Prior stroke	12 (7.7)	4 (16)	16 (8.8)	.244
Peripheral arterial disease	11 (7.1)	2 (8)	13 (7.2)	.696
Pulmonary disease	32 (20.5)	6 (24)	38 (21)	.791
Chronic kidney disease	26 (16.7)	10 (40)	36 (19.9)	.013
Malignant neoplasm	22 (14.1)	7 (28.0)	29 (16.0)	.136
Immunosuppressive condition ^b	25 (16)	5 (20)	30 (16.6)	.572
Prior COVID-19 infection	9 (5.8)	0 (0)	9 (5.0)	.614
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	107 (66–180)	112 (80–156)	110 (67–178)	.988
Receipt of booster dose ^c	66 (42.3)	12 (48)	78 (43.1)	.666
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	5 (3–7)	6 (3–8)	5 (3–7)	.339
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	350 (339–462)	280 (238–346)	350 (309–457)	<.001
WHO severity score, median (IQR)	4 (3–4)	4 (4–5)	4 (3–4)	<.001
Bilateral lung infiltrates on CXR	64 (41)	13 (52)	77 (42.5)	.498
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	51 (57.3)	52 (57.3)	134 (56.9)	1.000
Lowest Ct PCR detected, median (IQR)	22 (18–28)	21 (16–25)	22 (18–27)	.213
Sampling time from admission, d, median (IQR)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	.148
TrimericS-IgG, BAU/mL, median (IQR)	1610 (312–4910)	2320 (43–8000)	1710 (266–5670)	.744
TrimericS-IgG, positive	139 (89.1)	19 (76)	158 (87.3)	.099
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	119 (76.3)	17 (68)	136 (75.1)	.454
N-IgG, positive	18 (11.5)	5 (20)	23 (12.7)	.327
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL, median (IQR)	268 (44–713)	45 (4–145)	221 (33–635)	.001
SARS-CoV-2 IGRA, positive	87 (55.8)	5 (20)	92 (50.8)	.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA ^d , positive	49 (31.4)	2 (8)	51 (28.2)	.026
First available laboratory values, median (IQR)				
IL-6, pg/mL	36 (9–111)	152 (41–409)	42 (12–139)	.001
C-reactive protein, mg/L	47 (21–88)	96 (47–163)	52 (23–98)	.003
D-dimer, µg/mL	0.7 (0.4–1.3)	1 (0.6–4.4)	0.8 (0.4–1.4)	.007
Ferritin, ng/mL	184 (94–435)	774 (468–921)	221 (99–487)	<.001
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	699 (499–999)	739 (400–990)	699 (487–999)	.673
B-cell count, cells/µL	55 (26–117)	51 (21–119)	54 (25–117)	.585
T-cell count, cells/µL	460 (304–714)	428 (277–565)	455 (304–703)	.451
CD4 T-cell count, cells/µL	259 (155–380)	240 (128–365)	249 (154–376)	.472
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.5 (0.92–2.33)	1.3 (0.99–2.19)	1.5 (0.98–2.29)	.434
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	128 (82.1)	16 (64)	144 (79.6)	.058
Monoclonal antibodies	4 (2.6)	1 (4.0)	5 (2.8)	.529
Tocilizumab or baricitinib	104 (66.7)	14 (56)	118 (65.2)	.366

Data are presented as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: BAU, binding antibody units; CCI, Charlson comorbidity index; COVID-19, coronavirus disease 2019; Ct, cycle threshold; CXR, chest radiograph; ICU, intensive care unit; IGRA, interferon-gamma release assay; IL-6, interleukin 6; IQR, interquartile range; N, nucleocapsid; PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; WHO, World Health Organization.

^aThis category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions.

^bThis category included human immunodeficiency virus, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

^cCompleted primary vaccination plus a booster dose.

^dA positive result was defined according to the manufacturer as: IFN-γ[mitogen] – IFN-γ[blank] ≥400 mIU/mL.

Table 4. Unadjusted and Adjusted Associations With 28-Day Mortality or Intensive Care Unit Admission in Persons Admitted to Hospital With Coronavirus Disease 2019^a

Characteristic	Unadjusted HR (95% CI)	P Value	Adjusted HR (95% CI)	P Value
Age, y	1.04 (1.01–1.07)	.003	0.99 (.96–1.03)	.734
Female sex	1.03 (.47–2.26)	.947	1.55 (.65–3.72)	.325
CCI score ^b	1.24 (1.11–1.39)	<.001	1.27 (1.07–1.52)	.003
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission	2.80 (1.92–4.08)	<.001	2.28 (1.48–3.51)	<.001
SARS-CoV-2 variant, Omicron	0.55 (.25–1.21)	.140	0.40 (.18–.90)	.027
TrimericS-IgG, positive	0.42 (.17–1.04)	.061	0.31 (.11–.70)	.031
SARS-CoV-2 IGRA, positive	0.22 (.08–.59)	.003	0.33 (.11–.95)	.040
Remdesivir	0.42 (.18–.94)	.036	0.53 (.21–1.36)	.188
Peripheral lymphocyte count	1.00 (.96–1.05)	.900	1.03 (0.98–1.07)	.270

Abbreviations: CCI, Charlson comorbidity index; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; IGRA, interferon-gamma release assay; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein.

^aEstimates were obtained from fitting multivariable Cox proportional hazards regression models with multivariable adjustment. Adjustment was made for age (per year increase), sex, CCI score (per unit increase), SpO₂/FiO₂ ratio (per 100-unit decrease), SARS-CoV-2 variant, TrimericS-IgG (cutoff for positivity ≥ 33.8 BAU/mL), IGRA (cutoff for positivity >200 mIU/mL), remdesivir use, and peripheral lymphocyte count (per 100 cells/ μ L increase).

^bEstimates were similar when CCI score was replaced by number of comorbidities (adjusted hazard ratio, 1.44 [95% confidence interval, 1.05–1.99]; $P = .025$).

Delta, and Omicron variants after immunization with the BNT162b2 vaccine. In that investigation, the reduced antibody titers against the receptor-binding domain of the variant, combined with the reduced spike-specific T-cell responses, correlated with the increased susceptibility of vaccinated persons to breakthrough COVID-19 caused by Omicron, suggesting that protection against highly mutated variants relied on the contribution of both humoral and cellular immunity [40].

To determine cell-mediated immunity against SARS-CoV-2, we used a commercial IGRA assay, a simple and reliable method of quantifying T-cell response in convalescent and vaccinated individuals [21–23]. The assay quantifies IFN- γ responses that may be predominantly driven by T cells, but innate-like T cells (natural killer T cells, mucosal-associated invariant T cells) may also be producing IFN- γ . The IGRA presents practical advantages over conventional methods and, although it might have a slightly lower sensitivity than conventional enzyme-linked immunosorbent spot assay for studying T cells following vaccination [41, 42], it may allow the evaluation of T-cell immune responses to SARS-CoV-2 in everyday clinical practice. Interestingly, in our study, the proportion of patients with unspecific IFN- γ mitogen-stimulated response was lower than the specific T-cell response after stimulation with antigens of the SARS-CoV-2 spike protein. The lower response to

nonspecific stimulation during the acute phase of COVID-19 was not unexpected. Lymphocytopenia is a striking feature of full-blown COVID-19 [43], and severely ill patients have been found to have a substantial reduction of IFN- γ levels with impairment of IFN- γ production upon phytohemagglutinin, a potent IFN- γ mitogen that has been correlated with T-lymphocyte reduction in the peripheral blood [44, 45]. Longitudinal studies have shown that once the acute phase of

COVID-19 is resolved and peripheral lymphocyte counts normalize, an effective IFN- γ production by T-lymphocytes is restored [45].

Our study is the first to evaluate correlates of protection and define the role of T-cell responses in disease severity at time of acute COVID-19. In addition to the prospective design with close and long follow-up, the study has several notable strengths, including the use of objective metrics to assess severe outcomes and the utilization of validated serological platforms, measuring both antibodies and T-cell immunity to SARS-CoV-2, to accurately assess humoral and cellular immune responses. Confirmation of the SARS-CoV-2 variant with molecular methods in 93% of the cases is another strength of this study.

The main implication of our findings about preexisting immunity and risk of severe outcomes in vaccinated patients is that measuring immunity may add value to the current clinical evaluation based on age and comorbidities. Our results suggest that with the emergence of new variants, the presence of antibodies would be insufficient to estimate a person's degree of protection against severe outcomes or death. To better characterize the magnitude of protective immunity and identification of patients at high risk for progression, it may be important to measure both antibody production and T-cell responses. Further steps to use these tests to estimate a person's degree of protection against severe outcomes include defining thresholds in a standardized routine practice and evaluating their performance in clinical practice.

The study has limitations. First, the study population represents a convenience sample of a single medical center and comprises predominantly White persons admitted to hospital, limiting generalizability to the wider population. Second, the limited sample size did not allow us to draw conclusions on the differential effect of preexisting immunity on each variant of SARS-CoV-2 and particular subgroups of patients receiving different COVID-19 vaccines. Third, we did not examine patients at different timepoints from vaccination to infection to determine the exact timeframe of waning immunity. Fourth, although we only included in the study hospital admissions primarily related to COVID-19 infection, outcomes that occurred during COVID-19 might have been related to other factors, including exacerbated comorbidities. Fifth, SARS-CoV-2-specific T-cell responses have been interpreted despite the low unspecific IFN- γ mitogen response. Finally, it is unknown

Variable		Hazard ratio	aHR (95% Ci)	P value
Age			1.00 (.96, 1.04)	.870
Sex	Male		Reference	
	Female		1.49 (.63, 3.51)	.364
Charlson comorbidity index*			1.27 (1.07, 1.51)	.006
SpO ₂ /FiO ₂ ratio			2.36 (1.51, 3.67)	<.001
SARS-CoV-2 variant	Delta		Reference	
	Omicron		0.38 (.17, 0.87)	.022
Immune responses	TrimericS-IgG(-)		Reference	
	TrimericS-IgG(+) & IGRA(-)		0.37 (.12, 1.10)	.073
	TrimericS-IgG(+) & IGRA(+)		0.16 (.05, 0.58)	.005
Remdesivir	No		Reference	
	Yes		0.61 (.25, 1.51)	.286
Peripheral lymphocyte count			1.02 (.98, 1.07)	.290

Figure 1. Predictors for 28-day mortality or intensive care unit admission in persons admitted to hospital with coronavirus disease 2019. Estimates were obtained from fitting a multivariable Cox proportional hazards regression model incorporating age (per year increase), sex, Charlson comorbidity index (CCI) score (per unit increase), oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio (per 100-unit decrease), severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variant, remdesivir use, peripheral lymphocyte count (per 100 cells/ μ L increase) and the 3 variables reflecting combinations of metrics of both immune responses: negative antibody response; positive antibody response and negative T-cell response; and positive antibody response and positive T-cell response. *Estimates were similar when CCI score was replaced by number of comorbidities (adjusted hazard ratio, 1.45 [95% confidence interval, 1.04-2.01]; $P = .026$). Abbreviations: aHR, adjusted hazard ratio; CI, confidence interval; IGRA, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 interferon-gamma release assay; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein.

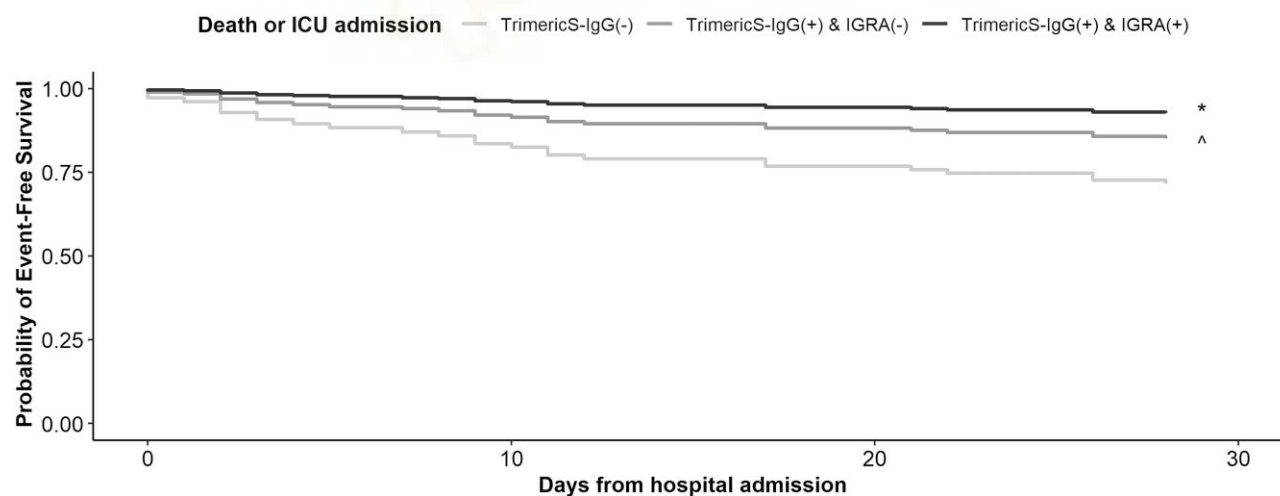


Figure 2. Survival curve of the effect of humoral and cellular immunity on 28-day mortality or intensive care unit (ICU) admission estimated using the Cox proportional hazards regression model. * $P = .004$ for the comparison of [TrimericS-IgG(+) and IGRA(+)] cumulative survival curve with [TrimericS-IgG(-)] curve. ^ $P = .175$ for the comparison of [TrimericS-IgG(+) and IGRA(-)] cumulative survival curve with [TrimericS-IgG(-)] curve. Abbreviations: ICU, intensive care unit; IGRA, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 interferon-gamma release assay; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein.

how these results might apply to future SARS-CoV-2 variants or to new bivalent booster vaccines.

In conclusion, preexisting T-cell immunity against SARS-CoV-2 is strongly associated with disease severity in vaccinated patients with COVID-19 caused by the Delta or Omicron variants. Persons showing both T-cell and antibody responses at hospital admission have reduced hazard of severe outcomes following hospitalization with COVID-19. These findings provide a basis for early identification of persons at risk of severe disease and may have significant implications for closer monitoring and earlier therapeutic interventions in vaccinated patients hospitalized with COVID-19.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copy-edited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Financial support. This work was supported by National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation, European Regional Development Fund (ERDF) and Instituto de Salud Carlos III (RD16/0025/0038, PI16/01740, PI18/01861, CM19/00160, CM20/00066, COV20/00005, and CM21/00186); Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea – NextGenerationEU (CB21/13/00011); and Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital, Generalitat Valenciana (AICO/2021/205).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All 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.

References

1. Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines in ambulatory and inpatient care settings. *N Engl J Med* **2021**; 385:1355–71.
2. Yek C, Warner S, Wiltz JL, et al. Risk factors for severe COVID-19 outcomes among persons aged ≥ 18 years who completed a primary COVID-19 vaccination series—465 health care facilities, United States, December 2020–October 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2022**; 71:19–25.
3. François Watkins LK, Mitruka K, Dorrough L, et al. Characteristics of reported deaths among fully vaccinated persons with coronavirus disease 2019—United States, January–April 2021. *Clin Infect Dis* **2022**; 75:e645–52.
4. Vo AD, La J, Wu JT, et al. Factors associated with severe COVID-19 among vaccinated adults treated in US Veterans Affairs hospitals. *JAMA Netw Open* **2022**; 5:e2240037.
5. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel. *N Engl J Med* **2021**; 385:e85.
6. Andrews N, Tessier E, Stowe J, et al. Duration of protection against mild and severe disease by COVID-19 vaccines. *N Engl J Med* **2022**; 386:340–50.
7. Chemaitelly H, Tang P, Hasan MR, et al. Waning of BNT162b2 vaccine protection against SARS-CoV-2 infection in Qatar. *N Engl J Med* **2021**; 385:e83.
8. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* **2022**; 399:924–44.
9. Kuhlmann C, Mayer CK, Claassen M, et al. Breakthrough infections with SARS-CoV-2 Omicron despite mRNA vaccine booster dose. *Lancet* **2022**; 399:625–6.
10. Dejnirattisai W, Huo J, Zhou D, et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell* **2022**; 185:467–84.
11. Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell* **2022**; 185:447–56.
12. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature* **2022**; 608:593–602.
13. Liu C, Ginn HM, Dejnirattisai W, et al. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell* **2021**; 184:4220–36.e13.
14. Gaebler C, DaSilva J, Bednarski E, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 neutralization after messenger RNA vaccination and variant breakthrough infection. *Open Forum Infect Dis* **2022**; 9:ofac227.
15. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **2021**; 27:1205–11.
16. Zohar T, Loos C, Fischinger S, et al. Compromised humoral functional evolution tracks with SARS-CoV-2 mortality. *Cell* **2020**; 183:1508–19.e12.
17. Harvey RA, Rassen JA, Kabelac CA, et al. Association of SARS-CoV-2 seropositive antibody test with risk of future infection. *JAMA Intern Med* **2021**; 181:672–9.
18. Finch E, Lowe R, Fischinger S, et al. SARS-CoV-2 antibodies protect against reinfection for at least 6 months in a

multicentre seroepidemiological workplace cohort. *PLoS Biol* **2022**; 20:e3001531.

19. Naranbhai V, Nathan A, Kaseke C, et al. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals. *Cell* **2022**; 185:1259.
20. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature* **2022**; 603:488–92.
21. Fernández-González M, Agulló V, Padilla S, et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin Infect Dis* **2022**; 75:e338–46.
22. Murugesan K, Jagannathan P, Altamirano J, et al. Long-term accuracy of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay and its application in household investigation. *Clin Infect Dis* **2022**; 75:e314–21.
23. Vogrig M, Berger AE, Bourlet T, et al. Monitoring of both humoral and cellular immunities could early predict COVID-19 vaccine efficacy against the different SARS-CoV-2 variants. *J Clin Immunol* **2023**; 43:31–45.
24. Barreiro P, Sanz JC, San Román J, et al. A pilot study for the evaluation of an interferon gamma release assay (IGRA) to measure T-cell immune responses after SARS-CoV-2 infection or vaccination in a unique cloistered cohort. *J Clin Microbiol* **2022**; 60:e0219921.
25. Ham JY, Lee NY, Hwang N, Song KE. Diagnostic performance of interferon gamma release assay (IGRA) for cell-mediated immune responses to SARS-CoV-2. *Clin Lab* **2023**; 69:220643.
26. Fonseca Brito L, Tödter S, Kottlau J, et al. Performance of an interferon- γ release assay-based test for cell-mediated immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol* **2023**; 14:1069968.
27. Guillén L, Padilla S, Fernández M, et al. Preemptive interleukin-6 blockade in patients with COVID-19. *Sci Rep* **2020**; 10:16826.
28. Padilla S, Polotskaya K, Fernández M, et al. Survival benefit of remdesivir in hospitalized COVID-19 patients with high SARS-CoV-2 viral loads and low-grade systemic inflammation. *J Antimicrob Chemother* **2022**; 77:2257–64.
29. Masiá M, Fernández-González M, García JA, et al. Robust long-term immunity to SARS-CoV-2 in patients recovered from severe COVID-19 after interleukin-6 blockade. *EBioMedicine* **2022**; 82:104153.
30. García-Abellán J, Padilla S, Fernández-González M, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 is associated with long-term clinical outcome in patients with COVID-19: a longitudinal study. *J Clin Immunol* **2021**; 41:1490–501.
31. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **2021**; 27:2032–40.
32. Nyberg T, Ferguson NM, Nash SG, et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. *Lancet* **2022**; 399:1303–12.
33. Veneti L, Bøås H, Bråthen Kristoffersen A, et al. Reduced risk of hospitalisation among reported COVID 19 cases infected with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant compared with the Delta variant, Norway, December 2021 to January 2022. *Euro Surveill* **2022**; 27:2200077.
34. Bager P, Wohlfahrt J, Bhatt S, et al. Risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 Omicron variant versus Delta variant in Denmark: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:967–76.
35. Sheikh A, Kerr S, Woolhouse M, et al. Severity of Omicron variant of concern and effectiveness of vaccine boosters against symptomatic disease in Scotland (EAVE II): a national cohort study with nested test negative design. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:959–66.
36. Riou C, Keeton R, Moyo-Gwete T, et al. Escape from recognition of SARS-CoV-2 variant spike epitopes but overall preservation of T cell immunity. *Sci Transl Med* **2022**; 14:eabj6824.
37. Tarke A, Sidney J, Methot N, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4⁺ and CD8⁺ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med* **2021**; 2:100355.
38. Grifoni A, Sidney J, Vita R, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe* **2021**; 29:1076–92.
39. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* **2020**; 183:996–1012.e19.
40. Brasu N, Elia I, Russo V, et al. Memory CD8⁺ T cell diversity and B cell responses correlate with protection against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination. *Nat Immunol* **2022**; 23:1445–56.
41. Lochmanová A, Martinek J, Tomášková H, et al. Comparison of two commercially available interferon- γ release assays for T-cell-mediated immunity and evaluation of humoral immunity against SARS-CoV-2 in healthcare workers. *Diagnostics* **2023**; 13:637.
42. Johnson SA, Phillips E, Adele S, et al. Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 interferon- γ release assay

following SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Clin Exp Immunol* **2023**; 212:249–61.

43. Domingo P, Mur I, Pomar V, Corominas H, Casademont J, de Benito N. The four horsemen of a viral apocalypse: the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *EBioMedicine* **2020**; 58:102887.
44. Ward JD, Cornaby C, Schmitz JL. Indeterminate QuantiFERON Gold Plus results reveal deficient interferon gamma responses in severely ill COVID-19 patients. *J Clin Microbiol* **2021**; 59:e0081121.
45. Alessio G, Imeneo A, Di Lorenzo A, et al. Longitudinal evaluation of the QuantiFERON-TB Gold Plus assay in hospitalized COVID-19 patients with a first indeterminate result: resolution of inflammation and restoration of T-lymphocyte counts and interferon-gamma production. *Microbiol Spectr* **2022**; 10:e0185822.



Supplementary Material

T-cell immunity against SARS-CoV-2 measured by an interferon- γ release assay is strongly associated with patient outcomes in vaccinated persons hospitalized with Delta or Omicron variants

Table of contents

Supplemental Table S-1	2
Supplemental Table S-2	4
Supplemental Table S-3	6
Supplemental Table S-4	8
Supplemental Table S-5	10
Supplemental Table S-6	12
Supplemental Table S-7	13
Supplemental Table S-8	14
Supplemental Table S-9	15
Supplemental Table S-10	16
Supplemental Table S-11	17
Supplemental Table S-12	18
Figure S-1	19

Table S-1. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19.

Characteristic	All
n (%)	181
Sex, male	102 (56.4)
Age, median (IQR), y	74 (55-83)
White, non Hispanic	162 (89.5)
Charlson comorbidity index, median (IQR)	4 (1-7)
Number of comorbidities,* median (IQR)	2 (1-3)
Diabetes	51 (28.2)
Congestive heart failure	22 (12.2)
Coronary artery disease	20 (11)
Prior stroke	16 (8.8)
Peripheral arterial disease	13 (7.2)
Pulmonary disease	38 (21)
Chronic kidney disease	36 (19.9)
Malignant neoplasm	29 (16.0)
Immunosuppressive condition:	30 (16.6)
Active hematologic malignancy	12 (6.6)
Receiving immunosuppression	8 (4.4)
Active chemotherapy	6 (3.3)
Solid or bone marrow transplant	3 (1.7)
HIV	1 (0.6)
Prior COVID-19 infection	9 (5.0)
Vaccination status	
Type of vaccine:	
BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	125 (69.1)
mRNA-1273 (Moderna)	23 (12.7)
AZD1222 (Oxford-AstraZeneca)	13 (7.2)
Ad26.COV2.S (Janssen-Johnson & Johnson)	20 (11)
Days since last vaccine dose, median (IQR)	110 (67-178)
Receipt of booster dose [#]	78 (43.1)
Clinical presentation	
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	5 (3-7)
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	350 (309-457)
WHO severity score, median (IQR)	4 (3-4)
Bilateral lung infiltrates on X Ray	77 (42.5)
Microbiological data	
SARS-CoV-2 variant, Omicron	103 (56.9)
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	22 (18-27)
Sampling time from admission, median (IQR), days	1 (1-1)
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	1710 (266-5670)
TrimericS-IgG, Positive	158 (87.3)
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	136 (75.1)
N-IgG, Positive	23 (12.7)
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	221 (33-635)
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	92 (50.8)
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, ^{&} Positive	51 (28.2)
First available laboratory values, median (IQR)	
Interleukin-6, pg/mL	42 (12-139)
C-reactive protein, mg/L	52 (23-98)
D-dimer, µg/mL	0.8 (0.4-1.4)
Ferritin, ng/mL	221 (99-487)

Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	699 (487-999)
B-cell count, cells/ μ L	54 (25-117)
T-cell count, cells/ μ L	455 (304-703)
CD4 T-cell count, cells/ μ L	249 (154-376)
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.5 (0.98-2.29)
Antiviral and immunomodulatory therapy	
Remdesivir	144 (79.6)
Monoclonal antibodies	5 (2.8)
Tocilizumab or baricitinib	118 (65.2)
Dexamethasone or methylprednisolone [^]	172 (95%)
Outcomes	
Hospital stay, median (IQR), days	5 (3-8)
In hospital death	13 (7.2)
28-day mortality or ICU admission	25 (13.8)
28-day mortality	17 (9.4)
60-day mortality	27 (14.9)
90-day mortality	28 (15.5)

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. # Completed primary vaccination plus a booster dose. & A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] ≥ 400 mIU/mL. ^ In most cases (146/172, 84.9%) it was given at hospital admission with a median (IQR) of 1 (1-1) day before IGRA testing. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S-2. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19 according to the presence of SARS-CoV-2 humoral response at hospital admission.

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 TrimericS-IgG	Positive SARS-CoV-2 TrimericS-IgG	All	P Value
n (%)	23 (12.7)	158 (87.3)	181	
Sex, male	14 (60.9)	88 (55.7)	102 (56.4)	0.822
Age, median (IQR), y	63 (54-82)	74 (55-84)	74 (55-83)	0.346
Charlson comorbidity index, median (IQR)	4 (2-6.5)	4 (1-7)	4 (1-7)	0.899
Number of comorbidities,* median (IQR)	2 (1-4)	2 (0-3)	2 (1-3)	0.234
Diabetes	8 (34.8)	43 (27.2)	51 (28.2)	0.463
Congestive heart failure	4 (17.4)	18 (11.4)	22 (12.2)	0.491
Coronary artery disease	3 (13)	17 (10.8)	20 (11)	0.724
Prior stroke	1 (4.3)	15 (9.5)	16 (8.8)	0.698
Peripheral arterial disease	1 (4.3)	12 (7.6)	13 (7.2)	1.000
Pulmonary disease	6 (26.1)	32 (20.3)	38 (21)	0.584
Chronic kidney disease	8 (34.8)	28 (17.7)	36 (19.9)	0.089
Malignant neoplasm	5 (21.7)	24 (15.2)	29 (16)	0.379
Immunosuppressive condition [‡]	10 (43.5)	20 (12.7)	30 (16.6)	0.001
Prior COVID-19 infection	0 (0)	9 (5.7)	9 (5)	0.606
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	95 (73-112)	116 (67-181)	110 (67-178)	0.251
Receipt of booster dose [#]	11 (47.8)	67 (42.4)	78 (43.1)	0.657
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	5 (4-7)	4.5 (2-7)	5 (3-7)	0.699
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (279-452)	350 (314-457)	350 (309-457)	0.598
WHO severity score	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.270
Bilateral lung infiltrates on X Ray	12 (52.2)	65 (41.1)	77 (42.5)	0.494
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	12 (52.2)	91 (57.6)	103 (56.9)	0.657
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	18 (16-25)	22 (18-28)	22 (18-27)	0.023
Sampling time from admission, median (IQR), days	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.544
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	4.8 (4.8-14)	1920 (733-6325)	1710 (266-5670)	<0.001
TrimericS-IgG, Positive	0 (0)	158 (100)	158 (87.3)	
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	0 (0)	136 (86.1)	136 (75.1)	<0.001
N-IgG, Positive	0 (0)	23 (14.6)	23 (12.7)	0.049
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	27 (6-174)	265 (45-704)	221 (33-635)	0.005
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	5 (21.7)	87 (55.1)	92 (50.8)	<0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, ^{&} Positive	3 (13)	48 (30.4)	51 (28.2)	0.003
First available laboratory values, median (IQR)				
Interleukin-6, pg/mL	41 (11-143)	43 (12-138)	42 (12-139)	0.696
C-reactive protein, mg/L	33 (21-68)	55 (24-100)	52 (23-98)	0.296
D-dimer, µg/mL	0.8 (0.5-1.4)	0.7 (0.4-1.4)	0.8 (0.4-1.4)	0.794
Ferritin, ng/mL	182 (85-532)	223 (100-474)	221 (99-487)	0.976

Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	483 (333-874)	748 (516-998)	699 (487-999)	0.012
B-cell count, cells/ μ L	18 (5-52)	59 (29-118)	54 (25-117)	<0.001
T-cell count, cells/ μ L	331 (206-499)	467 (326-711)	455 (304-703)	0.029
CD4 T-cell count, cells/ μ L	164 (75-293)	262 (160-387)	249 (154-376)	0.005
CD8 T-cell percentage, %	29.2 (22.3-41.4)	22.8 (16.8-31.9)	23.4 (17.2-33.5)	0.012
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.0 (0.62-1.54)	1.6 (1.02-2.36)	1.5 (0.98-2.29)	0.002
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	20 (87)	124 (78.5)	144 (79.6)	0.421
Monoclonal antibodies	4 (17.4)	1 (0.6)	5 (2.8)	0.001
Tocilizumab or Baricitinib	15 (65.2)	103 (65.2)	118 (65.2)	1.000
Outcomes				
Hospital stay, median (IQR), days	7 (4-10)	5 (3-8)	5 (3-8)	0.075
In hospital death	3 (13)	10 (6.3)	13 (7.2)	0.218
28-day mortality or ICU admission	6 (26.1)	19 (12.0)	25 (13.8)	0.099
28-day mortality	3 (13)	14 (8.9)	17 (9.4)	0.458
60-day mortality	4 (17.4)	23 (14.6)	27 (14.9)	0.754
90-day mortality	4 (17.4)	24 (15.2)	28 (15.5)	0.761

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [£] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

[#] Completed primary vaccination plus a booster dose. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S-3. Characteristics of persons admitted to hospital with the Omicron variant, according to the presence of SARS-CoV-2 cellular response at hospital admission.

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA	All	P Value
n (%)	51 (49.5)	52 (50.5)	103	
Sex, male	25 (49)	30 (57.7)	55 (53.4)	0.432
Age, median (IQR), y	82 (62-86)	76 (57-85)	79 (59-85)	0.100
Charlson comorbidity index, median (IQR)	5 (3-7)	5 (1-8)	5 (2-7)	0.963
Number of comorbidities,* median (IQR)	2 (1-4)	3 (1-4)	3 (1-4)	0.438
Diabetes	13 (25.5)	18 (34.6)	31 (30.1)	0.391
Congestive heart failure	8 (15.7)	10 (19.2)	18 (17.5)	0.796
Coronary artery disease	6 (11.8)	8 (15.4)	14 (13.6)	0.775
Prior stroke	4 (7.8)	8 (15.4)	12 (11.7)	0.358
Peripheral arterial disease	3 (5.9)	6 (11.5)	9 (8.7)	0.488
Pulmonary disease	15 (29.4)	13 (25)	28 (27.2)	0.662
Chronic kidney disease	12 (23.5)	10 (19.2)	22 (21.4)	0.637
Malignant neoplasm	10 (19.6)	10 (19.2)	20 (19.4)	1.000
Immunosuppressive condition [‡]	11 (21.6)	11 (21.2)	22 (21.4)	1.000
Prior COVID-19 infection	1 (2.0)	5 (9.6)	6 (5.8)	0.205
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	104 (73-188)	85 (58-158)	95 (67-177)	0.113
Receipt of booster dose [#]	33 (64.7)	33 (63.5)	66 (64.1)	1.000
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	3 (2-6)	4 (2-7)	4 (2-7)	0.413
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (281-389)	354 (343-462)	350 (306-455)	0.005
WHO severity score	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0.024
Bilateral lung infiltrates on X Ray	20 (39.2)	19 (36.5)	39 (37.9)	0.784
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	51 (100)	52 (100)	103 (100)	0.657
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	20 (17-26)	21 (18-28)	20 (17-27)	0.312
Sampling time from admission, median (IQR), days	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.618
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	1260 (63-2955)	1820 (833-5078)	1610 (380-4280)	0.017
TrimericS-IgG, Positive	41 (80.4)	50 (96.2)	91 (88.3)	0.015
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	35 (68.6)	47 (90.4)	82 (79.6)	0.007
N-IgG, Positive	4 (7.8)	7 (13.5)	11 (10.7)	0.526
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	14 (0.5-66)	623 (338-1185)	209 (14-623)	<0.001
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0 (0)	52 (100)	52 (50.5)	
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, [‡] Positive	12 (23.5)	22 (42.3)	34 (33.0)	0.059
First available laboratory values, median (IQR)				
Interleukin-6, pg/mL	33 (6-130)	34 (10-138)	33 (7-139)	0.864
C-reactive protein, mg/L	35 (17-105)	42 (20-76)	38 (18-94)	0.901
D-dimer, µg/mL	1 (0.4-2.3)	0.8 (0.5-1.3)	0.9 (0.5-1.9)	0.470
Ferritin, ng/mL	173 (82-531)	126 (66-280)	149 (73-441)	0.182

Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	644 (473-946)	720 (510-981)	697 (486-962)	0.461
B-cell count, cells/ μ L	39 (17-76)	63 (25-143)	52 (23-117)	0.033
T-cell count, cells/ μ L	442 (304-559)	458 (346-711)	447 (318-632)	0.356
CD4 T-cell count, cells/ μ L	236 (155-366)	239 (177-374)	236 (158-371)	0.605
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.6 (0.99-2.38)	1.7 (1.19-2.29)	1.7 (1.08-2.35)	0.657
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	41 (80.4)	41 (78.8)	82 (79.6)	1.000
Monoclonal antibodies	4 (7.8)	0 (0)	4 (3.9)	0.057
Tocilizumab or Baricitinib	27 (52.9)	30 (57.7)	57 (55.3)	0.694
Outcomes				
Hospital stay, median (IQR), days	6 (4-10)	5 (3-7)	6 (3-8)	0.325
In hospital death	7 (13.7)	0 (0.0)	7 (6.8)	0.006
28-day mortality or ICU admission	9 (17.6)	2 (3.8)	11 (10.7)	0.028
28-day mortality	8 (15.7)	2 (3.8)	10 (9.7)	0.052
60-day mortality	12 (23.5)	6 (11.5)	18 (17.5)	0.126
90-day mortality	13 (25.5)	6 (11.5)	19 (18.4)	0.080

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

[#] Completed primary vaccination plus a booster dose. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S-4. Characteristics of persons admitted to hospital with COVID-19 according to the presence or absence of SARS-CoV-2 specific and unspecific cellular responses at hospital admission.

Characteristic	Negative SARS-CoV-2 IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA & Positive Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA	All	P Value
n (%)	89 (70.1)	38 (29.9)	127	
Sex, male	53 (59.6)	19 (50)	72 (56.7)	0.335
Age, median (IQR), y	78 (60-85)	64 (51-80)	75 (58-84)	0.013
Charlson comorbidity index, median (IQR)	5 (2-7)	4 (1-8)	5 (2-7)	0.294
Number of comorbidities, * median (IQR)	2 (1-4)	2 (0-4)	2 (1-4)	0.608
Diabetes	26 (29.2)	11 (28.9)	37 (29.1)	1.000
Congestive heart failure	10 (11.2)	5 (13.2)	15 (11.8)	0.769
Coronary artery disease	11 (12.4)	5 (13.2)	16 (12.6)	1.000
Prior stroke	7 (7.9)	4 (10.5)	11 (8.7)	0.732
Peripheral arterial disease	6 (6.7)	2 (5.3)	8 (6.3)	1.000
Pulmonary disease	20 (22.5)	6 (15.8)	26 (20.5)	0.477
Chronic kidney disease	22 (24.7)	4 (10.5)	26 (20.5)	0.093
Malignant neoplasm	14 (15.7)	5 (13.2)	19 (15.0)	0.792
Immunosuppressive condition ^f	14 (15.7)	6 (15.8)	20 (15.7)	1.000
Prior COVID-19 infection	4 (4.5)	1 (2.6)	5 (3.9)	1.000
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	112 (73-184)	85 (58-158)	95 (67-177)	0.113
Receipt of booster dose ^g	39 (43.8)	15 (39.5)	54 (42.5)	0.698
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	4.5 (2-7)	5 (2-7)	5 (2-7)	0.913
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (283-354)	452 (350-462)	346 (305-452)	<0.001
WHO severity score	4 (4-4)	3 (3-4)	4 (3-4)	0.001
Bilateral lung infiltrates on X Ray	38 (42.7)	14 (36.8)	52 (40.9)	0.475
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	51 (57.3)	22 (57.9)	73 (57.5)	1.000
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	22 (17-28)	22 (18-26)	22 (17-27)	0.467
Sampling time from admission, median (IQR), days	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.621
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	1600 (63-4970)	2045 (669-5458)	1690 (194-5215)	0.089
TrimericS-IgG, Positive	71 (79.8)	37 (97.4)	108 (85)	0.013
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	59 (66.3)	33 (86.8)	92 (72.4)	0.018
N-IgG, Positive	10 (11.2)	3 (7.9)	13 (10.2)	0.753
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	30 (0.5-96)	1410 (578-2469)	67 (11-356)	<0.001
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0 (0)	38 (100)	38 (29.9)	<0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, ^h Positive	13 (14.6)	38 (100)	51 (40.2)	<0.001
First available laboratory values, median (IQR)				
Interleukin-6, pg/mL	44 (9-141)	49 (17-180)	45 (12-159)	0.318
C-reactive protein, mg/L	50 (23-104)	8 (24-74)	50 (23-98)	0.427
D-dimer, µg/mL	0.8 (0.5-2.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.7 (0.4-1.7)	0.037

Ferritin, ng/mL	371 (113-539)	182 (98-307)	227 (100-489)	0.017
Peripheral lymphocyte count, cells/ μ L	644 (458-926)	804 (596-1445)	690 (486-996)	0.009
B-cell count, cells/ μ L	48 (22-87)	74 (38-145)	54 (23-108)	0.021
T-cell count, cells/ μ L	410 (294-559)	631 (412-1039)	454 (302-720)	0.004
CD4 T-cell count, cells/ μ L	226 (123-359)	370 (178-529)	249 (151-381)	0.003
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.4 (0.8-2.3)	2.0 (1.3-2.6)	1.6 (1.0-2.3)	0.068
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	73 (82.0)	32 (84.2)	105 (82.7)	1.000
Monoclonal antibodies	4 (4.5)	1 (2.6)	5 (3.9)	1.000
Tocilizumab or Baricitinib	57 (64.0)	26 (68.4)	83 (65.4)	0.688
Outcomes				
Hospital stay, median (IQR), days	6 (4-9)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.090
In hospital death	12 (13.5)	0 (0.0)	12 (9.4)	0.018
28-day mortality or ICU admission	20 (22.5)	2 (5.3)	22 (17.3)	0.021
28-day mortality	14 (15.7)	1 (2.6)	15 (11.8)	0.038
60-day mortality	19 (21.3)	4 (10.5)	23 (18.1)	0.209
90-day mortality	20 (22.5)	4 (10.5)	24 (18.9)	0.142

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

[#] Completed primary vaccination plus a booster dose. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S-5. Characteristics of persons with positive SARS-CoV-2 TrimericS-IgG according to the presence of SARS-CoV-2 specific and unspecific cellular responses at hospital admission.

Characteristic	Positive SARS-CoV-2 TrimericS-IgG		All	P Value
	Negative IGRA	Positive SARS-CoV-2 IGRA & Positive Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA		
n (%)	71 (65.7)	37 (34.3)	108	
Sex, male	41 (57.7)	19 (51.4)	60 (55.6)	0.547
Age, median (IQR), y	78 (62-86)	65 (51-80)	76 (58-85)	0.013
Charlson comorbidity index, median (IQR)	5 (2-8)	4 (1-8)	5 (2-8)	0.344
Number of comorbidities,* median (IQR)	2 (1-4)	2 (0-4)	2 (1-4)	0.992
Diabetes	18 (25.4)	11 (29.7)	29 (26.9)	0.652
Congestive heart failure	7 (9.9)	5 (13.5)	12 (11.1)	0.624
Coronary artery disease	9 (12.7)	8 (9.2)	17 (10.8)	0.607
Prior stroke	6 (8.5)	4 (10.8)	10 (9.3)	1.000
Peripheral arterial disease	5 (7)	2 (5.4)	7 (6.5)	1.000
Pulmonary disease	15 (21.1)	6 (16.2)	21 (19.4)	0.616
Chronic kidney disease	15 (21.1)	4 (10.8)	19 (17.6)	0.286
Malignant neoplasm	12 (16.9)	5 (13.5)	17 (15.7)	0.784
Immunosuppressive condition [‡]	7 (9.9)	6 (16.2)	13 (12)	0.362
Prior COVID-19 infection	4 (5.6)	1 (2.7)	5 (4.6)	0.659
Vaccination status				
Days since last vaccine dose, median (IQR)	120 (70-195)	86 (59-158)	118 (67-181)	0.184
Receipt of booster dose [§]	31 (43.7)	14 (37.8)	45 (41.7)	0.681
Clinical presentation				
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	4 (2-7)	5 (2-7)	4 (2-7)	0.845
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission, median (IQR)	343 (291-354)	452 (350-462)	350 (309-452)	<0.001
WHO severity score	4 (4-4)	3 (3-4)	4 (3-4)	0.001
Bilateral lung infiltrates on X Ray	28 (39.4)	14 (37.8)	42 (38.9)	0.490
Microbiological data				
SARS-CoV-2 variant, Omicron	41 (57.7)	22 (59.5)	63 (58.3)	1.000
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	22 (18-29)	23 (18-26)	22 (18-28)	0.919
Sampling time from admission, median (IQR), days	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0.453
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	1930 (604-6230)	2270 (840-5690)	1985 (623-6190)	0.851
TrimericS-IgG, Positive	71 (100)	37 (100)	108 (100)	
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	59 (83.1)	33 (89.2)	92 (85.2)	0.570
N-IgG, Positive	10 (14.1)	3 (8.1)	13 (12.0)	0.536
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	42 (0.5-89)	1353 (575-2375)	111 (17-578)	<0.001
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0 (0)	37 (100)	37 (34.3)	
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, [‡] Positive	11 (15.5)	37 (100)	48 (44.4)	<0.001
First available laboratory values, median (IQR)				
Interleukin-6, pg/mL	45 (10-127)	51 (17-182)	45 (14-163)	0.352
C-reactive protein, mg/L	60 (25-107)	43 (23-73)	54 (24-99)	0.252

D-dimer, $\mu\text{g/mL}$	0.8 (0.5-2.1)	0.6 (0.4-1.0)	0.7 (0.4-1.6)	0.066
Ferritin, ng/mL	371 (118-531)	182 (98-320)	225 (100-487)	0.022
Peripheral lymphocyte count, cells/ μL	694 (502-961)	803 (595-1403)	742 (534-999)	0.088
B-cell count, cells/ μL	50 (26-97)	76 (42-152)	59 (28-117)	0.047
T-cell count, cells/ μL	452 (304-586)	606 (397-948)	468 (312-738)	0.027
CD4 T-cell count, cells/ μL	240 (155-371)	370 (178-507)	288 (161-389)	0.044
CD4/CD8 lymphocyte ratio	1.7 (1.0-2.4)	2.0 (1.3-2.4)	1.7 (1.1-2.4)	0.462
Antiviral and immunomodulatory therapy				
Remdesivir	57 (80.3)	31 (83.8)	88 (81.5)	0.796
Monoclonal antibodies	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.9)	1.000
Tocilizumab or Baricitinib	45 (63.4)	25 (67.6)	70 (64.8)	0.832
Outcomes				
Hospital stay, median (IQR), days	6 (3-8)	4 (3-7)	5 (3-8)	0.302
In hospital death	9 (12.7)	0 (0.0)	9 (8.3)	0.026
28-day mortality or ICU admission	14 (19.7)	2 (5.4)	16 (14.8)	0.051
28-day mortality	11 (15.5)	1 (2.7)	12 (11.1)	0.055
60-day mortality	15 (21.1)	4 (10.8)	19 (17.6)	0.286
90-day mortality	16 (22.5)	4 (10.8)	20 (18.5)	0.193

* This category included the following underlying medical conditions: diabetes mellitus, chronic cardiac disease, chronic kidney disease, chronic liver disease, chronic neurologic disease, chronic pulmonary disease, malignancies, and immunosuppressive conditions. [‡] This category included HIV, solid or bone marrow transplant, active hematologic malignancy, receiving immunosuppression, or active chemotherapy.

[#] Completed primary vaccination plus a booster dose. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] ≥ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; y, years old; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; BAU, Binding Antibody Units; ICU, intensive care unit.

Table S-6. SARS-CoV-2 cellular response according to 28-day mortality or ICU admission in persons admitted to hospital with COVID-19.

Characteristic	Non-28-day death or ICU admission	28-day death or ICU admission	All	P Value
n (%)	N=156 (86.2)	N=25 (13.8)	N=181	
SARS-CoV-2 IGRA,				
Positive [#]	87 (55.8)	5 (20)	92 (50.8)	0.002
Borderline	18 (11.5)	4 (16)	22 (12.2)	
Negative	51 (32.7)	16 (64)	67 (37)	
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	268 (44-713)	45 (4-145)	221 (33-635)	0.001
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, Positive ^{&}	49 (31.4)	2 (8)	51 (28.2)	0.026
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, (IQR), mIU/mL	115 (21-601)	14 (0-52)	77 (14-479)	<0.001
[#] Positive SARS-CoV-2 IGRA	N=87 (94.6)	N=5 (5.4)	N=92	
Positive Mitogen-IGRA				
n (%)	36 (41.4)	2 (40)	38 (41.3)	
IGRA, median (IQR), mIU/mL	1410 (585-2500)	1444 (1004-1884)	1410 (578-2469)	0.844
Mitogen-IGRA, median (IQR), mIU/mL	1745 (765-2500)	1674 (1236-2112)	1745 (777-2500)	0.948
Indeterminate Mitogen-IGRA				
n (%)	51 (58.6)	3 (60)	54 (58.7)	
IGRA, median (IQR), mIU/mL	467 (309-807)	449 (355-659)	458 (309-837)	0.806
Mitogen-IGRA, median (IQR), mIU/mL	71 (24-179)	15 (7-34)	65 (21-168)	0.108

[#] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [SARS-CoV-2] – IFN- γ [blank] >200 mIU/mL. [&] A positive result was defined according to the manufacturer as: IFN- γ [mitogen] – IFN- γ [blank] $\geq$ 400 mIU/mL. Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated. IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; IQR, interquartile range; ICU, intensive care unit.

Table S-7. Correlation of biomarkers with antibody and T-cell immune responses in persons admitted to hospital with COVID-19.

Variable	SARS-CoV-2 IGRA		Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA		TrimericS-IgG	
	Correlation Coefficient (95% CI) *	<i>P</i>	Correlation Coefficient (95% CI) *	<i>P</i>	Correlation Coefficient (95% CI) *	<i>P</i>
Interleukin-6	-0.090 (-0.212, 0.035)	0.159	-0.026 (-0.150, 0.100)	0.689	-0.009 (-0.133, 0.116)	0.892
C-reactive protein	-0.112 (-0.233, 0.013)	0.079	-0.068 (-0.191, 0.057)	0.287	0.067 (-0.058, 0.190)	0.293
D-dimer	-0.107 (-0.229, 0.018)	0.093	-0.080 (-0.203, 0.045)	0.211	0.000 (-0.125, 0.124)	0.998
Ferritin	-0.100 (-0.223, 0.026)	0.120	-0.138 (-0.259, -0.012)	0.032	0.120 (-0.006, 0.242)	0.061
Lymphocyte count	0.097 (-0.028, 0.220)	0.127	0.160 (0.035-0.279)	0.012	0.085 (-0.041, 0.207)	0.185

* Pearson's correlation coefficient. TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay; CI confidence interval.



Table S-8. Unadjusted associations with 28-day mortality or ICU admission in persons admitted to hospital with COVID-19.

Characteristic	Unadjusted HR (95% CI)	P Value
Female sex	1.03 (0.47-2.26)	0.947
Age, median (IQR), y	1.04 (1.01-1.07)	0.003
Charlson comorbidity index, median (IQR)	1.24 (1.11-1.39)	<0.001
Number of comorbidities, median (IQR)	1.60 (1.22-2.11)	<0.001
Prior COVID-19 infection	0.00 (0.00-∞)	0.997
Vaccination status		
Days since last vaccine dose, median (IQR)	1.00 (1.00-1.00)	0.739
Receipt of booster dose [#]	0.80 (0.36-1.75)	0.570
Clinical presentation		
Days from symptom onset to admission, median (IQR)	0.92 (0.49-1.72)	0.790
SpO2/FiO2 ratio at admission, median (IQR)	2.80 (1.92-4.08)	<0.001
WHO severity score, median (IQR)	11.1 (5.8-21.2)	<0.001
Bilateral lung infiltrates on X Ray	0.39 (0.09-1.66)	0.200
Microbiological data		
SARS-CoV-2 variant, Omicron	0.55 (0.25-1.20)	0.140
Lowest cycle threshold PCR detected, median (IQR)	0.96 (0.90-1.02)	0.232
TrimericS-IgG, median (IQR), BAU/mL	1.00 (1.00-1.00)	0.057
TrimericS-IgG, Positive	0.42 (0.17-1.04)	0.061
TrimericS-IgG >264 BAU/mL	0.66 (0.29-1.54)	0.338
N-IgG, Positive	1.78 (0.67-4.74)	0.250
SARS-CoV-2 IGRA, median (IQR), mIU/mL	1.00 (1.00-1.00)	0.040
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0.22 (0.08-0.58)	0.003
Mitogen-SARS-CoV-2 IGRA, ^{&} Positive	0.21 (0.05-0.88)	0.033
First available laboratory values, median (IQR)		
Interleukin-6, pg/mL	1.21 (1.08-1.36)	0.001
C-reactive protein, mg/L	1.96 (1.27-3.01)	0.002
D-dimer, µg/mL	1.71 (0.92-3.19)	0.089
Ferritin, ng/mL	1.11 (1.07-1.15)	<0.001
Peripheral lymphocyte count, cells/µL	1.00 (0.96-1.05)	0.900
B-cell count, cells/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.910
T-cell count, cells/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.632
CD4 T-cell count, cells/µL	1.00 (1.00-1.00)	0.500
CD4/CD8 lymphocyte ratio	0.88 (0.63-1.22)	0.432
Antiviral and immunomodulatory therapy		
Remdesivir	0.41 (0.18-0.94)	0.034
Monoclonal antibodies	1.54 (0.21-11.11)	0.675
Tocilizumab or baricitinib	0.66 (0.30-1.45)	0.295

*Estimates were obtained from fitting unadjusted Cox-proportional hazards regression. Hazard ratio for ordinal and quantitative variables were expressed as follows: age (per year increase), Charlson comorbidity index (per unit increase), number of comorbidities (per unit increase), SpO2/FiO2 ratio (per 100 units decrease), WHO severity score (per unit increase), TrimericS-IgG (cut-off for positivity ≥ 33.8 BAU/mL), IGRA (cut-off for positivity >200 mIU/mL), interleukin-6 (per 1 log₁₀ pg/mL increase), C-reactive protein (per 100 mg/L increase), D-dimer (per 10 µg/mL increase), ferritin (per 100 ng/mL increase), and peripheral lymphocyte count (per 100 cells/µL increase). HR, hazard ratio; CI, confidence interval; SpO2/FiO2 ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay.

Table S-9. Adjusted associations with 28-, 60- and 90-day mortality in persons admitted to hospital with COVID-19.*

Characteristic	Overall mortality at 28 days		Overall mortality at 60 days		Overall mortality at 90 days	
	aHR (95% CI)	P value	aHR (95% CI)	P value	aHR (95% CI)	P value
N=181						
Age, years	1.00 (0.95-1.06)	0.887	1.03 (0.98-1.08)	0.205	1.03 (0.98-1.08)	0.256
Female sex	1.67 (0.57-4.96)	0.352	1.01 (0.44-2.32)	0.974	1.10 (0.49-2.47)	0.822
Charlson comorbidity index	1.53 (1.22-1.92)	<0.001*	1.34 (1.13-1.59)	<0.001*	1.36 (1.15-1.61)	<0.001*
SpO ₂ /FiO ₂ ratio at admission	3.28 (1.82-5.90)	<0.001*	2.08 (1.28-3.36)	0.003*	2.08 (1.30-3.34)	0.002*
SARS-CoV-2 variant, Omicron	0.78 (0.27-2.23)	0.642	0.85 (0.36-1.99)	0.707	0.90 (0.39-2.09)	0.803
TrimericS-IgG, Positive	0.37 (0.08-1.68)	0.199	0.66 (0.21-2.06)	0.477	0.68 (0.22-2.10)	0.500
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0.22 (0.06-0.86)	0.030*	0.43 (0.17-1.07)	0.069	0.38 (0.15-0.93)	0.034*
Remdesivir	0.50 (0.17-1.45)	0.199	0.56 (0.24-1.30)	0.177	0.50 (0.22-1.13)	0.093
Peripheral lymphocyte count	1.03 (0.98-1.08)	0.222	1.01 (0.97-1.05)	0.693	1.01 (0.97-1.05)	0.680

*Estimates were obtained from fitting multivariable Cox-proportional hazards regression models with multivariable adjustment. Adjustment was made for age (per year increase), sex, Charlson comorbidity index (per unit increase), SpO₂/FiO₂ ratio (per 100 units decrease), SARS-CoV-2 variant, TrimericS-IgG (cut-off for positivity ≥ 33.8 BAU/mL), IGRA (cut-off for positivity >200 mIU/mL), remdesivir use and peripheral lymphocyte count (per 100 cells/ μ L increase). aHR, adjusted hazard ratio; CI, confidence interval; SpO₂/FiO₂ ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay.



Table S-10. Adjusted associations with 28-day mortality or ICU admission in persons admitted to hospital with COVID-19.*

Characteristic	Adjusted HR (95% CI)	<i>P Value</i>
Age, years	0.98 (0.93-1.02)	0.247
Female sex	1.32 (0.51-3.37)	0.565
Charlson comorbidity index	1.23 (1.03-1.47)	0.021
SpO2/FiO2	2.37 (1.40-4.03)	0.001
SARS-Cov-2 variant, Omicron	0.51 (2.15-1.21)	0.126
TrimericS-IgG, Positive	0.19 (0.06-0.60)	0.005
SARS-CoV-2 IGRA, Positive	0.27 (0.08-0.89)	0.032
Remdesivir	0.45 (0.15-1.38)	0.165
Peripheral lymphocyte count	1.05 (0.99-1.10)	0.068
Interleukin-6	3.26 (1.51-7.04)	0.003
C-reactive protein	1.23 (0.66-2.31)	0.520
D-dimer	1.23 (0.66-4.52)	0.755
Ferritin	1.08 (1.03-1.14)	0.002

*Estimates were obtained from fitting multivariable Cox-proportional hazards regression models with multivariable adjustment. Adjustment was made for age (per year increase), sex, Charlson comorbidity index (per unit increase), SpO2/FiO2 ratio (per 100 units decrease), SARS-CoV-2 variant, TrimericS-IgG (cut-off for positivity ≥ 33.8 BAU/mL), IGRA (cut-off for positivity >200 mIU/mL), remdesivir use, peripheral lymphocyte count (per 100 cells/ μ L increase), interleukin-6 (per 1 $\log_{10}$ pg/mL increase), C-reactive protein (per 100 mg/L increase), D-dimer (per 10 μ g/mL increase), and ferritin (per 100 ng/mL increase). aHR, adjusted hazard ratio; CI, confidence interval; SpO2/FiO2 ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay.

Table S-11. Predictors for 28-day mortality or ICU admission in persons admitted to hospital with COVID-19 including combinations of immune responses.*

Characteristic	Overall mortality at 28 days or ICU		
	N _{mortality/ICU} /N _{cohort}	aHR (95% CI)	p
N=181			
Age, years		0.99 (0.96-1.03)	0.763
Female sex		1.52 (0.63-3.70)	0.351
Charlson comorbidity index		1.29 (1.09-1.52)	0.002
SpO2/FiO2 ratio at admission		2.28 (1.49-3.49)	<0.001
SARS-CoV-2 variant, Omicron		0.40 (0.18-0.90)	0.028
Immune responses			
Negative TrimericS-IgG & Negative IGRA	6/18 (33.3%)	reference	reference
Negative TrimericS-IgG & Positive IGRA	0/5 (0%)	0.00 (0.00-∞)	0.997
Positive TrimericS-IgG & Negative IGRA	14/71 (19.7%)	0.24 (0.08-0.76)	0.015
Positive TrimericS-IgG & Positive IGRA	5/87 (5.7%)	0.10 (0.03-0.38)	<0.001
Remdesivir		0.49 (0.19-1.00)	0.137
Peripheral lymphocyte count		1.03 (0.98-1.07)	0.250

* Estimates were obtained from fitting a multivariable Cox-proportional hazards regression model incorporating age (per year increase), sex, Charlson comorbidity index (per unit increase), SpO2/FiO2 ratio (per 100 units decrease), SARS-CoV-2 variant, remdesivir use, total lymphocytes (per 100 cells/ μ L increase) and FOUR variables reflecting combinations of metrics of both immune responses: negative antibody response and negative T-cell response (Ab-T-), negative antibody response and positive T-cell response (Ab-T+), positive antibody response and negative T-cell response (Ab+T-), and positive antibody response and positive T-cell response (Ab+T+). aHR, adjusted hazard ratio; ICU, intensive care unit; SpO2/FiO2 ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay.

Table S-12. Predictors for 28-, 60- and 90-day mortality in persons admitted to hospital with COVID-19.*

Characteristic	Overall mortality at 28 days		Overall mortality at 60 days		Overall mortality at 90 days	
	aHR (95% CI)	p	aHR (95% CI)	p	aHR (95% CI)	p
N=181						
Age, years	1.00 (0.95-1.06)	0.978	1.03 (0.99-1.09)	0.177	1.03 (0.98-1.08)	0.228
Female sex	1.73 (0.58-5.13)	0.327	1.02 (0.44-2.35)	0.960	1.12 (0.49-2.52)	0.792
Charlson comorbidity index	1.50 (1.20-1.88)	<0.001*	1.31 (1.11-1.55)	0.001*	1.34 (1.13-1.57)	<0.001*
SpO2/FiO2 ratio at admission	3.31 (1.81-6.04)	<0.001*	2.06 (1.27-3.36)	0.004*	2.06 (1.27-3.33)	0.003*
SARS-CoV-2 variant, Omicron	0.71 (0.25-2.06)	0.533	0.79 (0.35-1.85)	0.586	0.83 (0.36-1.94)	0.669
Immune responses						
Positive TrimericS-IgG & Negative IGRA	0.55 (0.12-2.45)	0.435	0.79 (0.24-2.55)	0.690	0.85 (0.27-2.74)	0.789
Positive TrimericS-IgG & Positive IGRA	0.15 (0.02-0.95)	0.044*	0.42 (0.12-1.53)	0.189	0.40 (0.11-1.45)	0.164
Remdesivir	0.59 (0.21-1.70)	0.329	0.62 (0.27-1.44)	0.269	0.56 (0.25-1.26)	0.160
Peripheral lymphocyte count	1.03 (0.98-1.08)	0.235	1.01 (0.97-1.06)	0.691	1.01 (0.97-1.05)	0.684

* Estimates were obtained from fitting a multivariable Cox-proportional hazards regression model incorporating age (per year increase), sex, Charlson comorbidity index (per unit increase), SpO2/FiO2 ratio (per 100 units decrease), SARS-CoV-2 variant, remdesivir use, peripheral lymphocyte count (per 100 cells/ μ L increase) and the three variables reflecting combinations of metrics of both immune responses: negative antibody response (Ab-), positive antibody response and negative T-cell response (Ab+T-), and positive antibody response and positive T-cell response (Ab+T+). aHR, adjusted hazard ratio; ICU, intensive care unit; SpO2/FiO2 ratio, oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio; TrimericS-IgG, immunoglobulin G antibody serum levels against the trimeric spike protein; IGRA, SARS-CoV-2 interferon gamma release assay.

Figure S-1: Correlation of humoral and cellular responses with inflammatory biomarkers and lymphocyte counts in persons admitted to hospital with COVID-19.

