

La IgA domina la respuesta temprana de anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2

DELPHINE STERLIN ___ ALEXIS MATHIAN ___ MAKOTO MIYARA ___
AUDREY MOHR ___ FRANÇOIS ANNA ___ LAETITIA CLAËR ___
PAUL QUENTRIC JEHANE FADLALLAH ___ HERVÉ DEVILLIERS ___
[...]GUY GOROCHOV ___ +18 AUTORES Información Y Afiliaciones De Los
Autores

MEDICINA TRASLACIONAL DE LA CIENCIA•20 de enero de
2021•Vol 13 , número 577•DOI: 10.1126 / scitranslmed.abd2223

Acción temprana de IgA

Las respuestas inmunes humorales juegan un papel crítico en la protección de los individuos contra la infección por SARS-CoV-2, particularmente a través de la actividad de los anticuerpos neutralizantes. Sterlin y *col.* midieron las respuestas inmunes humorales en el suero, la saliva y el líquido de lavado bronco alveolar de pacientes infectados con SARS-CoV-2 que experimentaron una variedad de gravedad de la enfermedad COVID-19. Los anticuerpos IgA dominaron la respuesta inicial de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en comparación con las concentraciones de IgG e IgM en estos fluidos y se relacionaron con la expansión de plasmablastos de IgA con características de búsqueda de mucosa. Las concentraciones séricas de IgA alcanzaron su punto máximo 3 semanas después del inicio de los síntomas, pero persistieron durante varias semanas más en la saliva, y la IgA sérica fue más potente que la IgG para neutralizar el SARS-CoV-2. Estos hallazgos destacan el papel potencial de la IgA durante la infección temprana por SARS-CoV-2.

Abstracto

Las respuestas inmunitarias humorales se caracterizan típicamente por respuestas primarias de anticuerpos IgM seguidas de respuestas secundarias de anticuerpos asociadas con la memoria inmunitaria y compuestas por IgG, IgA e IgE. Aquí, medimos las respuestas humorales agudas al SARS-CoV-2, incluida la frecuencia de células secretoras de anticuerpos y la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos del SARS-CoV-2 en el suero, la saliva y el líquido bronco alveolar de 159 pacientes con COVID-19. Las primeras respuestas humorales específicas del SARS-CoV-2 estuvieron dominadas por anticuerpos IgA. La expansión periférica de plasmablastos de IgA con potencial de localización mucosa se detectó poco después del inicio de los síntomas y alcanzó su punto máximo durante la tercera semana de la enfermedad. Las respuestas de anticuerpos específicos del virus incluyeron IgG, IgM e IgA, pero la IgA contribuyó a la neutralización del virus en mayor medida en comparación con la IgG. Las concentraciones séricas de IgA específica disminuyeron notablemente 1 mes después del inicio de los síntomas, pero la IgA neutralizante permaneció detectable en la saliva durante más tiempo (días 49 a 73 posteriores a los síntomas). Estos resultados representan una observación crítica dada la información emergente en cuanto a los tipos

de anticuerpos asociados con la protección óptima contra la reinfección y si los regímenes de vacunas deben considerar dirigirse a una respuesta de IgA potente pero potencialmente de corta duración.

INTRODUCCIÓN

En diciembre de 2019, se identificó un nuevo coronavirus llamado SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) como la causa de una enfermedad respiratoria aguda conocida como enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19). Este virus de ARN de sentido positivo envuelto es miembro del beta coronavirus y se diseminó por todo el mundo con una velocidad sin precedentes en comparación con la diseminación del SARS-CoV en 2003 y el virus del coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012 (1). Informes recientes indican que el SARS-CoV-2 provoca fuertes respuestas inmunes humorales, incluida la producción de anticuerpos específicos del virus de los isotipos de inmunoglobulina M (IgM), IgG e IgA. Se ha demostrado que los pacientes logran la seroconversión y producen anticuerpos detectables dentro de los 20 días posteriores al inicio de los síntomas, aunque la cinética de la producción de IgM e IgG es variable (2 - 4).

La IgA secretora juega un papel crucial en la protección de las superficies mucosas contra patógenos al neutralizar los virus respiratorios o al impedir su unión a las células epiteliales (5 - 8). Influenza IgA específica ha demostrado ser más eficaz en la prevención de infecciones en ratones y seres humanos en comparación con la gripe IgG específica, y niveles elevados de IgA en suero se han correlacionado con la eficacia de la vacuna de la gripe (9 - 11). La IgA también puede desempeñar un papel importante en la infección por SARS-CoV. En ratones, la vacunación intranasal con proteínas del SARS-CoV induce respuestas de IgA específicas del virus localizadas y sistémicas y proporciona una mejor protección contra el desafío del SARS-CoV en comparación con la administración intramuscular, lo que sugiere que la IgA inducida por la mucosa es protectora (12). Una intervención informada recientemente basada en una inmunización intranasal con una vacuna derivada de MERS confirmó un papel beneficioso de la IgA (13). Sin embargo, la naturaleza de la respuesta de IgA específica del virus contra la infección por SARS-CoV-2 en humanos sigue siendo poco conocida.

Realizamos un seguimiento de las células secretoras de anticuerpos, caracterizadas aquí como plasmablastos, en la sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2. Medimos los títulos de anticuerpos específicos longitudinalmente en suero y comparamos las capacidades neutralizantes de IgA e IgG monoméricas en suero purificado. Por último, se estudió el potencial de neutralización de los anticuerpos mucosos presentes en las secreciones pulmonares del tracto respiratorio inferior y la saliva. Nuestros resultados muestran que los anticuerpos IgA humanos a menudo son detectables antes de la aparición de IgG específica del SARS-CoV-2 y sugieren un papel de los anticuerpos IgA en la neutralización temprana del virus.

RESULTADOS

Los plasmablastos circulantes expresan preferentemente IgA1

La aparición rápida y transitoria de plasmablastos en sangre periférica es una característica común de la fase aguda de las infecciones virales (14). Monitoreamos los cambios fenotípicos de las células B longitudinalmente en la sangre de 38 pacientes

infectados con SARS-CoV-2 (tabla S1) mediante citometría de flujo. Los plasmablastos son células secretoras de anticuerpos inmaduras, definidas aquí como células proliferantes de ciclo celular $Ki67^+ CD19^{bajo} CD27^{alto} CD38^{alto}$ (Fig. 1A y Fig. S1A). La proporción de plasmablastos en el compartimento de células B aumentó significativamente en los días 1 a 9 después del inicio de los síntomas (mediana [mínima a máxima]%; 4,9 [1,1 a 17,8]%, $n = 21$ frente a 0,5 [0,1 a 1,5]%, en donantes $m = 9$; $P = 0,0068$; Fig. 1B) alcanzó su punto máximo entre los días 10 y 15 (11,8 [0,7 a 62,1]%, $n = 28$; Fig. 1B), y luego disminuyó (4,4 [0,2 a 33,8]%, entre los días 16 y 25, $n = 21$; 0,5 [0,1 a 3,2]%, después del día 50, $n = 14$; Fig. 1B). El seguimiento longitudinal en siete pacientes también confirmó la naturaleza transitoria de la expansión de plasmablast durante la infección viral aguda (fig. S1B).

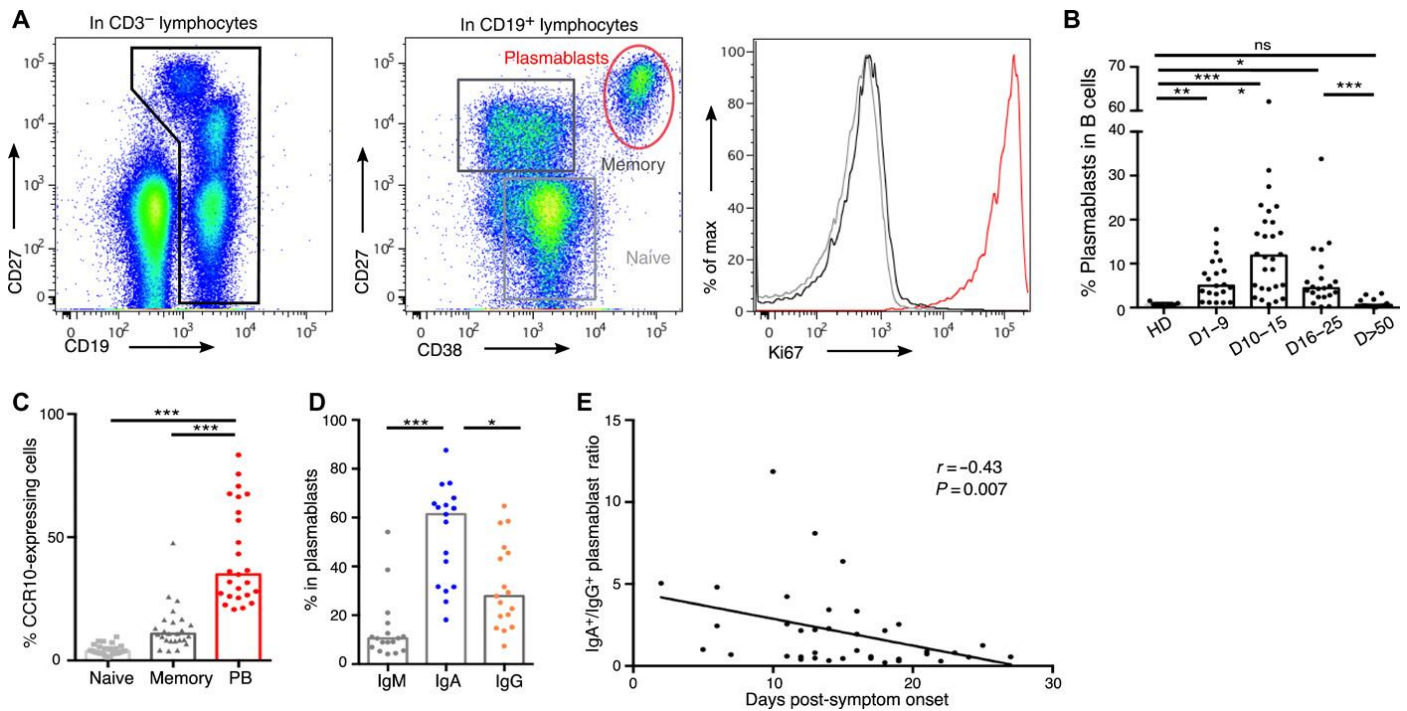


Fig. 1 Dinámica del plasmablastos después de la infección por SARS-CoV-2.

(A) Análisis de citometría de flujo representativo de subpoblaciones de células B en la sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2. Se excluyeron los dobletes y las células muertas antes de la activación de $CD3^- CD19^+$. Los plasmablastos se definen como células $Ki67^+ CD19^{bajas} CD27^{altas} CD38^{altas}$, células B de memoria como $Ki67^- CD19^+ CD27^+ IgD^-$ y células B vírgenes como células $Ki67^- CD19^+ CD27^- IgD^+$. (B) Frecuencia de plasmablastos en el compartimento de células B en la sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2 ($n = 38$, características clínicas en tabla S1) en comparación con donantes sanos (HD; $n = 9$). Los histogramas representan medianas. Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunn (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$). ns, no significativo. (C) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CCR10 en subpoblaciones de células B en sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2 ($n = 25$). Las muestras utilizadas en este análisis se recogieron desde el día 3 hasta el día 27 después de la aparición de los síntomas. Los histogramas representan medianas. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de Wilcoxon (** $P < 0,001$). (D) Expresión de anticuerpos intracelulares en plasmablastos circulantes en sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2 ($n = 17$) mediante citometría de flujo. Las muestras utilizadas en este análisis se recogieron entre los días 2 y 23 después de la aparición de los síntomas. Los histogramas representan medianas. Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunn (* $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$). (E) Expresión intracelular de IgA versus IgG en plasmablastos según la duración de la enfermedad. Cada punto representa un paciente. Se calculó la correlación de Spearman no paramétrica.

ABIERTO EN VISOR

Analizamos plasmablastos circulantes para la expresión superficial de CCR10, un receptor de quimiocinas involucrado en la migración de células inmunes a los sitios de la mucosa, especialmente el pulmón (15, 16). Menos del 10% de las células B con memoria y sin tratamiento previo, pero alrededor del 40% de los plasmablastos detectados, eran $CCR10^+$ (3,8 [1,2 a 9,6]%, en células B sin tratamiento previo frente al 10,9 [4,1 a 47,7]%, en células B de memoria frente al 34,9 [20,7] al 83,4% en plasmablastos; $n = 25$; Fig. 1C), lo que sugiere un potencial tropismo tisular pulmonar

de este último. El análisis de la fase inicial de la respuesta inmune reveló solo una pequeña población de plasmablastos que producían IgM, medida por tinción intracelular (10,5 [4,2 a 54,1]% IgM⁺ plasmablastos, $n = 17$; [Figura 1D](#)). Por el contrario, la mayoría de los plasmablastos expresaron IgA (61,4 [18,1 a 87,6]% de IgA⁺ plasmablastos frente a 27,9 [7,4 a 64,8]% de IgG⁺ plasmablastos, $n = 17$; [figura 1D](#)), una característica compatible con los plasmablastos que se encuentran en las mucosas. La identificación intracelular de subclases de IgA mostró frecuencias más altas de plasmablastos que expresan IgA1, en comparación con IgA2 (66 [26,8 a 88,5]% IgA1⁺ versus 31,6 [3,7 a 70,8]% IgA2⁺ en plasmablastos IgA⁺, $n = 13$; [figo. S1, C y D](#)). Esta primera ola de plasmablastos que expresan IgA circulantes, con un pico entre los días 10 y 15, fue seguida por una segunda ola de células que expresan IgG que fueron más dominantes el día 22 después del inicio de los síntomas ([Fig. 1E y Fig. S1, E y F](#)). La mayoría de los plasmablastos IgA⁺ expresaron CCR10, pero este receptor de quimiocinas fue expresado por una minoría de plasmablastos IgG⁺ (60,5 [37,6 a 92,6] versus 23,3 [3,2 a 78]% CCR10⁺, $n = 15$; [fig. S1G](#)), lo que sugiere que este último puede ocupar un nicho diferente, como la médula ósea. La frecuencia de plasmablastos periféricos que expresan IgM no varió significativamente en los puntos de tiempo tempranos ([fig. S1H](#)) y sólo marginalmente en puntos de tiempo posteriores ([fig. S1I](#)).

En un estudio reciente que caracterizó la respuesta inmune de un paciente con COVID-19, se informó que la inducción de células T auxiliares foliculares (T_{FH}) ocurre concomitantemente con la de plasmablastos ([17](#)). Para evaluar un origen del centro germinal potencial de la onda de plasmablast observado en nuestros pacientes, rastreamos las células CD4⁺ CXCR5⁺ PD1^{+/-} T_{FH} longitudinalmente en su sangre. No encontramos un aumento significativo en la frecuencia de subconjuntos de T_{FH} en pacientes con COVID-19, en comparación con donantes sanos, en ninguno de los momentos analizados ([fig. S2, A y B](#)). La frecuencia de ninguno activado (CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺) ni se encontró que las células T_{FH} latentes (CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁻) se correlacionaran con las de los plasmablastos ([fig. S2C](#)). Juntos, estos resultados apuntan hacia una respuesta humoral temprana al SARS-CoV-2 dominada por plasmablastos que expresan IgA que tienen un fenotipo consistente con plasmablastos encontrados en sitios mucosos.

Detección temprana de IgA específica del SARS-CoV-2

Evaluamos la prevalencia de anticuerpos IgG, IgA e IgM que reconocen la proteína de la nucleocápside de longitud completa (NC) del SARS-CoV-2 o el dominio de unión al receptor de pico (RBD) en muestras de suero de 132 pacientes infectados ([tablas S2 y S3](#)) utilizando un inmunoensayo de anillo fotónico, que puede medir el nivel de anticuerpos contra múltiples antígenos simultáneamente ([fig. S3](#)) ([18](#), [19](#)).

Los datos presentados en la [Fig. 2B](#) sugirieron que la IgA anti-RBD en suero podría detectarse antes que la IgG anti-RBD. En el subconjunto de pacientes monitoreados en los puntos temporales muy tempranos después del inicio de la enfermedad (primeros 7 días después de los síntomas, $n = 48$), se detectaron IgA e IgG anti-RBD en 15 y 7 muestras, respectivamente, en concentraciones que no alcanzaron significación estadística (muestras positivas: 31% IgA versus 15% IgG, $P = 0.052$; calculado a partir de los datos presentados en la [Fig. 2, A y B](#), y la [Fig. S4A](#)), mientras que las tasas positivas de anti-NC fueron similares independientemente del isotipo (muestras positivas: 23% de IgA frente a 15% de IgG, $P = 0,43$; [Fig. 2B](#)). Sin embargo, en un subconjunto de pacientes monitoreados en múltiples puntos de tiempo ($n = 38$), el

tiempo hasta la positividad fue significativamente más corto para IgA anti-RBD que para IgG (12 [3 a 24] versus 15 [8 a 24] días, $P = 0.03$; fig. S4B). La IgM se considera típicamente un marcador de infección aguda, pero la IgM anti-RBD se detectó solo en 7 de estas 48 muestras tempranas (Fig. 2A). Además, la IgM anti-NC permaneció indetectable en todas las muestras excepto en una. Estos resultados sugieren que es probable que la IgA anti-RBD en suero se detecte antes que la IgG anti-RBD.

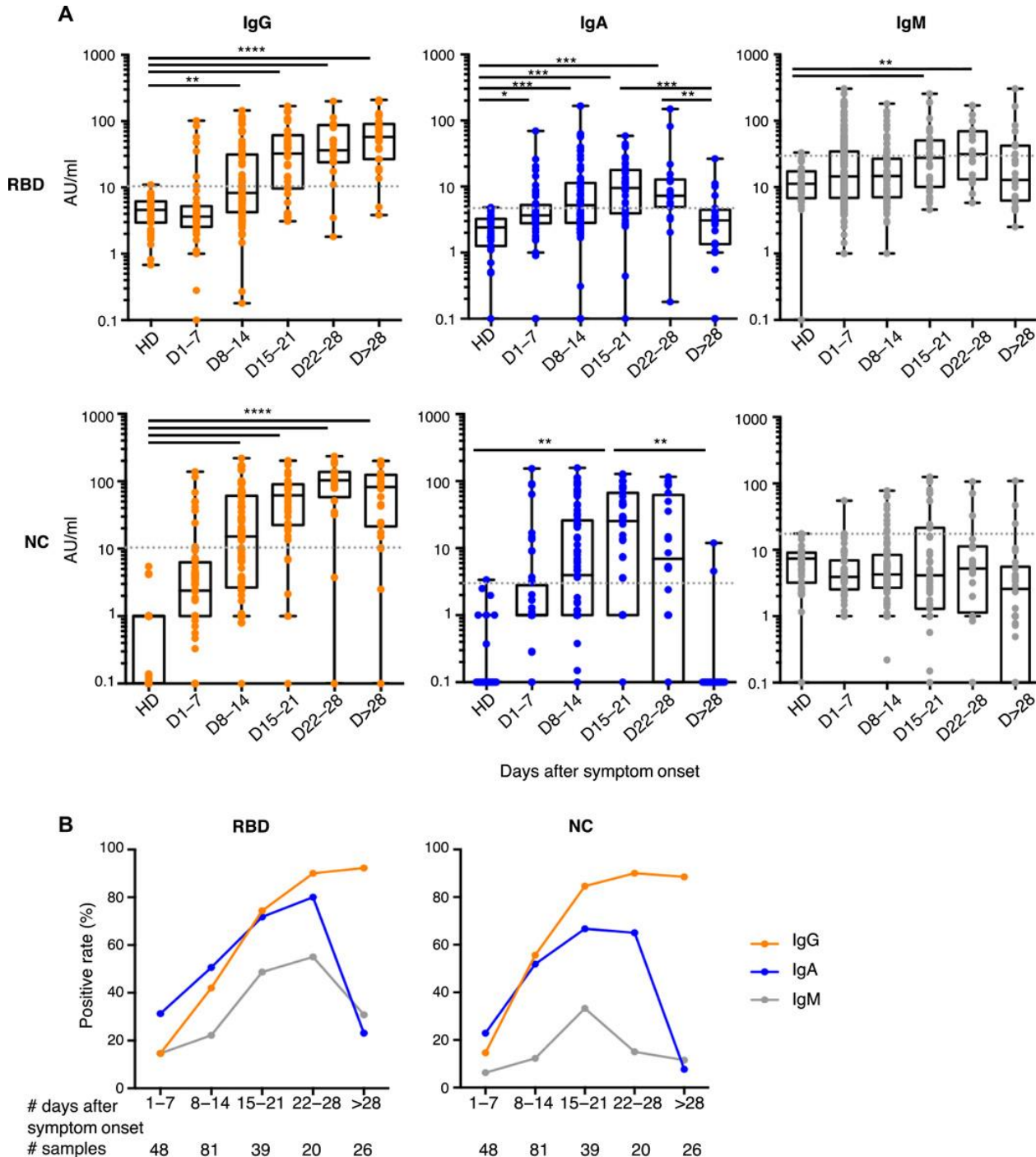


Fig. 2 Cinética de respuesta de anticuerpos a proteínas del SARS-CoV-2.

(A) Se midieron IgG, IgA e IgM específicas contra el dominio de unión al receptor de pico 1 (RBD) y la proteína de la nucleocápside (NC) mediante inmunoensayo de anillo fotónico en 132 pacientes (características clínicas detalladas en las tablas S2 y S3). Los niveles de anticuerpos se expresan como unidades arbitrarias / ml (AU / ml). Las líneas de corte se representan como líneas de puntos grises. Los diagramas de caja muestran medianas (línea media) y el primer y tercer cuartiles, y los bigotes indican valores mínimos y máximos. El valor de p se calculó mediante la prueba de comparación

múltiple de Dunn (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$). (B) Tasas positivas de IgG, IgA e IgM séricas específicas en 132 pacientes en diferentes momentos después del inicio de los síntomas, desde el día 1 al 78.

ABIERTO EN VISOR

La proporción de pacientes con IgG anti-RBD detectable aumentó hasta alcanzar una meseta alrededor de la cuarta semana posterior al inicio de los síntomas (muestras positivas: 15%, días 1 a 7; 42%, días 8 a 14; 74%, días 15 a 21 ; 90%, días 22 a 28; y 92%, día > 28; [Fig.2, A y B](#)). Por el contrario, la frecuencia de pacientes con IgA anti-RBD alcanzó su punto máximo alrededor del día 22 (muestras positivas: 31%, días 1 a 7; 51%, días 8 a 14; 72%, días 15 a 21; y 80%, días 22 a 28; [Fig.2, A y B](#)) y luego disminuyó el día 28 (muestras positivas: 23%, día > 28; [Fig.2, A y B](#)). Siguiendo una cinética similar con respecto a la aparición de anticuerpos anti-RBD, la proporción de pacientes con IgG anti-NC detectable permaneció estable alrededor de la cuarta semana posterior al inicio de los síntomas (muestras positivas: 15%, días 1 a 7; 56%, días 8 a 14; 85%, días 15 a 21; 90%, días 22 a 28; y 89%, día > 28; [Fig.2, A y B](#)), mientras que la IgA anti-NC desapareció rápidamente y ya no fue detectable en la mayoría de los pacientes 1 mes después del inicio de la enfermedad (muestras positivas: 23%, días 1 a 7; 52%, días 8 a 14; 67%, días 15 a 21; 65%, días 22 a 28; y 8%, días > 28 ; [Fig.2, A y B](#)). En dos pacientes que se recuperaron de COVID-19, no se detectaron anticuerpos específicos en los días 32 y 47 ([Fig. 2A](#)).

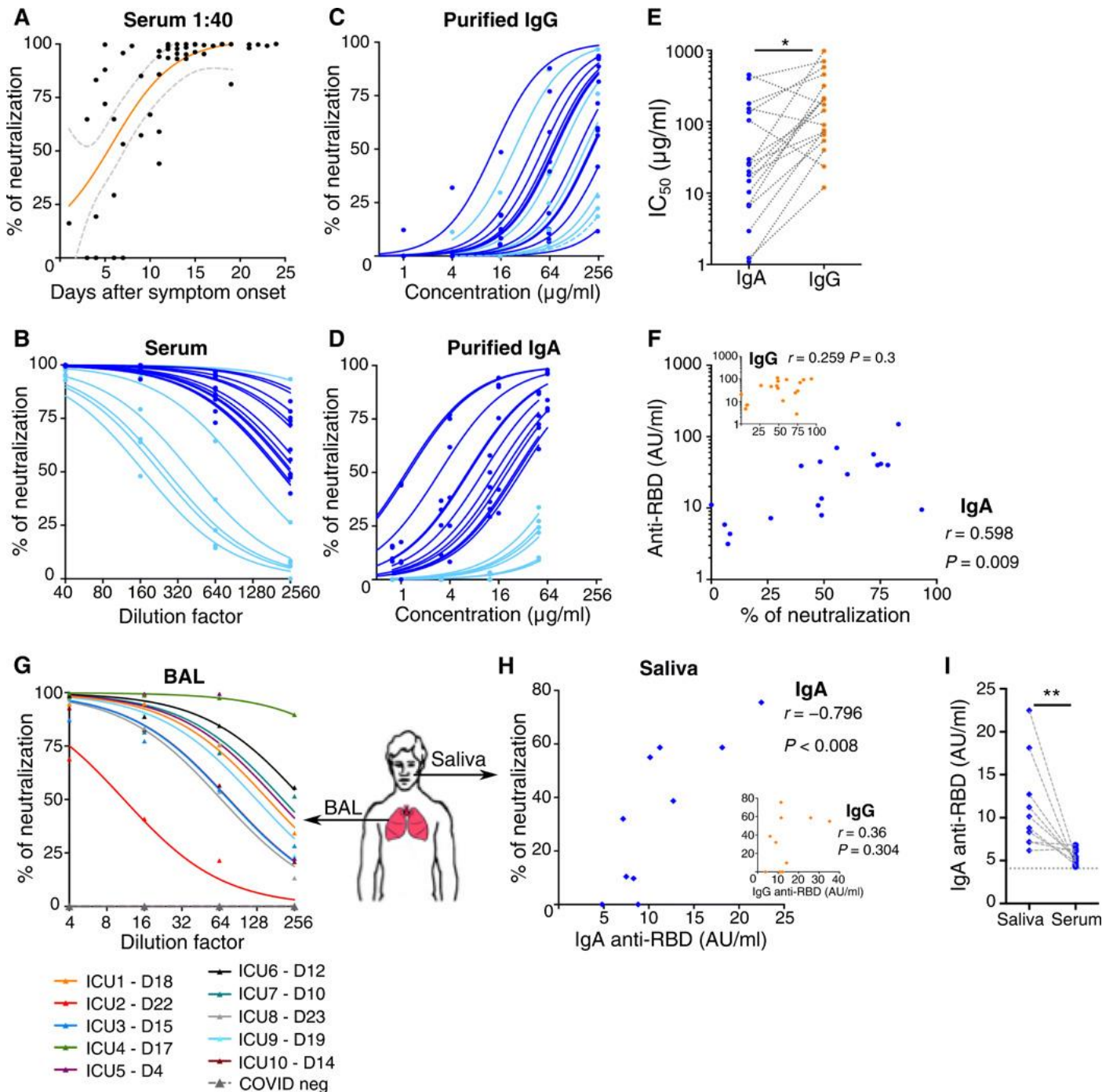
Los títulos de IgG tanto anti-RBD como anti-NC aumentaron con el tiempo [unidades arbitrarias anti-RBD (AU) / ml: 3,6 [0,1 a 102,1], días 1 a 7; 8,3 [0,2 a 145,2], días 8 a 14; 32,6 [3,5 a 168,9], días 15 a 21; 36,5 [1,8 a 200,9], días 22 a 28; 57,9 [5,1 a 209,9], día > 28; anti-NC AU / ml: 2,4 [0,1 a 138,2], días 1 a 7; 15,2 [0,1 a 219,8], días 8 a 14; 61,7 [0,1 a 201,7], días 15 a 21; 103,5 [0,1 a 236,2], días 22 a 28; 82,4 [0,1 a 200,2], día > 28; [Figura 2A](#)], mientras que los títulos de IgA específicos del virus aumentaron durante las primeras 3 semanas posteriores al inicio de los síntomas, luego disminuyeron y fueron indetectables 1 mes después de la recuperación (anti-RBD AU / ml: 3,7 [0,1 a 69,6], días 1 a 7; 5,2 [0,1 a 166,3], días 8 a 14; 9,5 [0,1 a 58,5], días 15 a 21; 7,3 [0,2 a 149,9], días 22 a 28; 3,1 [0,1 a 26,4], día > 28; anti-NC AU / ml: 0,1 [0,1 a 153,7], días 1 a 7; 3,9 [0,1 a 158,2], días 8 a 14; 25,5 [0,1 a 128,2], días 15 a 21; 6,9 [0,1 a 116,6], días 22 a 28 ; 0,1 [0,1 a 11,9], día > 28; [Fig. 2A](#)). Estos resultados sugieren que las pruebas de IgA anti-SARS-CoV-2 pueden mejorar el diagnóstico temprano de COVID-19, pero las pruebas de suero más de 28 días después del inicio de los síntomas solo pueden detectar de manera confiable los anticuerpos IgG.

La respuesta temprana de IgA específica al SARS-CoV-2 no está asociada con la gravedad de COVID-19

Exploramos la relación entre los títulos de Ig sérica específicos del virus y el curso clínico de los pacientes con COVID-19. Centramos el análisis en muestras de suero tempranas obtenidas a más tardar 10 días después del inicio de los síntomas clínicos. Se utilizó un criterio de valoración compuesto para definir COVID-19 grave en pacientes que ingresaron inicialmente en la misma sala de medicina interna de la unidad de cuidados intensivos (UCI) e incluyó los siguientes criterios: traslado a UCI, uso de oxigenoterapia por cánula nasal superior a 5 litros / min, oxigenoterapia con cánula nasal de alto flujo, ventilación mecánica invasiva o no invasiva, estado de confusión aguda grave, insuficiencia renal aguda y muerte. En conjunto, los títulos tempranos de IgG, IgM e IgA específicos del virus no fueron marcadamente diferentes en los pacientes graves en comparación con los pacientes no graves (tabla S4).

La IgA sérica es un potente y temprano agente neutralizante del SARS-CoV-2

Buscamos determinar la contribución de cada uno de los isotipos IgG e IgA a la neutralización del virus. Evaluamos la capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos mediante un ensayo de pseudoneutralización. Probamos el potencial de neutralización del suero a una dilución de 1:40, que aumentó rápidamente durante el curso de la enfermedad y se estabilizó el día 10 después del inicio de los síntomas (Fig. 3A). La actividad neutralizante de pseudovirus varió considerablemente entre pacientes, con valores de concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) que van desde 1: 169 a 1: 16,189 dilución de suero (Fig. 3B). Comparamos el ensayo de inhibición de la entrada de partículas pseudotipadas con un ensayo de neutralización de virus



completo basado en la utilización de un aislado de campo vivo de SARS-CoV-2 (fig. S5A) y encontramos una fuerte correlación entre los resultados obtenidos con estos dos ensayos ($r = 0,88$, $P < 0,0001$), lo que es consistente con otros hallazgos publicados ([20](#), [21](#)).

Fig. 3 Actividad neutralizante de anticuerpos séricos, BAL y saliva contra el SARS-CoV-2.

(**A**) La actividad neutralizante de 52 sueros (dilución 1:40) de 38 pacientes infectados con SARS-CoV-2 (consulte las características clínicas en la tabla S1) se determinó mediante un ensayo de neutralización de pseudovirus. La curva naranja representa una interpolación sigmoidea significativa ($P = 0,0082$). Las curvas de puntos grises representan intervalos de confianza del 95%. (**B**) Actividad neutralizante de 18 sueros medida por ensayo de neutralización de pseudovirus en diferentes diluciones indicadas. Las muestras utilizadas para este análisis se recolectaron entre los días 6 y 24 después del inicio de los síntomas. El color azul claro corresponde a muestras con bajo potencial de neutralización de IgA. (**C**) Se midió la actividad neutralizante de la IgG purificada a las concentraciones indicadas de 18 sueros recogidos entre el día 6 y el día 24 después de la aparición de los síntomas. Las curvas se dibujaron de acuerdo con una regresión no lineal. El color azul claro corresponde a muestras con bajo potencial de neutralización de IgA. (**D**) Actividad neutralizante de IgA purificada de muestras pareadas en (C). El color azul claro corresponde a muestras con bajo potencial de neutralización de IgA. (**E**) Paired purificó IgA y IgG IC_{50} valores en muestras analizadas en (C) y (D). El valor de p se calculó mediante la prueba de Wilcoxon ($* P < 0,05$). (**F**) Comparación de los niveles séricos de IgA anti-RBD (panel principal) o IgG (recuadro) medidos por inmunoensayo de anillo fotónico con la capacidad neutralizante de los isotipos purificados correspondientes medidos mediante el ensayo de neutralización de pseudovirus. Coeficiente de Spearman (r) y P valor (P) se indican. (**G**) Actividad neutralizante de los lavados broncoalveolares (BAL) recolectados en 10 pacientes con SARS-CoV-2 entre los días 4 y 23 después del inicio de los síntomas (las características clínicas se detallan en la tabla S5). Las diluciones de BAL indicadas se probaron usando un ensayo de neutralización de pseudovirus. Los LBA obtenidos de pacientes negativos al SARS-CoV-2 ($n = 3$) no mostraron actividad de neutralización (líneas grises punteadas). Cada línea de color representa a un paciente. (**H**) Actividad neutralizante y niveles de IgA anti-RBD (ambos probados a una dilución de 1: 4) de la saliva recolectada en 10 pacientes con SARS-CoV-2 entre los días 49 y 73 después del inicio de los síntomas. Se indican r y P . (**I**) Niveles de anti-RBD en saliva y suero emparejados de pacientes analizados en (H). El valor de p se calculó mediante la prueba de Wilcoxon ($** P < 0,01$).

ABIERTO EN VISOR

Luego, buscamos definir las contribuciones respectivas de los isotipos de anticuerpos dominantes a la neutralización del virus mediante el uso de fracciones de IgA e IgG purificadas de los sueros de 18 pacientes (fig. S5B) que se analizaron en paralelo utilizando el ensayo de neutralización de pseudovirus ([Fig. 3, C y D](#)). Las preparaciones de IgA fueron más potentes en su neutralización en comparación con las IgG emparejadas ([Fig. 3, C a E](#)). Observamos que las muestras de suero con bajo potencial de neutralización (curvas de color azul claro en la [Fig. 3B](#)) también tenían una baja actividad neutralizante basada en IgA (las correspondientes curvas de color azul claro en la [Fig. 3D](#)) y confirmamos que el potencial de neutralización del suero solo se asoció con IgA anti-RBD contenido y no anti-RBD IgG ([Fig. 3F](#)). El potencial de neutralización de IgA se correlacionó directamente con los títulos séricos de IgA anti-RBD ($r = -0,88$, $P < 0,0001$; fig. S5C) pero no con los títulos de IgA anti-NC ($r = 0,14$, $P = 0,58$; fig. S5D), lo que sugiere que el potencial de neutralización de IgA está estrechamente relacionado con la unión de RBD. La IgG es aproximadamente cinco veces más abundante en suero que la IgA, pero, como se muestra, las fracciones de IgA purificada tenían valores de IC_{50} aproximadamente siete veces más bajos en comparación con la IgG purificada ([mínimo a máximo]; IC_{50} de IgA [1,1 a 454,9] frente a IgG IC_{50} [11,9 a 982,4], $n = 18$; [Fig. 3E](#)). Además, el potencial de neutralización más eficaz de la IgA en comparación con la IgG no puede explicarse por un efecto de avididad, porque ambas preparaciones de anticuerpos purificados eran monoméricas (fig. S5B).

Estos resultados sugieren que la IgA contribuye más que la IgG al potencial de neutralización del suero en la fase temprana de la infección. Hay excepciones a esta regla, como los pacientes n. ° 2 y n. ° 3, que presentaban ambos niveles de IgA anti-RBD muy bajos (por debajo de 11 AU / ml entre los días 6 y 18), pero en cambio presentaban una respuesta de IgM sérica temprana (fig. S5E).

La IgA mucosa es un agente neutralizante del SARS-CoV-2

Estas observaciones detallan las contribuciones respectivas de IgA e IgG a la inmunidad humoral sistémica. Sin embargo, los principales objetivos del SARS-CoV-2 son las células epiteliales pulmonares ([22](#) , [23](#)) y la inmunidad de las mucosas difiere de la inmunidad sistémica. Para evaluar la inmunidad local de la mucosa, también se analizaron muestras de saliva y lavado broncoalveolar (BAL). Las concentraciones de IgG fueron consistentemente más altas que las de IgA en las muestras de BAL analizadas, excepto en un paciente (fig. S5F), pero las concentraciones de IgA fueron más altas que las de IgG en la saliva (mediana [mínima a máxima]; IgA 392 [92 a 1200] versus IgG [<70 a 130] $\mu\text{g} / \text{ml}$; $n = 10$; fig. S5G). De acuerdo con estos hallazgos, los informes anteriores demostraron un aumento de la relación IgG: IgA a lo largo del tracto respiratorio, medido desde el compartimento nasal hasta los pulmones ([24](#) , [25](#)). En contraste con la IgA purificada en suero, se observaron IgA tanto monomérica como dimérica en los fluidos broncoalveolares (fig. S5H). Las muestras de BAL se recolectaron en varios momentos, incluido el muestreo tan pronto como 4 días después del inicio de los síntomas, y se detectó actividad de neutralización de pseudovirus en la mayoría de las muestras ([Fig. 3G](#)). Se detectaron IgA anti-RBD en la mayoría de las muestras de BAL, mientras que las IgG anti-RBD estaban por encima del umbral de positividad en solo la mitad de las muestras (fig. S5I), lo que sugiere que la IgA puede contribuir más que la IgG a la neutralización del SARS-CoV-2 en la pulmón. Aunque las muestras de saliva se recolectaron después del día 49 después del inicio de los síntomas, 8 de las 10 muestras neutralizaron partículas virales pseudotipadas del SARS-CoV-2, aunque con una notable variabilidad interindividual ([Fig. 3H](#)). Actividad de neutralización pseudovirus directamente correlacionado con los títulos anti-RBD IgA ($r = -0,796$, $P < 0,008$; [Fig. 3H](#)), pero no se correlacionó con anti-RBD títulos de IgG, aunque anti-RBD IgG estaban por encima del umbral de detección ([Fig. 3H](#)). Los IgA anti-RBD fueron consistentemente más abundantes en la saliva que en el suero (9.5 [6.2 a 22.5] versus 5.2 [4.3 a 6.8], $P = 0.0039$; [Fig. 3I](#)), lo que sugiere que la IgA específica del SARS-CoV-2 puede persistir más tiempo en las mucosas en comparación con la sangre periférica en pacientes hospitalizados con COVID-19. Las observaciones en puntos de tiempo posteriores (días 189 a 230 después de los síntomas) en una serie de individuos ambulatorios que habían experimentado COVID-19 paucisintomático no revelaron actividad de neutralización detectable en la saliva (fig. S5J).

DISCUSIÓN

Nuestros datos destacan la potencia de la IgA en la etapa inicial de la enfermedad COVID-19 en varios sitios del cuerpo a través del análisis de sangre, BAL y saliva. Mostramos que la neutralización del SARS-CoV-2 se correlaciona más estrechamente con IgA que con IgM o IgG en las primeras semanas después del inicio de los síntomas. Nuestros propios resultados no implican directamente que la IgA monomérica sea inherentemente más neutralizante que la IgG monomérica. Sin embargo, los trabajos publicados ya sugieren que las respuestas IgA e IgG específicas del SARS-CoV-2 son cualitativamente diferentes. En un estudio reciente basado en el mismo dominio de anticuerpo específico de SARS-CoV-2 variable, pero expresado como IgA o IgG, Ejemel *et al.* ([26](#)) mostró que el monómero de IgA tenía una potencia de neutralización significativamente mejorada sobre su equivalente de IgG. Se propone que la mayor flexibilidad y la bisagra más larga de IgA1, en relación con IgG ([27](#)), serían más favorables a las interacciones entre el monómero de IgA y el trímero de pico de SARS-CoV-2. Estudios anteriores sobre anticuerpos específicos contra la influenza y el VIH han informado observaciones similares ([28](#)).

Otra posibilidad es que la IgA pueda tener una reacción cruzada más amplia contra varios coronavirus humanos, como sugiere el análisis extenso de las células B de memoria de un sobreviviente del brote de SARS-CoV de 2003 ([29](#)). También es posible que la maduración de la respuesta de IgG sistémica se retrase ligeramente en comparación con la respuesta de IgA de la mucosa. Nuestros resultados muestran que la IgA sérica, particularmente la IgA anti-RBD, se detecta antes en comparación con la IgG, y que la marcada expansión de plasmablast que sigue a la infección por SARS-CoV-2 está dominada por células secretoras de IgA ([Fig. 1D](#)). El tiempo de positividad contra RBD es notablemente más corto para IgA que para IgG ([fig. S4B](#)), y el potencial de neutralización del suero está asociado con anticuerpos de isotipo IgA anti-RBD ([fig. 3F](#)). También observamos una rápida disminución en los niveles séricos de IgA específica del SARS-CoV-2, lo que cuestiona la eficacia a largo plazo de esta marcada respuesta de primera ola. En individuos convalecientes, se encontró que los monómeros de IgA específicos del SARS-CoV-2 en plasma eran dos veces menos potentes en los ensayos de neutralización que los equivalentes de IgG ([30](#)). También es posible que los niveles sostenidos de IgA secretora específica del SARS-CoV-2 se mantengan en las secreciones de la mucosa, porque detectamos títulos de IgA específicos del SARS-CoV-2 más altos en la saliva en comparación con las muestras de suero emparejadas obtenidas después del día 49 después de la aparición de los síntomas. ([Figura 3I](#)). Esta observación es consistente con el hallazgo de que la forma dimérica de IgA, que se encuentra en la mucosa, es más potente contra el SARS-CoV-2 auténtico que los monómeros de IgA e IgG ([30](#)). Sin embargo, la actividad neutralizante no fue detectable en puntos de tiempo posteriores (días 189 a 230) en la saliva de 14 individuos que habían exhibido COVID-19 leve y ambulatorio ([fig. S5J](#)).

Los anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 de las mucosas pueden surgir de múltiples orígenes. Los anticuerpos IgA plasmáticos monoméricos no se unen a FcRn pero pueden llegar a las vías respiratorias a través de un proceso alternativo independiente del receptor llamado trasudación, que es más probable que ocurra en el tejido pulmonar dañado ([31](#) , [32](#)). Se ha demostrado una relación clonal entre la IgA específica de antígeno en suero y mucosa ([33](#)). Mostramos que la IgA monomérica está presente en BAL; por tanto, es posible que los anticuerpos IgA plasmáticos también puedan ejercer funciones en el tracto intestinal inferior. Mientras que IgA e IgG pueden alcanzar las vías respiratorias y los pulmones por trasudación del plasma, no se observó una correlación significativa entre el BAL y los títulos de anticuerpos específicos del suero ([fig. S5H](#)), lo que sugiere que una parte de la respuesta de anticuerpos del SARS-CoV-2 se genera localmente. . Se detectaron plasmablastos que secretan IgA recirculantes con un perfil de localización mucosa ([16](#) , [34](#) - [36](#)) en un gran número en los pacientes que estudiamos y es probable que sembren la interfaz pulmón / vía aérea. Las células secretoras de IgA pueden albergar y residir eficientemente dentro de la mucosa ([37](#)), y la recombinación del cambio de subclase de IgA puede tener lugar en estos tejidos ([38](#)) de manera independiente de las células T ([39](#)). La falta de correlación entre el plasmablast y la expansión de las células T_{HH} observada en este estudio sugiere que se está produciendo una inducción de IgA independiente del centro germinal ([40](#)). Varias IgG neutralizadoras del SARS-CoV-2 descritas recientemente ([41](#) , [42](#)) no portaba mutaciones somáticas típicamente asociadas con la maduración por afinidad y la ayuda de las células T. Una caracterización molecular y funcional de los anticuerpos monoclonales IgA secretados por plasmablastos que se encuentran en la sangre periférica durante la primera semana del inicio de los síntomas puede arrojar luz sobre su estado mutacional. Las observaciones realizadas en nuestro estudio podrían proporcionar información sobre la observación de que la gran mayoría de los niños

desarrollan síntomas leves o son asintomáticos tras la infección por SARS-CoV-2 ([43](#) , [44](#)), al sugerir que la IgA de reacción cruzada, recientemente identificada en el intestino humano mucosa contra otros objetivos distintos del SARS-CoV-2 ([34](#) , [45](#)), puede ser más prevalente en los niños y / o podría mobilizarse rápidamente en respuesta a la infección por el SARS-CoV-2.

Confirmamos que los anticuerpos de suero, BAL y saliva tienen potencial de neutralización del SARS-CoV-2 utilizando un ensayo de pseudoneutralización y validado con un ensayo de neutralización viral. Queda por confirmar si esta respuesta es duradera en pacientes que han experimentado una enfermedad más grave en comparación con los pacientes ambulatorios que se estudiaron aquí. El análisis de saliva, potencialmente basado en ensayos basados en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) recientemente desarrollado, como la matriz de una sola molécula (Simoa) ([46](#)), puede representar una forma conveniente de abordar este problema en estudios futuros.

En varias muestras de suero tempranas con capacidad eficaz de neutralización del virus, solo se detectó IgM anti-RBD en cantidades medibles, porque ni los anticuerpos IgA ni IgG SARS-CoV-2 pico RBD específicos estaban por encima del umbral de detección [paciente 2 (P2) día 14 y P3 día 6 post-síntomas; higo. S5E]. Esta observación sugiere que la IgM también puede proporcionar algún nivel de protección, pero esta secuencia de detección de IgM primero, seguida de IgG e IgA, es inusual y no es probable que prevalezca. Un perfil más típico está ejemplificado por P9, con niveles de IgA anti-RBD alcanzando un pico antes de la aparición de IgG anti-RBD e IgM apenas detectable en cualquiera de los puntos de tiempo medidos (figura S5E). Debido a que solo se detecta IgM específica del virus en los primeros momentos en casos raros, queda por determinar si todos los isotipos deben medirse durante el diagnóstico serológico.

Recientemente se propuso que los niveles altos de IgA podrían desempeñar un papel perjudicial en los pacientes con COVID-19 ([47](#)). Comparamos los niveles tempranos de IgA en pacientes con resultados posteriores favorables o graves. Mostramos que los niveles tempranos de IgA no fueron significativamente mayores en los pacientes que posteriormente se deterioraron (tabla S4). Por lo tanto, nuestros resultados no apoyan suficientemente la hipótesis de que una respuesta de IgA temprana podría tener una posible influencia negativa en la progresión de la enfermedad.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Dado el marco de tiempo cubierto en este estudio, se necesitan más estudios longitudinales para evaluar si la producción local de IgA específica del SARS-CoV-2 persiste durante más tiempo en pacientes recuperados de COVID-19 grave que en los individuos pauci-sintomáticos que tenemos. ha sido probado en puntos de tiempo tardíos. Además, queda por determinar si los anticuerpos secretores pueden contribuir a un efecto de barrera a más largo plazo en la nariz y los pulmones en comparación con la saliva.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la inmunidad de la mucosa mediada por IgA puede ser un mecanismo de defensa crítico contra el SARS-CoV-2 a nivel individual que puede reducir la infectividad de las secreciones humanas y, en consecuencia, también la transmisión viral. Este hallazgo también puede informar el desarrollo de vacunas que inducen respuestas de IgA respiratorias específicas al SARS-CoV-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Realizamos un estudio unicéntrico realizado en Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université. La población objetivo del estudio principal estaba compuesta por pacientes adultos infectados por el SARS-CoV-2. Se obtuvieron muestras de sangre de forma longitudinal de pacientes con COVID-19 ingresados en el Hôpital Pitié-Salpêtrière durante un período de 1 mes. Entre los miembros del personal del laboratorio se reclutaron individuos sanos negativos para el SARS-CoV-2 [reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serología]. Las muestras se procesaron en el Departamento de Inmunología (GG), ubicado en el mismo sitio hospitalario. Citometría de flujo y estudios serológicos en el mismo departamento, también se enviaron alícuotas a 4 ° C al Instituto Pasteur para estudios virológicos (PC y OS). También se obtuvieron muestras de suero y saliva en momentos posteriores de pacientes dados de alta del hospital que consultaban en el Departamento de Medicina Interna (ZA) del Institut E3M para los controles clínicos planificados posteriores al COVID. Se realizó un estudio complementario en las muestras de saliva de 14 trabajadores de la salud ambulatorios que nunca requirieron hospitalización pero que habían estado expuestos al SARS-CoV-2, según lo confirmado por PCR y / o serología.

Reclutamiento de pacientes y preparación de muestras

Muestra de sangre fresca de 135 pacientes adultos consecutivos con COVID-19 remitidos al Institut E3M, Hôpital Pitié-Salpêtrière, París se incluyó en el estudio entre el 22 de marzo y el 24 de abril de 2020 y se comparó con 20 donantes sanos (HD) emparejados por edad y sexo . El diagnóstico de COVID-19 se confirmó en 125 pacientes mediante el transporte de SARS-CoV-2 en el frotis nasofaríngeo, medido mediante análisis de PCR con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR). Los 10 pacientes restantes tuvieron un análisis de RT-PCR en tiempo real nasofaríngeo SARS-CoV-2 negativo, pero todos tenían síntomas clínicos y una tomografía computarizada de tórax altamente evocativa de COVID-19, y todos dieron positivo para la presencia de suero. anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Las características demográficas y clínicas se detallan en las tablas S1 a S3. Para definir un curso desfavorable de la enfermedad tras el ingreso y la primera toma de muestras de suero, utilizamos un criterio de valoración compuesto que incluía traslado a UCI, uso de oxigenoterapia mediante cánula nasal superior a 5 litros / min, oxigenoterapia con cánula nasal de alto flujo, invasiva o ventilación mecánica no invasiva, estado de confusión agudo severo, insuficiencia renal aguda y muerte. Se recogieron BAL de 10 pacientes COVID-19 hospitalizados en UCI del Hôpital Pitié-Salpêtrière, París y se compararon con 3 muestras negativas para COVID-19. Las características demográficas y clínicas se detallan en la tabla S5. Este estudio fue aprobado por el comité de ética local de la Sorbonne Université (no. 2020-CER2020-21). Para todos los pacientes, los sueros se almacenaron inmediatamente después de la recolección a -80 ° C. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de las muestras de sangre de 38 pacientes después de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) y se analizaron inmediatamente. Las características clínicas de estos pacientes se presentan en la tabla S1.

Las muestras de saliva se recogieron por aspiración utilizando una pipeta Pasteur flexible (Thermo Fisher Scientific). Se recogieron aproximadamente de 1 a 3 ml de saliva en una taza de orina estéril. Todas las muestras de saliva se almacenaron a 4 ° C y se transportaron al laboratorio de investigación del Departamento de Inmunología

dentro de las 5 horas posteriores a la recolección de la muestra y se almacenaron a -80° C antes del análisis.

Fenotipado de células B y células T

La fenotipificación se evaluó en PBMC recién aisladas teñidas con una combinación de anticuerpos antihumanos (tabla S6). La tinción intracelular se realizó en células fijadas y permeabilizadas (utilizando el kit de tampón de tinción de factor de transcripción FOXP3; eBioscience). Las células se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo v10 (FlowJo, LLC).

Análisis serológico

Se midieron los anticuerpos IgA, IgM e IgG específicos del SARS-CoV-2 en 214 muestras de suero de 132 pacientes con el Panel de serología de múltiples antígenos Maverick SARS-CoV-2 (Genalyte Inc., EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. El panel de serología de múltiples antígenos de Maverick SARS-CoV-2 (Genalyte Inc.) está diseñado para detectar anticuerpos contra cinco antígenos del SARS-CoV-2: nucleocápside, pico S1 RBD, pico S1S2, pico S2 y pico S1, dentro de un múltiplex. formato basado en la tecnología de resonancia de anillo fotónico (*18*, *19*). Este sistema automatizado detecta y mide con buena reproducibilidad (fig. S3) cambios en la resonancia cuando los anticuerpos se unen a sus respectivos antígenos en el chip. Los anticuerpos combinados IgG e IgM mostraron una sensibilidad del 91% y una especificidad del 98%. Brevemente, se añadieron 10 μ l de cada muestra de suero a una matriz de placa de pocillos de muestra que contenía los diluyentes y tampones necesarios, y la placa y el chip se cargaron en el instrumento para el equilibrio del chip con el tampón diluyente para medir la resonancia de la línea de base. A continuación, se cargó la muestra de suero sobre el chip para unir anticuerpos específicos a los antígenos presentes en el chip. A continuación, se lavó el chip para eliminar los aglutinantes de baja afinidad y se detectaron anticuerpos específicos con anticuerpos secundarios anti-IgG, anti-IgA o anti-IgM. Se analizaron cuarenta y tres sueros recolectados antes de diciembre de 2019 para calcular los valores de corte.

Purificación y cuantificación de IgA e IgG del suero

Se aislaron IgA e IgG de 18 muestras de suero diluidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1 \times como se describió anteriormente (*45*). Los sueros se seleccionaron después de la evaluación de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2. Brevemente, las muestras de suero se cargaron en una columna de péptido M / agarosa o proteína G / agarosa (InvivoGen) después del equilibrio de la columna. Las etapas de cromatografía se realizaron a un caudal de 0,5 ml / min. A continuación, se utilizaron 20 volúmenes de columna de 1 \times PBS para lavar la columna. A continuación, se eluyeron IgA e IgG con 5 ml de glicina 0,1 M (pH 2 a 3; Sigma-Aldrich), y el pH se ajustó inmediatamente a 7,5 con tris 1 M. El intercambio de tampón PBS (1x) se logró utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra (Merck Millipore) a través de una membrana de 100 kDa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de IgA e IgG se determinó utilizando espectrofotómetros de microvolumen NanoVue Plus. La pureza de las fracciones de IgG e IgA se evaluó mediante ELISA (conjunto de cuantificación ELISA de IgG, IgM e IgA; Bethyl Laboratories) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los isotipos indeseables (contrapartes IgM e IgA /

IgG) representaron menos del 1% de las Ig purificadas. A continuación, se utilizó electroforesis para detectar monómeros y dímeros de Ig. La Ig purificada (1 µg) se separó usando gel de poliacrilamida del 4 al 20% (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels; Bio-Rad) en condiciones nativas (Laemmli 4x, Bio-Rad). Los geles se incubaron con Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron cinco veces con agua. Bio-Rad) en condiciones nativas (Laemmli 4 ×, Bio-Rad). Los geles se incubaron con Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron cinco veces con agua. Bio-Rad) en condiciones nativas (Laemmli 4 ×, Bio-Rad). Los geles se incubaron con Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron cinco veces con agua.

Producción de pseudovirus y generación de líneas celulares permisivas

Los vectores pseudotipados se produjeron mediante triple transfección de células 293T como se describió anteriormente (48). Brevemente, las células se cotransfectaron con plásmidos que codifican proteínas lentivirales, un reportero de luciferasa Firefly y un plásmido que expresa un gen de pico (S) de SARS-CoV-2 de codón optimizado. Los vectores pseudotipados se recolectaron el día 2 después de la transfección. El título funcional [unidad de transducción (TU)] se determinó mediante PCR cuantitativa después de la transducción de una línea celular estable de riñón embrionario humano (HEK) 293T-hACE2. Para generar esta línea celular, se transdujeron células HEK 293T a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 con un vector lentiviral integrador que expresa el gen de la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE2) bajo el control del promotor de ubiquitina C. Los clones se generaron mediante dilución limitante y se seleccionaron en función de su permisividad para la transducción del vector lentivírico pseudotipado con SARS-CoV-2 S.

Ensayo de pseudoneutralización

Las diluciones de suero se mezclaron y se incubaron con 300 UT de vector pseudotipado a temperatura ambiente durante 30 min. El suero, el BAL o la saliva y el vector se diluyeron en medio de cultivo [medio de Eagle modificado de Dulbecco: GlutaMAX (Gibco) + suero de ternero fetal al 10% (Gibco) + penicilina / estreptomycin al 1% (Gibco)]. A continuación, esta mezcla se sembró en placas negras de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos (Costar) con 20.000 células HEK 293T-hACE2 por pocillo en suspensión. Para preparar la suspensión, los matraces de células se lavaron con PBS de Dulbecco (DPBS) dos veces (Gibco) y se preparó una suspensión de una sola célula en DPBS + EDTA al 0,1% (Promega) para preservar la integridad de la proteína hACE2. Después de 48 horas, se retiró el medio de cada pocillo y se midió la bioluminiscencia usando un sistema de ensayo de luciferasa (Promega) en un lector de placas EnSpire (PerkinElmer).

Ensayo de neutralización

U2OS-ACE2 GFP1-10 y GFP11 células, también conocida como células S-fusible (21), se mezclaron (relación 1: 1) y se sembraron a 8×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (µClear, # 655090) 24 horas antes de la infección. A continuación, las células se infectaron con SARS-CoV-2 (cepa BetaCoV / Francia / IDf0372 / 2020) a una MOI de 0,1. A las 18 horas después de la infección, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente, se

lavaron y se resuspendieron en PBS que contenía Hoechst 33342 (1: 10.000). Las imágenes se adquirieron en el sistema de detección de alto contenido Opera Phenix (PerkinElmer) y se analizaron en el software de análisis e imágenes de alto contenido Harmony.

Inmunotransferencia

Los BAL se concentraron (5 x) utilizando una membrana de 100 kDa (filtros centrífugos Amicon Ultra; Merck Millipore). Las muestras se diluyeron con 4 x tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad) y se calentaron a 95 ° C durante 5 min. Las proteínas se separaron usando electroforesis en gel de poliacrilamida del 4 al 20% (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels; Bio-Rad) durante 30 min a 200 V y luego se transfirieron a nitrocelulosa para análisis de transferencia Western. Se detectó IgA humana con IgA antihumana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante usada a una dilución 1: 20.000 durante 1 hora (Bethyl Laboratories) seguida de la adición de sustrato de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Clarity Western ECL, Bio-Rad). La quimioluminiscencia se visualizó con un sistema de cámara (ImageQuant LAS4000, GE Healthcare). Todas las incubaciones se realizaron en 1 × PBS con leche descremada al 5%, y los pasos de lavado utilizaron 1 × PBS con 0,1% de Tween 20.

análisis estadístico

Las variables se expresaron como mediana. Se utilizaron varias pruebas no paramétricas, incluida la prueba *U de Mann-Whitney* para comparar dos grupos independientes, la prueba de Wilcoxon para comparar valores pareados y la prueba de chi-cuadrado para comparar las tasas de anticuerpos positivos. Se utilizó la prueba de correlación de Spearman para medir la correlación entre dos variables. Las estadísticas se corrigieron para múltiples comparaciones con la prueba de Dunn. Los valores de *P* significativos se indican como se describe: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism, V6 (GraphPad, San Diego).

Expresiones de gratitud

Agradecemos a los pacientes que aceptaron participar en este estudio, así como a los médicos y enfermeras de los departamentos de Endocrinología, Metabolismo, Nutrición y Diabetología del Institut E3M [Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Pitié-Salpêtrière] que participó en este estudio; todos los miembros del Departamento de Inmunología (AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière) que se ofrecieron como voluntarios para procesar muestras de sangre y BAL; al personal administrativo de la oficina de Investigación e Innovación del Hôpital Pitié-Salpêtrière por su apoyo; L. Wakselman de la Unidad de Investigación Clínica (URC) del Hôpital Pitié-Salpêtrière por su ayuda con el cumplimiento normativo y ético; C. Fieschi por el reclutamiento de trabajadores de la salud expuestos al SARS-CoV-2; y AU Neumann por discusiones e ideas. También agradecemos a N. **Financiamiento:** DS fue apoyado para este trabajo por una beca de interfaz Pasteur / AP-HP. Este estudio fue apoyado por la Fondation de France, la Alianza marco «Tous unis contre le virus» (Fondation de France, AP-HP, Institut Pasteur) en colaboración con la Agence Nationale de la Recherche (programa ANR Flash COVID-19) y por el SARS -Programa CoV-2 de la Facultad de Medicina de los programas ICOViD de la Universidad de la Sorbona

(investigador principal: GG). El trabajo en UPBI está financiado por la subvención ANR-10-INSB-04-01 y el programa Région Ile-de-France DIM1HEALTH. **Contribuciones de autor:** A. Mathian, JF, AG, C.-EL, JM, AB y ZA reclutaron pacientes. A. Mathian, JF, PQ, AG, C.-EL, JM y ZA recopilieron datos demográficos y clínicos. DS, A. Mohr, LC, PQ, CP, KD, SF, J.-ML y PG prepararon las muestras. DS, MM, A. Mohr, LC, KD y TB diseñaron y realizaron experimentos. CG, RH y SM diseñaron ensayos serológicos. FA, TB y PC diseñaron, realizaron y analizaron ensayos de neutralización. DS, A. Mohr, LC y FA analizaron los datos. DS, A. Mohr y FA prepararon las cifras. HD revisó el análisis estadístico de los datos clínicos. DS y GG redactaron el borrador del manuscrito. DS, A. Mathian, MM, A. Mohr, OS, HY, J.-ML, ZA y GG diseñaron el estudio y revisaron el manuscrito. **Conflicto de intereses:**MM recibió honorarios por consultoría de Genalyte Inc. hace 3 años. GG es asesor científico de Luxia Scientific. Los otros autores declaran que no tienen intereses en competencia. **Disponibilidad de datos y materiales:** Todos los datos asociados con este estudio están presentes en el documento o en los Materiales Suplementarios. Las muestras de suero están disponibles a pedido razonable a GG bajo un acuerdo de transferencia de material (MTA) con Inserm. Los vectores pseudotipados y las células S-Fuse están disponibles a pedido a PC (pierre.charneau@pasteur.fr) y OS (olivier.schwartz@pasteur.fr), respectivamente, en virtud de un MTA con el Instituto Pasteur. Los reactivos utilizados para la citometría de flujo humana están todos disponibles comercialmente y no son propietarios. Este trabajo está autorizado bajo una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0), que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que el trabajo original se cite correctamente. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> . Esta licencia no se aplica a figuras / fotografías / obras de arte u otro contenido incluido en el artículo que se acredite a un tercero; obtener la autorización del titular de los derechos antes de utilizar este material.

Material suplementario

Resumen

Fig. S1 (relacionada con la [Fig. 1](#)). Expresión de anticuerpos intracelulares en plasmablastos circulantes.

Fig. S2 (relacionada con la [Fig. 1](#)). Circulación de células T_{FH} en sangre de pacientes infectados con SARS-CoV-2.

Fig. S3 (relacionada con la [Fig. 2](#)). Reproducibilidad del inmunoensayo de anillo fotónico para detectar anticuerpos anti-RBD y anti-NC.

Fig. S4 (relacionada con la [Fig. 2](#)). Detección temprana de anticuerpos anti-RBD en suero de pacientes infectados con SARS-CoV-2.

Fig. S5 (relacionada con la [Fig. 3](#)). Actividad neutralizante del suero, BAL y saliva de pacientes infectados con SARS-CoV-2.

Cuadro S1. Datos demográficos, características basales, tratamiento y resultado de 38 COVID-19 evaluados para plasmablastos sanguíneos.

Cuadro S2. Características demográficas y basales de los pacientes con COVID-19.

Cuadro S3. Características clínicas, resultados de laboratorio, tratamiento y evolución de los pacientes con COVID-19.

Cuadro S4. Títulos de IgG, IgM e IgA específicos del virus según el curso clínico de la enfermedad en pacientes con COVID-19.

Cuadro S5. Datos demográficos, características basales, tratamiento y evolución de los pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda durante el curso de COVID-19.

Cuadro S6. Anticuerpos humanos utilizados para el fenotipado de células B y T.

Archivo de datos S1. Hoja de cálculo de datos brutos.

Recursos

Archivo (abd2223_data_file_s1.xlsx)

DESCARGAR

Archivo (abd2223_raw_data.xlsx)

DESCARGAR

Archivo (abd2223_sm.pdf)

DESCARGAR

Archivo (pap.pdf)

DESCARGAR

[Vea / solicite un protocolo para este documento de *Bio-protocol* .](#)

REFERENCIAS Y NOTAS

1

S. Su, G. Wong, W. Shi, J. Liu, ACK Lai, J. Zhou, W. Liu, Y. Bi, GF Gao, Epidemiología, recombinación genética y patogénesis de coronavirus. *Trends Microbiol.* **24** , 490–502 (2016).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

2

Q.-X. Largo, B.-Z. Liu, H.-J. Deng, G.-C. Wu, K. Deng, Y.-K. Chen, P. Liao, J.-F. Qiu, Y. Lin, X.-F. Cai, D.-Q. Wang, Y. Hu, J.-H. Ren, N. Tang, Y.-Y. Xu, L.-H. Yu, Z. Mo, F. Gong, X.-L. Zhang, W.-G. Tian, L. Hu, X.-X. Zhang, J.-L. Xiang, H.-X. Du, H.-W. Liu, C.-H. Lang, X.-H. Luo, S.-B. Wu, X.-P. Cui, Z. Zhou, M.-M. Zhu, J. Wang, C.-J. Xue, X.-F. Li, L. Wang, Z.-J. Li, K. Wang, C.-C. Niu, Q.-J. Yang, X.-J. Tang, Y. Zhang, X.-M. Liu, J.-J. Li, D.-C. Zhang, F. Zhang, P. Liu, J. Yuan, Q. Li, J.-L. Hu, J. Chen, A.-L. Huang, Respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19. *Nat. Medicina.* **26** , 845–848 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

3

L. Guo, L. Ren, S. Yang, M. Xiao, D. Chang, F. Yang, CS Dela Cruz, Y. Wang, C. Wu, Y. Xiao, L. Zhang, L. Han, S. Maldita sea, Y. Xu, Q.-W. Yang, S.-Y. Xu, H.-D. Zhu, Y.-C. Xu, Q. Jin, L. Sharma, L. Wang, J. Wang, Perfilado de la respuesta humoral temprana para diagnosticar la enfermedad por coronavirus nuevo (COVID-19). *Clin. Infectar. Dis.* **71** , 778–785 (2020).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

4

NMA Okba, MA Müller, W. Li, C. Wang, CH GeurtsvanKessel, VM Corman, MM Lamers, RS Sikkema, E. de Bruin, FD Chandler, Y. Yazdanpanah, Q. Le Hingrat, D. Descamps, N. Houhou -Fidouh, CBEM Reusken, B.-J. Bosch, C. Drosten, MPG Koopmans, BL Haagmans, Respuestas de anticuerpos específicos del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo en pacientes con enfermedad por coronavirus. *Emerg. Infectar. Dis.* **26** , 1478-1488 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

5

MB Mazanec, CL Coudret, DR Fletcher, Neutralización intracelular del virus de la influenza mediante anticuerpos monoclonales anti-hemaglutinina de inmunoglobulina A. *J. Virol.* **69** , 1339-1343 (1995).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

6

MB Mazanec, CS Kaetzel, ME Lamm, D. Fletcher, J. Peterra, JG Nedrud, Neutralización intracelular de Sendai y virus de la influenza por anticuerpos monoclonales IgA. *Adv. Exp. Medicina. Biol.* **371A** , 651-654 (1995).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

7

S. Planque, M. Salas, Y. Mitsuda, M. Siencyk, MA Escobar, JP Mooney, M.-K. Morris, Y. Nishiyama, D. Ghosh, A. Kumar, F. Gao, CV Hanson, S. Paul,

Neutralización de cepas de VIH-1 genéticamente diversas por anticuerpos IgA al sitio de unión a gp120-CD4 de supervivientes a largo plazo de Infección por VIH. *AIDS* **24** , 875–884 (2010).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

8

C. Devito, J. Hinkula, R. Kaul, L. Lopalco, JJ Bwayo, F. Plummer, M. Clerici, K. Broliden, IgA mucosa y plasmática de individuos seronegativos expuestos al VIH neutralizan un aislado primario de VIH-1. *AIDS* **14** , 1917-1920 (2000).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

9

FY Liew, SM Russell, G. Appleyard, CM Brand, J. Beale, La protección cruzada en ratones infectados con el virus de la influenza A por vía respiratoria se correlaciona con el anticuerpo IgA local más que con el anticuerpo sérico o la reactividad de las células T citotóxicas. *EUR. J. Immunol.* **14** , 350-356 (1984).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

10

Y. Asahi-Ozaki, T. Yoshikawa, Y. Iwakura, Y. Suzuki, S.-i. Tamura, T. Kurata, T. Sata, Los anticuerpos IgA secretores proporcionan protección cruzada contra la infección con diferentes cepas del virus de la influenza B. *J. Med. Virol.* **74** , 328–335 (2004).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

11

A. Aina, S.-I. Tamura, T. Suzuki, E. van Riet, R. Ito, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Kurata, H. Hasegawa, La vacunación intranasal con una vacuna inactivada del virus de la influenza completa induce fuertes respuestas de anticuerpos en el suero y el moco nasal de adultos sanos. *Tararear. Vacuna. Immunother.* **9** , 1962-1970 (2013).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

12

RH Véase, AN Zakhartchouk, M. Petric, DJ Lawrence, CPY Mok, RJ Hogan, T. Rowe, LA Zitzow, KP Karunakaran, MM Hitt, FL Graham, L. Prevec, JB Mahony, C. Sharon, TC Auperin, JM Rini, AJ Tingle, DW Scheifele, DM Skowronski, DM Patrick, TG Voss, LA Babiuk, J. Gauldie, RL Roper, RC Brunham, BB Finlay, Evaluación comparativa de dos candidatos a vacuna contra el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en ratones expuestos a Coronavirus del SARS. *J. Gen. Virol.* **87** , 641–650 (2006).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

13

MH Kim, HJ Kim, J. Chang, Respuestas inmunes superiores inducidas por inmunización intranasal con una vacuna basada en adenovirus recombinante que expresa la proteína Spike de longitud completa del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio. *PLOS ONE* **14** , e0220196 (2019).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

14

K. Fink, Origen y función de los plasmablastos circulantes durante las infecciones virales agudas. *Parte delantera. Immunol.* **3** , 78 (2012).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

15

N. Xiong, Y. Fu, S. Hu, M. Xia, J. Yang, CCR10 y sus ligandos en la regulación de la inmunidad y las enfermedades epiteliales. *Protein Cell* **3** , 571–580 (2012).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

dieciséis

HE Mei, T. Yoshida, W. Sime, F. Hiepe, K. Thiele, RA Manz, A. Radbruch, T. Dörner, Las células plasmáticas humanas transmitidas por la sangre en estado estable se derivan de las respuestas inmunitarias de las mucosas. *Blood* **113** , 2461–2469 (2009).

[**CROSSREF**](#)

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

17

I. Thevarajan, THO Nguyen, M. Koutsakos, J. Druce, L. Caly, CE van de Sandt, X. Jia, S. Nicholson, M. Catton, B. Cowie, SYC Tong, SR Lewin, K. Kedzierska, Amplitud de respuestas inmunes concomitantes antes de la recuperación del paciente: reporte de un caso de COVID-19 no grave. *Nat. Medicina*. **26** , 453–455 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

18

M. Miyara, J.-L. Charuel, S. Mudumba, A. Wu, P. Ghillani-Dalbin, Z. Amoura, RW Burlingame, L. Musset, Detección en sangre total de autoanticuerpos para el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo en condiciones de prueba cercanas al paciente. *PLOS ONE* **13** , e0202736 (2018).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

19

S. Mudumba, S. de Alba, R. Romero, C. Cherwien, A. Wu, J. Wang, MA Gleeson, M. Iqbal, RW Burlingame, Photonic ring resonance es una plataforma versátil para realizar inmunoensayos multiplex en tiempo real. *J. Immunol. Métodos* **448** , 34–43 (2017).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

20

L. Grzelak, S. Temmam, C. Planchais, C. Demeret, L. Tondeur, C. Huon, F. Guivel-Benhassine, I. Staropoli, M. Chazal, J. Dufloo, D. Planas, J. Buchrieser, MM Rajah, R. Robinot, F. Porrot, M. Albert, K.-Y. Chen, B. Crescenzo-Chaigne, F. Donati, F. Anna, P. Souque, M. Gransagne, J. Bellalou, M. Nowakowski, M. Backovic, L. Bouadma, L. Le Fevre, Q. Le Hingrat, D. Descamps, A. Pourbaix, C. Laouénan, J. Ghosn, Y. Yazdanpanah, C. Besombes, N. Jolly, S. Pellerin-Fernandes, O. Cheny, M.-N. Ungeheuer, G. Mellon, P. Morel, S. Rolland, FA Rey, S. Behillil, V. Enouf, A. Lemaitre, M.-A. Créach, S. Petres, N. Escriou, P. Charneau, A. Fontanet, B. Hoen, T. Bruel, M. Eloit, H. Mouquet, O. Schwartz, S. van der Werf, Una comparación de cuatro ensayos serológicos para detectar anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en muestras de suero humano de diferentes poblaciones. *Sci. Transl. Medicina*. **12** , eabc3103 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

21

J. Buchrieser, J. Dufloo, M. Hubert, B. Monel, D. Planas, MM Rajah, C. Planchais, F. Porrot, F. Guivel-Benhassine, S. Van der Werf, N. Casartelli, H. Mouquet , T. Bruel, O. Schwartz, Formación de sincitios por células infectadas con SARS-CoV-2. *EMBO J.* **39** , e106267 (2020).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

22

DH Brann, T. Tsukahara, C. Weinreb, M. Lipovsek, K. Van den Berge, B. Gong, R. Chance, IC Macaulay, H.-J. Chou, RB Fletcher, D. Das, K. Street, HR de Bezieux, Y.-G. Choi, D. Risso, S. Dudoit, E. Purdom, JS Mill, RA Hachem, H. Matsunami, DW Logan, BJ Goldstein, MS Grubb, J. Ngai, SR Datta, Expresión no neuronal de SARS-CoV-2 Los genes de entrada en el sistema olfativo sugieren mecanismos subyacentes a la anosmia asociada a COVID-19. *Sci. Adv.* **6** , eabc5801 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

23

L. Fodoulian, J. Tuberosa, D. Rossier, BN Landis, A. Carleton, I. Rodríguez, el receptor del SARS-CoV-2 y los genes de entrada son expresados por células sustentaculares en el neuroepitelio olfatorio humano. bioRxiv 2020.03.31.013268 [**Preprint**]. 2 de abril de 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.31.013268> .

IR A LA REFERENCIA

GOOGLE ACADÉMICO

24

HY Reynolds, inmunoglobulina G y su función en el tracto respiratorio humano. *Mayo Clin. Proc.* **63** , 161-174 (1988).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

25

RH Waldman, PF Jurgensen, GN Olsen, R. Ganguly, JE Johnson III, Respuesta inmune del tracto respiratorio humano. I. Niveles de inmunoglobulina y respuesta de anticuerpos a la vacuna contra el virus de la influenza. *J. Immunol.* **111** , 38-41 (1973).

IR A LA REFERENCIA

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

26

M. Ejemel, Q. Li, S. Hou, ZA Schiller, JA Tree, A. Wallace, A. Amcheslavsky, N. Kurt Yilmaz, KR Buttigieg, MJ Elmore, K. Godwin, N. Coombes, JR Toomey, R. Schneider, AS Ramchetty, BJ Close, D.-Y. Chen, HL Conway, M. Saeed, C. Ganesa, MW Carroll, LA Cavacini, MS Klempner, CA Schiffer, Y. Wang, Un anticuerpo monoclonal IgA humano de reacción cruzada bloquea la interacción SARS-CoV-2 pico-ACE2. *Nat. Comun.* **11** , 4198 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

27

MK Boehm, JM Woof, MA Kerr, SJ Perkins, los fragmentos Fab y Fc de IgA1 exhiben una disposición diferente a la de IgG: un estudio por rayos X y dispersión de solución de neutrones y modelado de homología. *J. Mol. Biol.* **286** , 1421-1447 (1999).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

28

M. Muramatsu, R. Yoshida, A. Yokoyama, H. Miyamoto, M. Kajihara, J. Maruyama, N. Nao, R. Manzoor, A. Takada, Comparación de la actividad antiviral entre IgA e IgG específicas para la hemaglutinina del virus de la influenza: Mayor potencial de IgA para la inmunidad heterosubtípica. *PLOS ONE* **9** , e85582 (2014).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

29

AZ Wec, D. Wrapp, AS Herbert, DP Maurer, D. Haslwanter, M. Sakharkar, RK Jangra, ME Dieterle, A. Lilov, D. Huang, LV Tse, NV Johnson, C.-L. Hsieh, N. Wang, JH Nett, E. Champney, I. Burnina, M. Brown, S. Lin, M. Sinclair, C. Johnson, S. Pudi, R. Bortz III, AS Wirchnianski, E. Laudermilch, C. Florez, JM Fels, CM O'Brien, BS Graham, D. Nemazee, DR Burton, RS Baric, JE Voss, K. Chandran, JM Dye, JS McLellan, LM Walker, Broad neutralization of SARS-related virus by human monoclonal anticuerpos. *Science* **369** , 731–736 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

30

Z. Wang, JCC Lorenzi, F. Muecksch, S. Finkin, C. Viant, C. Gaebler, M. Cipolla, H.-H. Hoffmann, TY Oliveira, DA Oren, V. Ramos, L. Nogueira, E. Michailidis, DF Robbiani, A. Gazumyan, CM Rice, T. Hatzioannou, PD Bieniasz, M. Caskey, MC Nussenzweig, Enhanced SARS-CoV-2 neutralización por IgA dimérica. *Sci. Transl. Medicina.* **13** , eabf1555 (2021).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

31

D. Burnett, inmunoglobulinas en el pulmón. *Thorax* **41** , 337-344 (1986).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

32

RA Stockley, M. Mistry, AR Bradwell, D. Burnett, Un estudio de proteínas plasmáticas en la fase sol del esputo de pacientes con bronquitis crónica. *Thorax* **34** , 777-782 (1979).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

33

R. Iversen, O. Snir, M. Stensland, JE Kroll, Ø. Steinsbø, IR Korponay-Szabó, KEA Lundin, GA de Souza, LM Sollid, Fuerte relación clonal entre IgA sérica e intestinal a pesar de diferentes orígenes de células plasmáticas. *Cell Rep.* **20** , 2357-2367 (2017).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

34

JJ Bunker, SA Erickson, TM Flynn, C. Henry, JC Koval, M. Meisel, B. Jabri, DA Antonopoulos, PC Wilson, A. Bendelac, Los anticuerpos IgA polirreactivos naturales recubren la microbiota intestinal. *Science* **358** , eaan6619 (2017).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

35

M. Dullaers, D. Li, Y. Xue, L. Ni, I. Gayet, R. Morita, H. Ueno, KA Palucka, J. Banchereau, S. Oh, mecanismo dependiente de células AT para la inducción de la mucosa humana plasmablastos que secretan inmunoglobulina A en el hogar. *Inmunidad* **30** , 120-129 (2009).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

36

T. Nakayama, K. Hieshima, D. Izawa, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, O. Yoshie, Vanguardia: el perfil de la expresión del receptor de quimiocinas en las células plasmáticas humanas explica su reclutamiento eficiente para los tejidos diana. *J. Immunol.* **170** , 1136-1140 (2003).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

37

JR Mora, M. Iwata, B. Eksteen, S.-Y. Song, T. Junt, B. Senman, KL Otipoby, A. Yokota, H. Takeuchi, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Rajewsky, DH Adams, UH von Andrian, Generación de células B secretoras de IgA que se dirigen al intestino células dendríticas. *Ciencia* **314** , 1157-1160 (2006).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

38

M. Lin, L. Du, P. Brandtzaeg, Q. Pan-Hammarström, recombinación de conmutación de subclase de IgA en compartimentos inmunitarios sistémicos y mucosos humanos. *Immunol de las mucosas.* **7** , 511–520 (2014).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

39

B. He, W. Xu, PA Santini, AD Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, DM Knowles, M. Rescigno, A. Cerutti, Intestinal las bacterias desencadenan el cambio de clase de inmunoglobulina A₂ independiente de las

células T al inducir la secreción de células epiteliales de la citocina APRIL. *Immunity* **26** , 812–826 (2007).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

40

MA Berkowska, GJA Driessen, V. Bikos, C. Grosserichter-Wagener, K. Stamatopoulos, A. Cerutti, B. He, K. Biermann, JF Lange, M. van der Burg, JJM van Dongen, MC van Zelm, Human Las células B de memoria se originan a partir de tres vías de maduración independientes e independientes del centro germinal. *Blood* **118** , 2150-2158 (2011).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

41

B. Ju, Q. Zhang, J. Ge, R. Wang, J. Sun, X. Ge, J. Yu, S. Shan, B. Zhou, S. Song, X. Tang, J. Yu, J. Lan, J. Yuan, H. Wang, J. Zhao, S. Zhang, Y. Wang, X. Shi, L. Liu, J. Zhao, X. Wang, Z. Zhang, L. Zhang, anticuerpos neutralizantes humanos provocados por infección por SARS-CoV-2. *Nature* **584** , 115-119 (2020).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

42

R. Shi, C. Shan, X. Duan, Z. Chen, P. Liu, J. Song, T. Song, X. Bi, C. Han, L. Wu, G. Gao, X. Hu, Y. Zhang, Z. Tong, W. Huang, WJ Liu, G. Wu, B. Zhang, L. Wang, J. Qi, H. Feng, F.-S. Wang, Q. Wang, GF Gao, Z. Yuan, J. Yan, Un anticuerpo neutralizante humano se dirige al sitio de unión al receptor del SARS-CoV-2. *Nature* **584** , 120-124 (2020).

[**IR A LA REFERENCIA**](#)

[**CROSSREF**](#)

[**PUBMED**](#)

[**GOOGLE ACADÉMICO**](#)

43

X. Lu, L. Zhang, H. Du, J. Zhang, YY Li, J. Qu, W. Zhang, Y. Wang, S. Bao, Y. Li, C. Wu, H. Liu, D. Liu , J. Shao, X. Peng, Y. Yang, Z. Liu, Y. Xiang, F. Zhang, RM Silva, KE Pinkerton, K. Shen, H. Xiao, S. Xu, GWK Wong; Equipo de estudio del nuevo coronavirus pediátrico chino, infección por SARS-CoV-2 en niños. *N. Engl. J. Med.* **382** , 1663–1665 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

44

P. Zimmermann, N. Curtis, Infecciones por coronavirus en niños, incluido COVID-19: una descripción general de la epidemiología, las características clínicas, el diagnóstico, el tratamiento y las opciones de prevención en los niños. *Pediatr. Infectar. Dis. J.* **39** , 355–368 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

45

D. Sterlin, J. Fadlallah, O. Adams, C. Fieschi, C. Parizot, K. Dorgham, A. Rajkumar, G. Autaa, H. El-Kafsi, J.-L. Charuel, C. Juste, F. Jönsson, T. Candela, H. Wardemann, A. Aubry, C. Capito, H. Brisson, C. Tresallet, RD Cummings, M. Larsen, H. Yssel, S. von Gunten, G. Gorochov, la IgA humana se une a una amplia gama de bacterias comensales. *J. Exp. Medicina.* **217** , e20181635 (2020).

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

46

M. Norman, T. Gilboa, AF Ogata, AM Maley, L. Cohen, Y. Cai, J. Zhang, JE Feldman, BM Hauser, TM Caradonna, B. Chen, AG Schmidt, G. Alter, RC Charles, ET Ryan, DR Walt, perfil de alta resolución ultrasensible de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para detectar la seroconversión temprana en pacientes con COVID-19. medRxiv 2020.04.28.20083691. (2020).

IR A LA REFERENCIA

GOOGLE ACADÉMICO

47

H.-q. Yu, B.-q. Sol, Z.-f. Fang, J.-c. Zhao, X.-y. Liu, Y.-m. Li, X.-z. Sol, H.-f. Liang, B. Zhong, Z.-f. Huang, P.-y. Zheng, L.-f. Tian, H.-q. Qu, D.-c. Liu, E.-y. Wang, X.-j. Xiao, S.-y. Li, F. Ye, L. Guan, D.-s. Hu, H. Hakonarson, Z.-g. Liu, N.-s. Zhong, Características distintivas de la respuesta de IgA específica del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19. *EUR. Respir. J.* **56** , 2001526 (2020).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO

48

MC Iglesias, K. Mollier, A.-S. Beignon, P. Souque, O. Adotevi, F. Lemonnier, P. Charneau, Los vectores lentivirales que codifican poliepítopos de VIH-1 inducen amplias respuestas CTL in vivo. *Mol. El r.* **15** , 1203-1210 (2007).

IR A LA REFERENCIA

CROSSREF

PUBMED

GOOGLE ACADÉMICO