

# La inmunidad celular altamente funcional en los no seroconvertidores del SARS-CoV-2 está asociada con la protección inmunológica

[\\_Ver perfil ORCID](#)Athina Kilpeläinen [\\_Ver perfil ORCID](#)Esther Jiménez-Moyano [\\_Ver perfil ORCID](#)Oscar Blanch-Lombarte [\\_Ver perfil ORCID](#)Dan Ouchi [\\_Ver perfil ORCID](#)Ruth Peña [\\_Ver perfil ORCID](#)Bibiana Quirant-Sanchez [\\_Ver perfil ORCID](#)Anna Chamorro [\\_Ver perfil ORCID](#)Ignacio Blanco [\\_Ver perfil ORCID](#)Eva Martínez-Caceres [\\_Ver perfil ORCID](#)Roger Paredes [\\_Ver perfil ORCID](#)Lourdes Mateu [\\_Ver perfil ORCID](#)Jorge Carrillo [\\_Ver perfil ORCID](#)Julià Blanco [\\_Ver perfil ORCID](#)Christian Brander [\\_Ver perfil ORCID](#)Marta Massanella [\\_Ver perfil ORCID](#)Bonaventura Clotet [\\_Ver perfil ORCID](#)Julia G. Prado  
**doi:**<https://doi.org/10.1101/2021.05.04.438781>

Este artículo es una preimpresión y no ha sido certificado por revisión por pares [[¿qué significa esto?](#)].  
00000487

- [Resumen](#)
- [Texto completo](#)
- [Información / Historia](#)
- [Métrica](#)
- [Vista previa del PDF](#)

## RESUMEN

El papel de las células T en el control de la infección por SARS-CoV-2 se ha subestimado a favor de los anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, la inmunidad celular es esencial para el control viral a largo plazo y la protección contra la gravedad de la enfermedad. Para comprender la inmunidad de las células T en ausencia de generación de anticuerpos, nos centramos en un grupo de no seroconvertidores (NSC) del SARS-CoV-2 recuperados de la infección. Realizamos un análisis comparativo inmunológico de individuos infectados con SARS-CoV-2 estratificados por la ausencia o presencia de seroconversión y la gravedad de la enfermedad. Divulgamos altos niveles de células T CD8 + vírgenes y bajas totales efectoras en NSC. Además, las respuestas de células T CD8 + específicas de nucleocápside (NP) polifuncionales, así como los niveles reducidos de activación de células T controlados por PD-1 y marcadores inducidos por activación, fueron rasgos inmunológicos distintivos en NSC. Los datos longitudinales apoyan la estabilidad del fenotipo NSC durante tres meses. Nuestros resultados implican respuestas de células T NP y pico de SARS-CoV-2 altamente funcionales con baja activación inmune en la protección de la gravedad de la enfermedad en ausencia de seroconversión.

**RESUMEN** Para comprender la inmunidad de células T específica de SARS-CoV-2 en ausencia de seroconversión, caracterizamos las características inmunológicas de los no seroconvertidores recuperados de la infección. Las respuestas de células T específicas altamente funcionales y la baja activación inmune fueron determinantes de la protección inmune frente a enfermedades graves.

---

## INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19 es causada por el SARS-CoV-2, el coronavirus más reciente que se cruza en la población humana. La pandemia ocasiona millones de

personas infectadas y más de 2 millones de muertes en todo el mundo. A pesar del éxito científico en la generación rápida de vacunas contra el SARS-CoV-2, el número de personas infectadas y la carga sobre los sistemas de salud continúa ( [Chang et al., 2020](#) ). En consecuencia, se necesita con urgencia la caracterización continua de las características funcionales de la protección inmunitaria para el control y la prevención de la infección por SARS-CoV-2.

El resultado de la enfermedad de la infección por SARS-CoV-2 se asocia con un amplio grado de heterogeneidad interindividual. Estas divergencias pueden estar asociadas con el nivel de inmunocompetencia y el estrecho equilibrio entre el control inmunológico y la inmunopatogénesis después de la infección ( [Blanco-Melo et al., 2020](#) ). De hecho, se han descrito aspectos beneficiosos y perjudiciales de las respuestas inmunitarias provocadas por la infección por SARS-CoV-2. Como aspectos perjudiciales, las complicaciones secundarias multiorgánicas y la sintomatología persistente durante meses en aproximadamente el 10% del total de personas infectadas o “COVID prolongado” ( [Marshall, 2020](#) ) se han asociado con la persistencia de perfiles inflamatorios y daño tisular. Como aspectos beneficiosos, las respuestas inmunes celulares y humorales se han relacionado con la protección de la gravedad de la enfermedad frente a otros coronavirus como el SARS-CoV-1 ( [Li et al., 2006](#) ) y la inducción de respuestas de memoria de células B y T se ha descrito en la mayoría de los casos. de los individuos recuperados de la infección por SARS-CoV-2 ( [Dan et al., 2021](#) ).

Los resultados de la enfermedad se han correlacionado con firmas tempranas de mediadores solubles, incluidos factores de crecimiento, citocinas de tipo 2/3, citocinas de tipo 1/2/3 y quimiocinas en la infección por SARS-CoV-2 ( [Lucas et al., 2020](#) ). Las perturbaciones celulares y los perfiles inmunes se han relacionado con la gravedad de la enfermedad ( [Kuri-Cervantes et al., 2020](#) ; [Wilk et al., 2020](#) ; [Mathew et al., 2020](#) ). Además, se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes predicen la gravedad y la supervivencia ( [García-Beltran et al., 2021](#) ). Sin embargo, los títulos altos de anticuerpos neutralizantes no se correlacionan positivamente con un resultado clínico menos grave ( [Trinité et al., 2021](#) ; [Rydyznski Moderbacher et al., 2020](#) ).

Las respuestas antivirales de células T CD4 + y CD8 + son clave en el control natural de las infecciones virales ( [Noel et al., 2016](#) ; [Pereyra et al., 2010](#) ; [Kiepiela et al., 2007](#) ). Los datos emergentes de los modelos animales del SARS-CoV-2 apoyan el papel de la inmunidad de las células T como correlato de la protección contra la infección ( [McMahan et al., 2021](#) ) y las respuestas de las células T CD4 + y CD8 + específicas del virus se consideran actores clave en la resolución y protección a largo plazo contra la infección ( [Peng et al., 2020](#) ). Se ha descrito la presencia de respuestas de células T SARS-CoV-2 CD4 + y CD8 + hasta 6 meses después de la infección en curso clínico leve a moderado y alteraciones inmunológicas persistentes en el compartimento de la memoria ( [Breton et al., 2021](#) ; [Dan y col., 2021](#) ). Además, se ha propuesto la protección a través de respuestas preexistentes de células T CD4 + de reacción cruzada al SARS-CoV-2 a otros coronavirus en una fracción de individuos como un mecanismo que limita la gravedad de la enfermedad ( [Mateus et al., 2020](#) ; [Sekine et al., 2020](#) ). Estos y otros estudios apoyan la relevancia de la inmunidad celular en el control y prevención de la infección por SARS-CoV-2.

La caracterización fenotípica y funcional de la inmunidad celular contra el SARS-CoV-2 en ausencia de patogénesis inmunitaria sigue siendo limitada, pero es esencial para identificar los determinantes de la protección inmunitaria frente a la infección y la gravedad de la enfermedad. Para obtener conocimientos más profundos sobre la protección inmunitaria celular, nos centramos en un grupo de no seroconvertidores (NSC) del SARS-CoV-2, definidos como individuos con infección confirmada por SARS-CoV-2 en ausencia de generación de anticuerpos y comparamos su total y el virus. -células T específicas a individuos que seroconvirtieron. Se ha demostrado la falta de seroconversión en la infección por

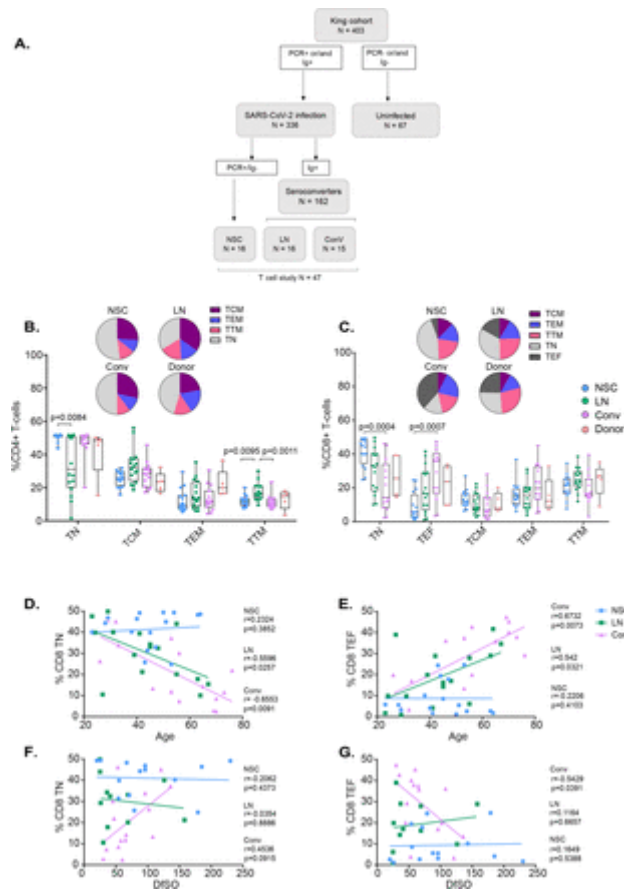
SARS-CoV-2 en el 2-17% de los individuos convalecientes ( [Schulien et al., 2021](#) ; [Schwarzkopf et al., 2021](#) ; [Sekine et al., 2020](#) ; [Staines et al., 2021](#)) y se han observado respuestas celulares en 41 a 78% de estos individuos ( [Schwarzkopf et al., 2021](#) ; [Sekine et al., 2020](#)). Actualmente, la caracterización funcional de las respuestas de las células T en NSC sigue siendo limitada debido al bajo número de individuos identificados, la falta de confirmación de la infección por SARS-CoV-2 por PCR o el enfoque específico en las células T CD8 +. Para llenar este vacío, caracterizamos las respuestas de células T CD4 + y CD8 + específicas de SARS-CoV-2 en NSC en términos de paisaje celular, función y perfil de activación y las comparamos con las respuestas detectadas en individuos recuperados que seroconvirtieron estratificados por el grado de actividad neutralizante viral y gravedad de la enfermedad del SARS-CoV-2. Nuestros análisis identifican rasgos inmunológicos diferenciales en NSC, incluida la distribución sesgada de células T CD8 + hacia un aumento en poblaciones vírgenes y respuestas de células T CD8 + específicas de la proteína nucleocápside polifuncional (NP) SARS-CoV-2 en ausencia de activación inmune manifiesta. Nuestros datos destacan una contribución esencial y no redundante de la inmunidad de las células T contra el SARS-CoV-2 en la protección inmunológica frente a la gravedad en ausencia de inmunidad humoral. Nuestros análisis actuales de la inmunidad de las células T del SARS-CoV-2 proporcionan la información necesaria para el seguimiento clínico y la orientación de futuras intervenciones inmunitarias.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Participantes del estudio

La cohorte de extensión KING está compuesta por 336 personas infectadas con SARS-CoV-2, incluidas 120 personas que requirieron hospitalización, 22% de las cuales con infección grave o crítica por SARS-CoV-2 ( [Figura 1A](#) ). Para el presente estudio, identificamos participantes (N = 52) (mediana de edad 47 años, 62% mujeres, 38% hombres) entre No seroconvertidores (NSC, n = 16), neutralizadores bajos (LN, N = 16) y convalecientes (Conv, N = 15) ( [Figura 1A](#)). Además, obtuvimos muestras de donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña antes de 2019 como controles (Donante, N = 5). Los NSC representan el 4,8% de la cohorte de extensión King y se definieron como individuos infectados con SARS-CoV-2 confirmados por PCR sin IgG, IgA e IgM de SARS-CoV-2 detectables mediante dos ELISA independientes (interno e IMD). Además, la falta de seroconversión se confirmó en 10 NSC una mediana de 94,5 días después del inicio de los síntomas y se dispuso de seguimiento longitudinal para 6 de ellos. Los LN se definieron por tener anticuerpos anti-SARS-CoV-2 detectables con títulos de neutralización <500 valores de CI50 medidos por ensayo de neutralización de pseudovirus. Los grupos de estudio se estratificaron según la presencia o ausencia de seroconversión, títulos de neutralización viral y gravedad de la enfermedad del SARS-CoV-2. Las características clínicas de los participantes se resumen en [Cuadro 1](#) . Todos los métodos y protocolos experimentales del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Germans Trias i Pujol (PI-20-217). Todos los sujetos del estudio proporcionaron su consentimiento informado por escrito para participar. El estudio se realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki.



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

**Figura 1. Distribución de subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + en no seroconvertidores.**

(A) Diagrama de flujo de los grupos de estudio, incluidos No seroconvertidores (NSC), Neutralizadores bajos (LN), Convalecientes (Conv) y muestras de donantes de sangre (Donante). (B,C) Las PBMC criopreservadas se cultivaron y se tiñeron en la superficie con anticuerpos dirigidos a CD4 y CD8, así como marcadores de linaje de células T CD45RA, CCR7, CD27 para distinguir las células de memoria central T (TCM), las células de memoria efectoras T (TEM), las células T transicionales células de memoria (TTM), células T naive (TN) y células T efectoras (TEF). Los gráficos de bigotes muestran las frecuencias de los subconjuntos de células T CD4 + y los gráficos circulares representan la distribución de frecuencias de los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + en cada grupo (Panel B y C, respectivamente). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis, ajustado para comparaciones múltiples). En la figura solo se indican los valores significativos. Se realizó una regresión lineal graficando las frecuencias relativas de CD8 + TN (D) y CD8 + TEF (E) frente a la edad de los participantes del estudio, así como las frecuencias relativas de CD8 + TN (F) y CD8 + TEF (G) frente a los días desde el inicio de los síntomas (DFSO). El análisis de correlación se realizó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman; Los valores r y p se informan para cada grupo.

• [Ver en línea](#)

• [Ver ventana emergente](#)

**Tabla 1. Características clínicas de los grupos de estudio**

**Determinación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas**

La presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en muestras de suero o plasma se evaluó mediante dos ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) independientes. El primero fue un ELISA tipo sándwich desarrollado internamente. Brevemente, las placas de ELISA Nunc MaxiSorp se recubrieron durante la noche a 4 ° C con 50 ml de anticuerpo de captura (anticuerpo anti-6xHis, clon HIS.H8; ThermoFisher Scientific) a 2 mg / ml en PBS. Después del lavado, las placas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente utilizando PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA, Miltenyi biotech). 50 ml (1 mg / ml en tampón de bloqueo) de los siguientes antígenos derivados del SARS-CoV-2: se añadieron posteriormente las subunidades S1 + S2 de la proteína Spike (S) y el dominio de unión al receptor (RBD, Sino Biological) y se incubaron durante la noche a 4 ° C. Cada muestra de plasma se evaluó por duplicado a una dilución 1/100 en tampón de bloqueo para cada antígeno. Los pocillos libres de antígeno también se evaluaron en paralelo para cada muestra en la misma placa para evaluar el fondo de la muestra. Se utilizaron como estándar diluciones seriadas de una muestra de plasma positiva. Se incluyó como control negativo un conjunto de 10 muestras de plasma negativas para SARS-CoV-2, recolectadas antes de junio de 2019. Las muestras se analizaron a una dilución 1/100 en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Los siguientes reactivos se utilizaron como anticuerpos secundarios: HRP conjugado (Fab) 2 anti-IgG humana de cabra (específico de Fc) (1/20000), anti-IgM humana de cabra (1/10000) e IgA antihumana de cabra (cadena alfa específico) (1/20000) (todos de Jackson Immunoresearch). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se revelaron usando diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) (Sigma Aldrich) y la reacción enzimática se detuvo con 4N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich). La señal se analizó como la densidad óptica (DO) a 492 nm con corrección de ruido a 620 nm. La señal específica para cada antígeno se calculó después de restar la señal de fondo obtenida para cada muestra en los pocillos libres de antígeno. El segundo ELISA fue un ELISA de anticuerpos de clase IgM e IgG disponible comercialmente contra el SARS-CoV-2 NP (ImmunoDiagnostics, Hong Kong). Brevemente, las muestras de suero se diluyeron 1: 100 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-NP fueron capturados por proteína recombinante NP inmovilizada. Después de la incubación, los anticuerpos capturados se midieron mediante un lector de microplacas de absorbancia a 450 nm. Los resultados de anticuerpos se expresaron como un valor de índice, calculado como la relación entre el valor de DO de cada muestra y el valor de DO del cut-off (0,200). La prueba se consideró positiva cuando el valor del índice era  $\geq 1,1$ , límite cuando el valor del índice era  $\geq 0,9$  a  $<1,1$  y negativo cuando el valor del índice era  $<0,9$ .

### **Ensayo de neutralización de pseudovirus**

Se generaron pseudovirus informadores del VIH que expresan la proteína SARS-CoV-2 S y luciferasa. pNL4-3.Luc.R-E- se obtuvo del depósito del NIH AIDS (Connor RI, Chen BK, 195). Se generó SARS-CoV-2.Sct $\Delta$ 19 (Geneart) a partir de la secuencia completa del gen SARS-CoV-2 S con una delección de los últimos 19 codones C-terminales ( [Ou et al., 2020](#) ), codón humano optimizado e insertado en pcDNA3.4-TOPO. Se transfectaron células Expi293F usando el reactivo de expifectamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) con pNL4-3.Luc.R-E- y SARS-CoV-2.Sct $\Delta$ 19 en una proporción de 8: 1, respectivamente. Los pseudovirus de control se obtuvieron reemplazando el plásmido de expresión de la proteína S con un plásmido de expresión de la proteína VSV-G como se informó anteriormente ( [Ou et al., 2020](#) ). Los sobrenadantes se recogieron 48 h después de la transfección, se filtraron a 0,45  $\mu$ m, se congelaron y se valoraron en células HEK293T que sobreexpresan la ACE-2 humana WT (Integral Molecular, EE.UU.). Para el ensayo de neutralización, se preincubaron 200 TCID<sub>50</sub> de sobrenadante pseudoviral con

diluciones seriadas de muestras de suero o plasma inactivadas por calor (que varían de 1/60 a 1/14580) durante 1 hora a 37 ° C y luego se agregaron a células HEK293T que sobreexpresan ACE2. Después de 48 h, las células se lisaron con reactivo Britelite Plus Luciferase (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) y se midió la luminiscencia durante 0,2 s con el lector de placas multimodo EnSight (Perkin Elmer). Los datos se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros con pendiente variable utilizando el software Graph Pad Prism (v8.3.0). Los valores de CI50 se expresan como dilución recíproca.

### **Inmunofenotipo de respuestas de células T de SARS-CoV-2 S y NP**

Para medir las respuestas de células T específicas del SARS-CoV-2, se estimularon las PBMC criopreservadas con proteínas recombinantes S y NP totales (5 µg / mL, Sinobiological, China), enterotoxina B estafilocócica (SEB) (1 µg / mL, Sigma-Aldrich), o sin estímulos, en presencia de moléculas coestimuladoras de CD28 / 49d (1 µg / mL, BD) durante 17 h a 37 ° C en un 5% de CO<sub>2</sub> incubadora. Después de la incubación, las PBMC se trataron con Monensina A (1 µg / mL, BD Golgi STOP, Thermo Fisher Scientific) durante 6 h a 37 ° C y se almacenaron durante la noche a 4 ° C. Al día siguiente, las células se tiñeron con una combinación de marcadores de linaje de células T y marcadores funcionales para inmunofenotipificación. En resumen, las células se marcaron con un tinte de viabilidad (APC-Cy7, Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) y la superficie se tiñó durante 30 minutos a RT con anticuerpos antihumanos para CD3 (A700, clon UCHT1, BD), CD4 (FITC, clon OKT4, Biolegend), CD8 (V500, clon RPA-T8, BD), CD45RA (BV786, clon HI100, BD), CCR7 (PE-CF594, clon 150503, BD), CD27 (BV605, clon L128, BD), PD-1 (BV421, clon EH12.1, BD) y marcadores inducidos por activación (AIM) CD25 (A647, clon BC96, Biolegend), OX40 (PE, clon Ber-ACT35, Biolegend) y CD137 (PeCy7 clon 41BB, Biolegend). Posteriormente, las células se fijaron con Fix / Perm Buffer A (Thermo Fisher Scientific) durante 15 min a TA y se tiñeron intracelularmente con Fix / Perm Buffer B y anticuerpos para TNF (PE-Cy7, clon MAb11, BioLegend), IFN-γ (BV711, clon B27, BD) e IL-2 (BV650, clon MQ1-17H12, BD) durante 20 min a TA. Finalmente, las células se resuspendieron y fijaron en formaldehído al 1% y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa utilizando el software FACSDiVa (BD). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron según la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA Las células se fijaron con Fix / Perm Buffer A (Thermo Fisher Scientific) durante 15 min a TA y se tiñeron intracelularmente con Fix / Perm Buffer B y anticuerpos para TNF (PE-Cy7, clon MAb11, BioLegend), IFN-γ (BV711, clon B27, BD) e IL-2 (BV650, clon MQ1-17H12, BD) durante 20 min a TA. Finalmente, las células se resuspendieron y fijaron en formaldehído al 1% y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa utilizando el software FACSDiVa (BD). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron en función de la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA Las células se fijaron con Fix / Perm Buffer A (Thermo Fisher Scientific) durante 15 min a TA y se tiñeron intracelularmente con Fix / Perm Buffer B y anticuerpos para TNF (PE-Cy7, clon MAb11, BioLegend), IFN-γ (BV711, clon B27, BD) e IL-2 (BV650, clon MQ1-17H12, BD) durante 20 min a TA. Finalmente, las células se resuspendieron y fijaron en formaldehído al 1% y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa utilizando el software FACSDiVa (BD). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Las puertas específicas se definieron utilizando

controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron en función de la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA clon B27, BD) e IL-2 (BV650, clon MQ1-17H12, BD) durante 20 min a TA. Finalmente, las células se resuspendieron y fijaron en formaldehído al 1% y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa utilizando el software FACSDiVa (BD). El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron en función de la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA clon B27, BD) e IL-2 (BV650, clon MQ1-17H12, BD) durante 20 min a TA. Finalmente, las células se resuspendieron y fijaron en formaldehído al 1% y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa utilizando el software FACSDiVa (BD). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron según la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron según la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA Las puertas específicas se definieron utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMO). Los marcadores de superficie se midieron en células T CD4 + y CD8 + totales. Los subconjuntos de células T CD4 + y CD8 + se diferenciaron según la expresión de CD27 y CCR7: naïve (TN: CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>), efector (TEF: CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, solo para CD8<sup>+</sup>), memoria central (TCM: CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>), memoria de transición (TTM: CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>) y memoria efectora (TEM: CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>), como se describió anteriormente ( [Klatt et al., 2014](#) ; [Blanch-lombarte et al., 2019](#) ) ( [Fig. Complementaria S1A-B](#) ). La frecuencia de respuestas de citocinas de células T contra proteínas S y / o NP se definió por la presencia de al menos una citocina. Además, la frecuencia de respondedores totales de células T contra proteínas S y / o NP se definió por la presencia de al menos una citocina y / o AIM. Utilizamos un valor de corte de 0,2% para la positividad después de la resta de fondo.

- [Descargar figura](#)

- [Abrir en una pestaña nueva](#)

**Figura S1. Evolución longitudinal de subconjuntos de células T y respuestas específicas de antígeno en no seroconvertidores de SARS-CoV-2.**

Los marcadores de células T se evaluaron en dos momentos de muestreo en no seroconvertidores. (A) Estrategia de compuerta para la diferenciación de subconjuntos en células T CD4 +, (B) y células T CD8 +. Los cambios en las distribuciones del subconjunto de células T se representan mediante gráficos circulares que muestran la distribución del subconjunto de células T CD4 + y CD8 + en el momento de muestreo 1 y 2 (TP1 y TP2) (C) y gráficos que representan los valores del subconjunto normalizado dentro de los fenotipos (D). Las diferencias en la producción de citocinas y los marcadores inducidos por activación entre S1 y S2 en respuesta a S y NP se muestran en (E), y la expresión de PD-1 en células T CD4 + y CD8 + en células no estimuladas, estimuladas con S y NP en TP1 y TP2 se muestran en (F).

**Análisis estadístico**

Las pruebas descriptivas y de comparación se realizaron utilizando Graph Pad Prism, versión 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizaron pruebas ANOVA no paramétricas (Kruskal Wallis) para comparaciones grupales y se ajustaron para comparaciones múltiples. Se utilizaron pruebas de rango con signo de pares emparejados de Wilcoxon para comparar parámetros entre puntos de tiempo de muestreo. Se utilizó la prueba del coeficiente de correlación de rangos de Spearman para el análisis de correlación. Se utilizó ANOVA no paramétrico para comparar las diferencias de edad entre los grupos de estudio y se ajustó para comparaciones múltiples (prueba de Dunn). En el análisis de subconjuntos de células T, los valores medios dentro de los fenotipos se normalizaron al 100%. El análisis unicelular se realizó utilizando el paquete estadístico R (v3.6.3). Las células fueron compensadas y seleccionadas en función de su expresión de antígeno (TNF, IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y normalizados antes de realizar la reducción de



dimensionalidad UMAP. Usamos FlowJo 10.0.7 para la representación gráfica del análisis unicelular.

---

## RESULTADOS

### Los no seroconvertidores presentan una distribución de células T sesgada hacia

#### células T CD8 + vírgenes y efectoras más bajas

Estudios anteriores han demostrado alteraciones en los parámetros inmunológicos después de la infección por SARS-CoV-2, incluida la linfopenia con una marcada disminución de las células T CD8 +, así como cambios en las frecuencias de los subconjuntos de células T CD8 + en comparación con donantes sanos ( [Mathew et al., 2020](#) ; [Zhao et al., 2020](#) ). Determinamos los perfiles de diferenciación de las células T totales en NSC mediante tinción para CD3, CD4 y CD8 marcadores y marcadores de diferenciación (CD45RA / RO, CCR7 y CD27) y se compararon entre los grupos de estudio ( [Fig 1A](#) , [S1A-B](#) ). No se encontraron alteraciones en las frecuencias totales de células T CD3 + o en las proporciones CD4 + / CD8 + entre los grupos de estudio del SARS-CoV-2 ni en comparación con donantes sanos (datos no mostrados). Por el contrario, el análisis de los subconjuntos de células T CD4 + reveló niveles más altos de células T CD4 + naïve en NSC en comparación con LN y ( $p = 0,0084$ , [Fig 1B](#) ) niveles más bajos de células de memoria de transición T (TTM) en NSC y Conv en comparación con LN ( $p = 0,0095$  y  $p = 0,0011$ , respectivamente, [figura 1B](#) ). No se observaron diferencias significativas con respecto a la distribución de los otros subconjuntos de células T CD4 + ( [Fig. 1B](#) ). Curiosamente, observamos marcadas diferencias en los subconjuntos de células T CD8 +, al comparar los grupos NSC y Conv ( [Fig 1C](#) ). Específicamente, NSC tuvo frecuencias significativamente más altas de CD8 + T naïve (TN, mediana 44.6% vs 14.3%;  $p = 0.0004$ ) y frecuencias significativamente más bajas de células efectoras CD8 + T (TEF) (mediana 5.6% vs 35.8%;  $p = 0.0007$ , Kruskal -Wallis). En el NSC, la distribución del subconjunto de células T observada fue estable hasta una mediana de 92,5 días de seguimiento después de la infección ( [Fig. S1C-D](#) ). Para evaluar si la diferencia en la distribución de CD8 + TN y TEF en NSC estaba relacionada con la edad de los individuos o con los días desde el inicio de los síntomas (DfSO), realizamos análisis de correlación. No encontramos una correlación significativa entre la edad y las frecuencias de CD8 + TN ni TEF en NSC ( [Fig.1D-E](#) ). Por el contrario, hubo una correlación negativa significativa entre la frecuencia de CD8 + TN y la edad (Spearman  $r = -0,5596$ ,  $p = 0,0257$  y  $r = -0,6553$ ,  $p = 0,0091$ ) y una correlación positiva significativa entre la frecuencia de CD8 + TEF y la edad ( $r = 0,5420$ ,  $p = 0.0321$  y  $r = 0.6732$ ,  $p = 0.0073$ ) en los grupos LN y Conv, respectivamente ( [Fig.1D-E](#) ). De manera similar, aunque no encontramos una correlación significativa entre DfSO y CD8 + TN o TEF en NSC, se observó una correlación negativa entre CD8 + TEF% y DfSO en Conv ( $r = -0,5429$ ,  $P = 0,0391$ ) ( [Fig 1F-G](#) ). Tomados en conjunto, estos datos indican una distribución sesgada del subconjunto de células T CD8 + en NSC hacia niveles altos de células efectoras vírgenes y niveles bajos independientemente del momento de muestreo o de la edad del paciente.

### Respuestas de células T CD4 + y CD8 + específicas de SARS-CoV-2 altamente

#### funcionales en no seroconvertidores

La importancia de las respuestas funcionales de las células T específicas del virus en el resultado de la enfermedad del SARS-CoV-2 se ha informado de manera constante ( [Rydzynski Moderbacher et al., 2020](#) ; [Liao et al., 2020](#) ). Además, se han identificado respuestas de células T contra las proteínas S, NP y M SARS-CoV-2 en individuos seronegativos convalecientes ( [Schulien et al., 2021](#) ; [Schwarzkopf et al., 2021](#) ). Para evaluar las respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 en NSC y los grupos de estudio comparativo, estimulamos PBMC con proteínas S y NP

SARS-CoV-2 y realizamos tinción de citocinas intracelulares para la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF ( [Fig. 2](#) ). La visualización de perfiles de citocinas en células T específicas de antígeno según se realiza mediante análisis UMAP se representa en [Figura S2](#) . El análisis de las respuestas de células T CD4 + específicas de S y NP reveló la producción de citocinas específicas de antígeno en todos los grupos de estudio ( [Figura 2A](#) ) y sin diferencias significativas en la frecuencia de células T CD4 + específicas de S y NP entre NSC y los otros grupos de SARS-CoV-2 para cualquiera de las citocinas estudiadas. Sin embargo, LN mostró una producción de IFN- $\gamma$  específico de NP significativamente menor que Conv ( $p = 0.0402$ ). La falta de diferencias estadísticamente significativas entre NSC y Conv podría estar asociada con la alta variabilidad interindividual, a pesar de la menor frecuencia media de respuestas de linfocitos T CD4 + específicos de NP en individuos NSC frente a Conv. La diferencia en la frecuencia media fue particularmente marcada para la citocina proinflamatoria TNF en NSC en comparación con Conv (0.07% vs 1% en TNF, 0.01% vs 0.3% en IFN- $\gamma$  y 0% vs 0.26% en IL-2, respectivamente; [Fig. 2A](#)). De manera similar a las células T CD4 + específicas de SARS-CoV-2, las respuestas de células T CD8 + específicas de S y NP estuvieron presentes en todos los grupos de estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos y se observó una marcada variabilidad interindividual ( [Fig. 2B](#) ). Además, las frecuencias medias de células T CD8 + específicas de NP productoras de IFN- $\gamma$  o TNF fueron menores en NSC frente a Conv (0.06% vs 0.23% en TNF y 0.05% vs 0.24% para IFN- $\gamma$ , respectivamente; [Fig 2B](#)). A continuación, determinamos la frecuencia de respondedores de citocinas de células T en los grupos de estudio definidos por la presencia de células T S o NP CD4 + o CD8 + que producen al menos una citocina y utilizan un umbral de corte del 0,2% para una respuesta positiva después del trasfondo. sustracción. En general, la frecuencia de pacientes que respondieron al SARS-CoV-2 fue del 81% en NSC, 75% en LN, 80% en Conv y 20% en donantes sanos. Distribuida por las proteínas SARS-CoV-2, observamos una frecuencia de respondedores S en el 56% de las NSC, el 50% de las LN, el 53% de las Conv y el 20% de los donantes sanos. La frecuencia de respondedores NP fue 50% de NSC, 44% de NL, 73% de Conv y 0% de donantes sanos. Estos datos son consistentes con estudios previos que demuestran la presencia de células T reactivas al SARS-CoV-2 en individuos convalecientes seronegativos al SARS-CoV-2 y en hasta el 50% de los individuos no expuestos ( [Grifoni et al., 2020](#) ; [Mateus et al., 2020](#) ; [Sekine et al., 2020](#) ).

- [Descargar figura](#)

- [Abrir en una pestaña nueva](#)

**Figura S2. Expresión de citocinas en células T CD4 + y CD8 + de no seroconvertidores y personas convalecientes seropositivas**

Análisis unicelular basado en la expresión de antígenos (intensidad de TNF, IL-2 e IFN- $\gamma$ ) mediante reducción de dimensionalidad UMAP en células T CD4 + después de la estimulación con S (A) y NP (B), así como células T CD8 + estimuladas con S (C) y NP (D).

- [Descargar figura](#)

- [Abrir en una pestaña nueva](#)

**Figura 2. Células T de SARS-CoV-2 Los no seroconvertidores producen citocinas proinflamatorias (polifuncionales) en respuesta a Spike y Nucleocapsid.**

Las PBMC criopreservadas de los no seroconvertidores (NSC) del SARS-CoV-2 y los grupos de estudio comparativo, los neutralizadores bajos (LN), los convalecientes (Conv) y las muestras de donantes de sangre sanos (donantes) se estimularon durante 17 horas con Spike (S) y nucleocápside. proteínas (NP). Se utilizó una condición no estimulada como control. La producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF se controló mediante análisis de citometría de flujo después de la tinción de citocinas intracelulares. (AB) Los paneles de la izquierda representan la estrategia de activación para el análisis de la expresión de citocinas y los paneles de la derecha representan las frecuencias de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF en las células T CD4 + (A) y CD8 (B) en todos los grupos de estudio en respuesta a S y NP. Los gráficos circulares demuestran las proporciones relativas de células T que producen una, dos o tres citocinas en respuesta a S en las células T CD4 + y las células T CD8 + (C). Proporciones relativas de células T que producen uno, dos o tres citocinas en respuesta a NP en células T CD4 + y células T CD8 + (D). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) ajustado para comparaciones múltiples. Las barras de error representan el rango intercuartílico y se muestran los valores medianos por grupo. En la figura solo se indican las diferencias significativas.

Las células T polifuncionales se han asociado con respuestas inmunitarias antivirales protectoras ( [Seder et al., 2008](#) ). Se han reportado frecuencias más bajas de linfocitos T auxiliares tipo 1 en pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con los linfocitos T reactivos a la influenza ( [Meckiff et al., 2020](#) ) y la

disminución de las frecuencias de linfocitos T CD4 + polifuncionales se ha asociado con SARS-CoV-2 grave. 2 infección. Además, las frecuencias elevadas de células T no funcionales, definidas por la ausencia de producción de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, se han relacionado con el curso grave de la enfermedad del SARS-CoV-2 ( [Zheng et al., 2020](#) ). A continuación, evaluamos la polifuncionalidad de las células T específicas de S y NP en NSC y grupos de estudio comparativos. La polifuncionalidad se evaluó mediante activación booleana utilizando IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF en células T CD4 + y CD8 +. En respuesta a las proteínas S, las células T CD4 + de las NSC mostraron características similares a las de Conv (con un 4,6% frente a un 5,2% de células trifuncionales y un 24,9% frente a un 20% de células bifuncionales respectivamente), mientras que LN tenía frecuencias más bajas de células trifuncionales (1,6%) , pero frecuencias más altas de células bifuncionales (37,6%; [Fig 2C](#)). Por otro lado, las células T CD8 + en respuesta a S mostraron frecuencias más altas de células monofuncionales en NSC (89,3%) en comparación con LN (65,2%) y Conv (64,7%), y frecuencias más bajas de células bifuncionales (10,7%) en comparación con LN (34,4%) y Conv (35,3%). Se observaron frecuencias insignificantes en las células trifuncionales CD8 + en todos los grupos ( [Fig. 2C](#) ). En respuesta a las proteínas NP, las células T CD4 + de las NSC mostraron características similares a las de Conv (con un 2,4% frente a un 4,9% de células trifuncionales y un 26,1% frente a un 31,1% de células bifuncionales, respectivamente) ( [Fig. 2D](#) ). Curiosamente, NSC tuvo las frecuencias más altas de células T CD8 + específicas de NP trifuncionales, que representan el 16% de sus células T CD8 + específicas de NP, en comparación con LN y Conv (5,2% y 1,2%, respectivamente, [Fig. 2D](#)). Por el contrario, no se observaron diferencias importantes en las células T CD8 + mono y bifuncionales entre los grupos ( [Fig. 2D](#) ). Estos resultados demuestran una frecuencia particularmente elevada de respuestas de células T específicas de SARS-CoV2 altamente funcionales, especialmente respuestas de células T CD8 + específicas de NP polifuncionales como un sello distintivo de NSC.

### **Los no seroconvertidores muestran niveles más bajos de marcadores inducidos por la activación de células T y PD-1**

A continuación, utilizamos PD-1 y marcadores inducidos por activación (AIM) para evaluar la activación total de las células T y el estado de activación de las células T específicas del SARS-CoV-2 ( [Sekine et al., 2020](#) ; [Grifoni et al., 2020](#) ). Los AIM se han utilizado para identificar células T CD4 + específicas de antígeno mediante la detección de marcadores de superficie regulados positivamente después de la estimulación antigénica ( [Reiss et al., 2017](#) ). Evaluamos la activación general de las células T y los AIM utilizando anticuerpos dirigidos contra CD25, OX40 y CD137 y PD-1 en condiciones no estimuladas y estimuladas por antígenos S y NP ( [Fig 3A-C](#)). Como se observó para la producción de citocinas de células T específicas de SARS-CoV-2, se observó un alto nivel de variabilidad interindividual dentro de los grupos para los AIM. Aún así, encontramos una expresión estadísticamente significativamente menor de linfocitos T CD25 + OX40 + CD4 + en respuesta a S en NSC en comparación con Conv (mediana 0,13% frente a 0,59%, respectivamente,  $p = 0,0216$ , [Fig 3B](#) ). Se observó lo mismo para las células T CD4 + CD137 + OX40 + específicas de S ( $p = 0,0117$ , datos no mostrados). Además, las células T CD25 + OX40 + CD4 + en respuesta a NP no fueron significativamente diferentes entre NSC y el resto de los grupos, aunque se observaron frecuencias medias más bajas (0.005% NSC vs 0.84% Conv, [Figura 3B](#) ). El análisis de AIM en células T CD8 + no reveló diferencias significativas en las frecuencias de células T CD137 + CD8 + entre los grupos de estudio ( [Fig. 3B](#) ). Sin embargo, la frecuencia media de linfocitos T CD137 + CD8 + fue menor en NSC, particularmente en respuesta a NP (0% NSC vs 0.77% Conv, [Fig 3B](#) ). Además, realizamos un seguimiento longitudinal de la expresión de AIM en muestras de 6 individuos con NSC. Frecuencias de S y NP CD25 + OX40 + CD4 + Las células T disminuyeron o

permanecieron indetectables entre los puntos de tiempo de muestreo en todas las NSC excepto en un individuo, que también mostró una mayor producción de citocinas en respuesta a S ( [Fig. S1E](#) ). Se observó un perfil comparable para las células T S y NP CD137 + CD8 + a lo largo del tiempo ( [Fig. S1E](#) ).

- [Descargar figura](#)

- [Abrir en una pestaña nueva](#)

**Figura 3. La expresión de los marcadores de activación es menor en los no seroconvertidores del SARS-CoV-2 en comparación con los individuos convalecientes seropositivos.**

PBMCs from Non-seroconvertors and comparative study groups were stimulated for 17 hours with S and NP recombinant proteins and stained using antibodies directed against activation-induced markers (AIM; CD25, OX40, CD137) and PD-1, and analysed by flow cytometric analysis. (A) Gating strategy for AIM expression in CD4+ and CD8+ T cells. (B) Dot plots showing expression of activation induced markers in CD4+ (CD25+OX40+) and CD8+ T cells in response to S and NP (CD137+). Values from unstimulated cells were subtracted for each individual. (C) Gating strategy for analysis of PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells. (D) Expression of PD-1 on CD4+ and CD8+ T cells in unstimulated cells as well as following S and NP stimulation. Error bars represent interquartile range and median values per group are shown. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA adjusted for multiple comparisons, only significant differences are highlighted in the figure.

Along with decreased functionality, elevated activation and exhaustion markers such as PD-1 in T cells from patients experiencing severe COVID-19 have been described ([Zheng et al., 2020](#)). Analysis of PD-1 revealed a significant reduction in the frequency of PD-1 expressing T cells in NSC compared to convalescent individuals in all conditions tested ([Fig 3D](#)) in CD4+ (unstimulated,  $p=0.0468$ ; S,  $p=0.0166$  and NP,  $p=0.0242$ ) and CD8+ T cells (unstimulated,  $p=0.0345$ ; S,  $p=0.0085$ , and NP,  $p=0.0257$ ). Longitudinal follow-up of PD-1 expression in NSC demonstrated stable frequencies of PD-1 expression in CD4+ and CD8+ T cells independent of S or NP antigen stimulation ([Fig S1F](#)). Only a decrease in the frequency of PD-1+ CD4+ T cells following S-stimulation was observed over time ( $p=0.0313$ , Wilcoxon matched-paired signed-rank test, [Fig S1F](#)). Overall, these data

indicate lower levels of AIM expression (CD25<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup>) in CD4<sup>+</sup> T cells in response to S and an overall low level of PD-1 expression in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as particular immunological traits of NSC.

---

## DISCUSSION

While unprecedented advances have been made for the approval of COVID-19 vaccines with a high degree of efficacy ([Logunov et al., 2021](#); [Voysey et al., 2021](#); [Mahase, 2020](#); [Oliver et al., 2020](#)), ensuring long-lasting immune protection remains a potential challenge for current vaccines. Severe COVID-19 has been related to increased age, high levels of inflammatory markers and seroconversion ([Staines et al., 2021](#)). Persistent seroconversion and higher neutralizing titers have been found consistently in hospitalized SARS-CoV-2 infected individuals ([Trinité et al., 2021](#); [Pradenas et al., 2021](#)). These studies support the relevance of alternative immune mechanisms to humoral responses crucial in limiting SARS-CoV-2 pathogenesis. In this study, we have conducted a detailed immune characterization of T-cell responses in SARS-CoV-2 individuals, suggesting that virus-specific T-cell responses in the absence of seroconversion may mediate immune protection from disease severity and viral pathogenesis.

Non-Seroconvertors (NSC) in SARS-CoV-2 infection have been described to be present at a frequency of 2-17% among convalescent individuals ([Schulien et al., 2021](#); [Schwarzkopf et al., 2021](#); [Sekine et al., 2020](#)). While previous studies have been shown the presence of SARS-CoV-2 specific T-cell responses in NSC ([Schwarzkopf et al., 2021](#); [Sekine et al., 2020](#)), and SARS-CoV-2 CD8<sup>+</sup> T-cell responses have been very well characterized in a small fraction of those ([Schulien et al., 2021](#)), a thorough characterization of the NSC immune phenotype is still missing. Here, we overcome some of the previous studies limitations through a detailed identification of NSC and comparative analyses of total and S and NP-specific T cells. These data are essential to strengthen our understanding of T-cell mediated immunity and answer important questions regarding the identification of distinctive immunological traits associated with immune protection against SARS-CoV-2.

We identified 4.8% of Non-seroconvertors in the KING extension cohort. We used a conservative approach to identify NSC by including confirmed SARS-CoV-2 PCR positivity, double ELISA testing and sampling-time estimation to allow for seroconversion. Longitudinal follow-up in the absence of SARS-CoV-2 IgG, IgM and IgA seroconversion over time further confirm the true nature of NSC in our study. Epidemiologically, NSCs were biased towards individuals with mild to moderate SARS-CoV-2 infection and a higher frequency of females. These data contrast with the presence of severe infection in 80% of Conv and higher frequency of males. The observed sex distribution is consistent with previous findings suggesting females exhibit robust T-cell responses and are less prone to severe SARS-CoV-2 infection and death than males ([Takahashi et al., 2020](#); [Jin et al., 2020](#); [Vahidy et al., 2021](#)). No significant differences in age distribution between NSC and Conv were found excluding age as one of the factors accounting for the differences in disease severity observed.

We performed a characterization of T-cell immunity in NSC and compared with SARS-CoV-2 infected individuals stratified by seroconversion, magnitude of humoral neutralizing activity, and disease severity. In terms of T-cell immunophenotype, we observed a skewed distribution of CD8<sup>+</sup> T cell subsets with a higher frequency of naïve and lower frequency of effector CD8<sup>+</sup> T cells in NSC. The observed distribution was independent of age and DfSO. These data contrast with the negative correlation between the frequency of naïve CD8<sup>+</sup> T cells and the positive correlation between the frequency of effector and CD8<sup>+</sup> T cells with age found in Conv and LN. Of note, this is in line with previous observations indicating

a decline in the frequencies of naïve T cells with age and the association of low levels of naïve CD8<sup>+</sup> with increased risk of severity in COVID-19 ([Hong et al., 2004](#))([Rydyznski Moderbacher et al., 2020](#)). The skewed CD8<sup>+</sup> T cell distribution independent of age and time observed support a specific characteristic of T cell homeostasis in NSC. The higher levels of CD8<sup>+</sup> TN cells in NSC could be the result of a continuous thymic repopulation of the naïve compartment, as observed in HIV-1 viremic non-progressor individuals ([Singh et al., 2020](#)). High levels of CD8<sup>+</sup> TN could also allow rapid and efficient priming and expansion of SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> T cells favoring viral control. The low levels of CD8<sup>+</sup> TEF observed in NSC could partially be explained by highly functional CD8<sup>+</sup> T cells, overcoming the need for a large proportion of effector cells.

We extended the characterization of T-cell immunity to functional SARS-CoV-2-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses by cytokine production and AIMs in response to S and NP proteins. Overall, we did not observe differences in cytokine production in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to S and NP proteins in NSC and the rest of the groups, which may have been due to the marked interindividual variability in these parameters. This is in partial agreement with data reporting the targeting of T-cell responses toward S-, M- and N-proteins in COVID-19 patient samples to be mainly uniform across disease severities ([Thieme et al., 2020](#)).

However, in NSC S and NP-specific T cells appear to have a balanced profile of IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF production, while Conv exhibits higher median frequencies of TNF producing cells. TNF secretion by CD4<sup>+</sup> T cells serves as a costimulatory signal for B cell activation ([Aversa et al., 1993](#)), which is in line with the high levels of seroconversion and plasma neutralizing activity reported in convalescent hospitalized individuals. Moreover, elevated levels of TNF may be both beneficial and detrimental. While TNF is one of the main pro-inflammatory cytokines produced by T cells responding to viral, bacterial, and fungal infections ([Rahman and McFadden, 2006](#)), its effects are also implicated in increased viral replication ([Kumar et al., 2013](#); [Roca et al., 2008](#); [Espín-Palazón et al., 2016](#)). Although NSC displayed tendencies towards lower median frequencies of SARS-CoV-2-specific T cell responses, we measured high levels of IFN- $\gamma$ ·IL-2·TNF·NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells in NSC. The presence of polyfunctional NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells in NSC emphasized the importance to understand quality over quantity in the context of immune protection by T cell responses in SARS-CoV-2 infection. These findings follow previous studies supporting a distinctive contribution of surface and non-surface antigen- specific-CD8<sup>+</sup> T cells to disease control and the potential role of NP-specific and other non-S CD8<sup>+</sup> T-cell responses in immune protection ([Peng et al., 2020](#)). Indeed, CD8<sup>+</sup> T-cell responses were shown to be more likely to target NP than S ([Cohen et al., 2021](#)). Our data is also in line with previous findings showing NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells directed against the immunodominant B7/N105 epitope were detected at high frequency in pre-COVID-19 samples, and even more so during acute COVID-19 and convalescence. A predominantly naïve phenotype with high TCR plasticity was observed among these cells ([Nguyen et al., 2021](#)).

Complementary to cytokine producing cells, we investigated the expression of AIMs in CD4<sup>+</sup> T cells (CD25·OX40<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup> T cells (CD137<sup>+</sup>) and PD-1 in response to S and NP antigens. Data from AIMs identified lower median frequencies of S CD25·OX40<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells and a trend towards lower NP CD137<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells as distinctive traits in NSC. Higher frequencies of AIM<sup>+</sup> T cells observed in Conv are likely to detect alternative cytokine profiles and T regulatory cells as described previously ([Reiss et al., 2017](#)). Another explanation could be an association between the pro-inflammatory environment in Conv and the overall increase in immune activation found.

These data highlight the importance of the quality of SARS-CoV-2 T-cell responses, as the NSC displayed polyfunctional T cells despite lower overall expression of AIMs. These findings have additional value considering the worldwide expansion of SARS-CoV-2 variants of concern for vaccine efficacy ([Kirby, 2021](#); [Tegally et al.,](#)

2021). In this context, the quality of antigen-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses may be of crucial importance to recognize emerging SARS-CoV-2 variants.

Total frequencies of SARS-CoV-2 T-cell responders, taking into account both cytokines and AIMs were 81% of NSCs, 69% of LN, 100% of Conv, and 20% of healthy donors responded to either S or NP consistent with previous studies (Sekine et al., 2020; Mateus et al., 2020). We did not find T-cell responses in 19% of NSCs to S nor NP proteins. These data support intrinsic diversity within the NSC phenotype in terms of other cell types or T cells targeting alternative regions of the proteome not included in our analyses.

Moreover, we observed decreased levels of PD-1 in CD4+ and CD8+ T cells in NSC compared to Conv with and without SARS-CoV-2 antigen stimulation. Elevated activation and exhaustion markers have been found in T cells of severe COVID-19 patients (Zheng et al., 2020). Aside from elevated activation and exhaustion markers such as PD-1, decreased functionality has been observed in T cells from severe COVID-19 patients (Zheng et al., 2020). Recently, SARS-CoV-2 specific CD8+ T cells expressing PD-1 were shown to be functional rather than exhausted, as they also produced IFN- $\gamma$  (Rha et al., 2021). Therefore, while the PD-1 expressing cells in Conv may be functional, our data suggest that T cells of NSC can exhibit functionality despite reduced PD-1 and AIMs expression levels. This is potentially explained by pre-existing cross-reactive T-cell responses.

Given the reports on pre-existing immunity in uninfected individuals, it is tempting to speculate that pre-existing T cell immunity derived from previous exposure to other coronaviruses mediate the NSC phenotype. This would be in line with the generation of a rapid response without the need for high levels of activation, it is also a plausible explanation of why the NSC can control SARS-CoV-2 with T cells in the absence of antibodies. Indeed, cross-reactive memory CD4+ T cells with comparable affinity to epitopes from SARS-CoV-2 and common cold coronaviruses have been described in unexposed individuals with the most frequently targeted region being S (Mateus et al., 2020). Reactivity to NP has previously been demonstrated in 30% of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 unexposed individuals. A mapped epitope at aa 101-120 shared a high degree of homology to the sequences of the NP of MERS-CoV, OC43 and HKU1 (Le Bert et al., 2020).

Our study has some limitations. First, we found a bias in epidemiological characteristics in NSC toward a high frequency of females and median lower age. Second, we used S and NP recombinant proteins as opposed to optimal peptides for the study of antigen-specific T cells, potentially underestimating the true frequency of virus-specific T cells. Third, our functional study of T cells is limited to Th1-type cytokines and does not necessarily reflect the full functionality of antigen-specific T cells (Ruiz-Riol et al., 2015). Further immunological studies of NSC are required for additional information on this phenotype.

Collectively, our data suggest a protective role of highly functional SARS-CoV-2 specific T-cell responses in the absence of humoral responses against severe COVID-19 while maintaining a low degree of T-cell activation. Our study provides important information required for successfully guiding clinical monitoring and designing future immune interventions.

---

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

---

## Author contribution statement



Conceptualization, JGP, AK, MM, BC, CB, JC, JB; methodology EJM, AK, OBL, DO, JC, MM, EMC, BQS, IB, RP; validation, MM, JC, JB, RP, LM, EMC, BQS, IB, AK, JGP; Resources, JGP, BC, MM, JC, JB, RP, LM, ACH; formal analysis; EJM, AK, OBL, DO; investigation, AK, JGP; data curation, MM, JB, JC, EMV, BQS, EJM, AK, OBL, DO; software, DO; visualization, AK, OBL, DO, JGP; writing – original draft preparation AK, JGP; supervision, JGP; writing – review and editing AK, JGP, EJM, EMC, JB, MM, OBL, JC, BQS, CB, DO; project administration, JGP; funding acquisition JGP, BC.

---

## Acknowledgments

We are deeply grateful to all participants and to the technical staff of IrsiCaixa for sample processing (L. Ruiz, E. Grau, R. Ayen, L. Gomez, C. Ramirez, M. Martinez, T Puig) and staff from the Fight AIDS Foundation (R Toledo, A. Chamorro, J Puig). This study was supported in part by grants from National Health Institute Carlos III (ISCIII) COV20/00660, PI17/000164 and RETIC RD16/0025/0041 (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund) for JGP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish or drafting of the manuscript. OBL was supported by the grant for Catalan Government and the European Social Fund AGAUR-FI\_B 00582 Ph.D. fellowship. This study has received partial funding from Grifols and the the crowdfunding initiatives “<https://www.yomecorono.com>”, BonPreu/Esclat and Correos. We thank “CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support and the Foundation Dormeur for financial support.

---

## REFERENCES

1. [↵](#)  
Aversa, G., J. Punnonen, and J.E. De Vries. 1993. The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor  $\alpha$  on activated CD4 + T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J. Exp. Med.* **177**:1575–1585. doi:10.1084/jem.177.6.1575.  
[Abstract/FREE Full Text](#)[Google Scholar](#)
2. [↵](#)  
Le Bert, N., A.T. Tan, K. Kunasegaran, C.Y.L. Tham, M. Hafezi, A. Chia, M.H.Y. Chng, M. Lin, N. Tan, M. Linster, W.N. Chia, M.I.C. Chen, L.F. Wang, E.E. Ooi, S. Kalimuddin, P.A. Tambyah, J.G.H. Low, Y.J. Tan, and A. Bertoletti. 2020. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. **584**:457–462. doi:10.1038/s41586-020-2550-z.  
[CrossRefPubMed](#)[Google Scholar](#)
3. [↵](#)  
Blanch-lombarte, O., G. Cristina, B. Revollo, E. Jim, B. Clotet, J.G. Prado, and J. Martinez-picado. 2019. Enhancement of Antiviral CD8 + T-Cell Responses and Complete Remission of Metastatic Melanoma in an HIV-1-Infected Subject Treated with Pembrolizumab. *J. Clin. Med.* **8**:1–11.  
[Google Scholar](#)

4. [↵](#)  
Blanco-Melo, D., B.E. Nilsson-Payant, W.C. Liu, S. Uhl, D. Hoagland, R. Møller, T.X. Jordan, K. Oishi, M. Panis, D. Sachs, T.T. Wang, R.E. Schwartz, J.K. Lim, R.A. Albrecht, and B.R. tenOever. 2020. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. **181**:1036–1045.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.04.026.  
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
5. [↵](#)  
Breton, G., P. Mendoza, T. Hägglöf, T.Y. Oliveira, D. Schaefer-Babajew, C. Gaebler, M. Turroja, A. Hurley, M. Caskey, and M.C. Nussenzweig. 2021. Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med.* **218**. doi:10.1084/JEM.20202515.  
[CrossRefGoogle Scholar](#)
6. [↵](#)  
Chang, A.Y., M.R. Cullen, R.A. Harrington, and M. Barry. 2020. The impact of novel coronavirus COVID-19 on noncommunicable disease patients and health systems: a review. *J. Intern. Med.* **289**. doi:10.1111/joim.13184.  
[CrossRefGoogle Scholar](#)
7. [↵](#)  
Cohen, K.W., S.L. Linderman, Z. Moodie, J. Czartoski, G. Mantus, C. Norwood, L.E. Nyhoff, V. Edara, K. Floyd, S.C. De Rosa, H. Ahmed, R. Whaley, S.N. Patel, B. Prigmore, M.P. Lemos, S. Furth, M.P. Gharpure, S. Gunis etty, A. Stephens, R. Antia, V.I. Zarnitsyna, D.S. Stephens, N. Roupael, E.J. Anderson, A.K. Mehta, M.S. Suthar, R. Ahmed, and M. Juliana McElrath. 2021. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-1 CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells 2. medRxiv. 2021.04.19.21255739. doi:10.1101/2021.04.19.21255739.  
[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)
8. [↵](#)  
Dan, J.M., J. Mateus, Y. Kato, K.M. Hastie, E.D. Yu, C.E. Faliti, A. Grifoni, S.I. Ramirez, S. Haupt, A. Frazier, C. Nakao, V. Rayaprolu, S.A. Rawlings, B. Peters, F. Krammer, V. Simon, E.O. Saphire, D.M. Smith, D. Weiskopf, A. Sette, and S. Crotty. 2021. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (80-)*. **371**. doi:10.1126/science.abf4063.  
[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)
9. [↵](#)  
Espín-Palazón, R., A. Martínez-López, F.J. Roca, A. López-Muñoz, S.D. Tyrkalska, S. Candel, D. García-Moreno, A. Falco, J. Meseguer, A. Estepa, and V. Mulero. 2016. TNF $\alpha$  Impairs Rhabdoviral Clearance by Inhibiting the Host Autophagic Antiviral Response. *PLOS Pathog.* **12**:e1005699. doi:10.1371/journal.ppat.1005699.  
[CrossRefGoogle Scholar](#)

10. [↵](#)  
Garcia-Beltran, W.F., E.C. Lam, M.G. Astudillo, D. Yang, T.E. Miller, J. Feldman, B.M. Hauser, T.M. Caradonna, K.L. Clayton, A.D. Nitido, M.R. Murali, G. Alter, R.C. Charles, A. Dighe, J.A. Branda, J.K. Lennerz, D. Lingwood, A.G. Schmidt, A.J. Iafrate, and A.B. Balazs. 2021. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*. **184**:476–488.e11. doi:10.1016/j.cell.2020.12.015.  
[CrossRefGoogle Scholar](#)
11. [↵](#)  
Grifoni, A., D. Weiskopf, S.I. Ramirez, J. Mateus, J.M. Dan, C.R. Moderbacher, S.A. Rawlings, A. Sutherland, L. Premkumar, R.S. Jadi, D. Marrama, A.M. de Silva, A. Frazier, A.F. Carlin, J.A. Greenbaum, B. Peters, F. Krammer, D.M. Smith, S. Crotty, and A. Sette. 2020. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. **181**:1489–1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015.  
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
12. [↵](#)  
Hong, M.S., J.M. Dan, J.Y. Choi, and I. Kang. 2004. Age-associated changes in the frequency of naïve, memory and effector CD8+ T cells. *Mech. Ageing Dev.* **125**:615–618. doi:10.1016/j.mad.2004.07.001.  
[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)
13. [↵](#)  
Jin, J.-M., P. Bai, W. He, F. Wu, X.-F. Liu, D.-M. Han, S. Liu, and J.-K. Yang. 2020. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front. Public Heal.* **8**:152. doi:10.3389/fpubh.2020.00152.  
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
14. [↵](#)  
Kiepiela, P., K. Ngumbela, C. Thobakgale, D. Ramduth, I. Honeyborne, E. Moodley, S. Reddy, C. De Pierres, Z. Mncube, N. Mkhwanazi, K. Bishop, M. Van Der Stok, K. Nair, N. Khan, H. Crawford, R. Payne, A. Leslie, J. Prado, A. Prendergast, J. Frater, N. McCarthy, C. Brander, G.H. Learn, D. Nickle, C. Rousseau, H. Coovadia, J.I. Mullins, D. Heckerman, B.D. Walker, and P. Goulder. 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**:46–53. doi:10.1038/nm1520.  
[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)
15. [↵](#)  
Kirby, T. 2021. New variant of SARS-CoV-2 in UK causes surge of COVID-19. *Lancet Respir. Med.* **9**:e20–e21. doi:10.1016/s2213-2600(21)00005-9.  
[CrossRefGoogle Scholar](#)
16. [↵](#)

Klatt, N.R., S.E. Bosinger, M. Peck, L.E. Richert-Spuhler, A. Heigele, J.P. Gile, N. Patel, J. Taaffe, B. Julg, D. Camerini, C. Torti, J.N. Martin, S.G. Deeks, E. Sinclair, F.M. Hecht, M.M. Lederman, M. Paiardini, F. Kirchhoff, J.M. Brenchley, P.W. Hunt, and G. Silvestri. 2014. Limited HIV Infection of Central Memory and Stem Cell Memory CD4+ T Cells Is Associated with Lack of Progression in Viremic Individuals. *PLoS Pathog.* **10**. doi:10.1371/journal.ppat.1004345.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

17. [↵](#)

Kumar, A., W. Abbas, and G. Herbein. 2013. TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: New cellular targets for therapy? *Mediators Inflamm.* **2013**. doi:10.1155/2013/484378.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

18. [↵](#)

Kuri-

Cervantes, L., M.B. Pampena, W. Meng, A.M. Rosenfeld, C.A.G. Ittner, A.R. Weisman, R.S. Agyekum, D. Mathew, A.E. Baxter, L.A. Vella, O. Kuthuru, S.A. Apostolidis, L. Bershaw, J. Dougherty, A.R. Greenplate, A. Pattekar, J. Kim, N. Han, S. Gouma, M.E. Weirick, C.P. Arevalo, M.J. Bolton, E.C. Goodwin, E.M. Anderson, S.E. Hensley, T.K. Jones, N.S. Mangalmurti, E.T. Luning Prak, E.J. Wherry, N.J. Meyer, and M.R. Betts. 2020. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* **5**. doi:10.1126/sciimmunol.abd7114.

[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)

19. [↵](#)

Li, T., J. Xie, Y. He, H. Fan, L. Baril, Z. Qiu, Y. Han, W. Xu, W. Zhang, H. You, Y. Zuo, Q. Fang, J. Yu, Z. Chen, and L. Zhang. 2006. Long-term persistence of robust antibody and cytotoxic T cell responses in recovered patients infected with SARS coronavirus. *PLoS One.* **1**. doi:10.1371/journal.pone.0000024.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

20. [↵](#)

Liao, M., Y. Liu, J. Yuan, Y. Wen, G. Xu, J. Zhao, L. Cheng, J. Li, X. Wang, F. Wang, L. Liu, I. Amit, S. Zhang, and Z. Zhang. 2020. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**:842–844. doi:10.1038/s41591-020-0901-9.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

21. [↵](#)

Logunov, D.Y., I. V Dolzhikova, D. V Shcheblyakov, A.I. Tukhvatulin, O. V Zubkova, A.S. Dzharullaeva, A. V Kovyrshina, N.L. Lubenets, D.M. Grousova, A.S. Erokhova, A.G. Botikov, F.M. Izhaeva, O. Popova, T.A. Ozharovskaya, I.B. Esmagambetov, I.A. Favorskaya, D.I. Zrelkin, D.

V Voronina, D.N. Shcherbinin, A.S. Semikhin, Y.

V Simakova, E.A. Tokarskaya, D.A. Egorova, M.M. Shmarov, N.A. Nikitenko, V.A. Gushchin, E.A. S molyarchuk, S.K. Zyryanov, S. V Borisevich, B.S. Naroditsky, and A.L. Gintsburg. 2021. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. **397**:671–681. doi:10.1016/s0140-6736(21)00234-8.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

22. [↵](#)

Lucas, C., P. Wong, J. Klein, T.B.R. Castro, J. Silva, M. Sundaram, M.K. Ellingson, T. Mao, J.E. Oh, B. I sraelow, T. Takahashi, M. Tokuyama, P. Lu, A. Venkataraman, A. Park, S. Mohanty, H. Wang, A.L. Wyllie, C.B.F. Vogels, R. Earnest, S. Lapidus, I.M. Ott, A.J. Moore, M.C. Muenker, J.B. Fournier, M. C ampbell, C.D. Odio, A. Casanovas-Massana, A. Obaid, A. Lu- Culligan, A. Nelson, A. Brito, A. Nunez, A. Martin, A. Watkins, B. Geng, C. Kalinich, C. Harden, C. To deasa, C. Jensen, D. Kim, D. McDonald, D. Shepard, E. Courchaine, E.B. White, E. Song, E. Silva, E. K udo, G. DeJuliis, H. Rahming, H.J. Park, I. Matos, J. Nouws, J. Valdez, J. Fauver, J. Lim, K.A. Rose, K. Anastasio, K. Brower, L. Glick, L. Sharma, L. Sewanan, L. Knaggs, M. Minasyan, M. Batsu, M. Petro ne, M. Kuang, M. Nakahata, M. Campbell, M. Linehan, M.H. Askenase, M. Simonov, M. Smolgovsky, N. Sonnert, N. Naushad, P. Vijayakumar, R. Martinello, R. Datta, R. Handoko, S. Bermejo, S. Proph et, S. Bickerton, S. Velazquez, T. Alpert, T. Rice, W. Khoury- Hanold, X. Peng, Y. Yang, Y. Cao, Y. Strong, R. Herbst, A.C. Shaw, R. Medzhitov, W.L. Schulz, N.D. G rubaugh, C. Dela Cruz, S. Farhadian, A.I. Ko, et al. 2020. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. **584**:463–469. doi:10.1038/s41586-020-2588-y.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

23. [↵](#)

Mahase, E. 2020. Covid-19: Moderna applies for US and EU approval as vaccine trial reports 94.1% efficacy. *BMJ*. **371**. doi:10.1136/bmj.m4709.

[FREE Full TextGoogle Scholar](#)

24. [↵](#)

Marshall, M. 2020. The lasting misery of coronavirus long-haulers. *Nature*. **585**:339–341. doi:10.1038/d41586-020-02598-6.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

25. [↵](#)

Mateus, J., A. Grifoni, A. Tarke, J. Sidney, S.I. Ramirez, J.M. Dan, Z.C. Burger, S.A. Rawlings, D.M. Sm ith, E. Phillips, S. Mallal, M. Lammers, P. Rubiro, L. Quiambao, A. Sutherland, E.D. Yu, R. Da Silva Antunes, J. Greenbaum, A. Frazier, A.J. Markmann, L. Premkumar, A. De Silva, B. Peters, S. Crotty, A. Sette, and D. Weiskopf. 2020. Selective and cross-reactive SARS-

CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* (80-). **370**:89–94. doi:10.1126/science.abd3871.

[Abstract/FREE Full Text](#)[Google Scholar](#)

26. [↵](#)

Mathew, D., J.R. Giles, A.E. Baxter, D.A. Oldridge, A.R. Greenplate, J.E. Wu, C. Alanio, L. Kuri-Cervantes, M.B. Pampena, K. D'Andrea, S. Manne, Z. Chen, Y.J. Huang, J.P. Reilly, A.R. Weisman, C. A.G. Ittner, O. Kuthuru, J. Dougherty, K. Nzingha, N. Han, J. Kim, A. Pattekar, E.C. Goodwin, E.M. Anderson, M.E. Weirick, S. Gouma, C.P. Arevalo, M.J. Bolton, F. Chen, S.F. Lacey, H. Ramage, S. Cherry, S.E. Hensley, S.A. Apostolidis, A.C. Huang, L.A. Vella, M.R. Betts, N.J. Meyer, E.J. Wherry, Z. Alam, M.M. Addison, K.T. Byrne, A. Chandra, H.C. Descamps, Y. Kaminskiy, J.T. Hamilton, J.H. Noll, D. K. Omran, E. Perkey, E.M. Prager, D. Pueschl, J.B. Shah, J.S. Shilan, and A.N. Vanderbeck. 2020. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* (80-). **369**. doi:10.1126/SCIENCE.ABC8511.

[CrossRef](#)[Google Scholar](#)

27. [↵](#)

McMahan, K., J. Yu, N.B. Mercado, C. Loos, L.H. Tostanoski, A. Chandrashekar, J. Liu, L. Peter, C. Atyeo, A. Zhu, E.A. Bondzie, G. Dagotto, M.S. Gebre, C. Jacob-Dolan, Z. Li, F. Nampanya, S. Patel, L. Pessaint, A. Van Ry, K. Blade, J. Yalley-Ogunro, M. Cabus, R. Brown, A. Cook, E. Teow, H. Andersen, M.G. Lewis, D.A. Lauffenburger, G. Alter, and D.H. Barouch. 2021. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. **590**:630–634. doi:10.1038/s41586-020-03041-6.

[CrossRef](#)[PubMed](#)[Google Scholar](#)

28. [↵](#)

Meckiff, B.J., C. Ramírez-Suástegui, V. Fajardo, S.J. Chee, A. Kusnadi, H. Simon, S. Eschweiler, A. Grifoni, E. Pelosi, D. Weiskopf, A. Sette, F. Ay, G. Seumois, C.H. Ottensmeier, and P. Vijayanand. 2020. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell*. **183**:1340–1353.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.10.001.

[CrossRef](#)[PubMed](#)[Google Scholar](#)

29. [↵](#)

Nguyen, T.H.O., L.C. Rowntree, J. Petersen, B.Y. Chua, L. Hensen, L. Kedzierski, C.E. van de Sandt, P. Chaurasia, H.-X. Tan, J.R. Habel, W. Zhang, L. Allen, L. Earnest, K.Y. Mak, J.A. Juno, K. Wragg, F.L. Mordant, F. Amanat, F. Krammer, N.A. Mifsud, D.L. Doolan, K.L. Flanagan, S. Sonda, J. Kaur, L.M. Wakim, G.P. Westall, F. James, E. Mouhtouris, C.L. Gordon, N.E. Holmes, O.C. Smibert, J.A. Trubiano, A.C. Cheng, P. Harcourt, P. Clifton, J.C. Crawford, P.G. Thomas, A.K. Wheatley, S.J. Kent, J. Rossjohn, J. Torresi, and K. Kedzierska. 2021. CD8+ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2

nucleocapsid epitope display high naïve precursor frequency and T cell receptor promiscuity. *Immunity*. **0**. doi:10.1016/j.immuni.2021.04.009.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

30. [↵](#)

Noel, N., R. Peña, A. David, V. Avettand-Fenoel, I. Erkizia, E. Jimenez, C. Lecuroux, C. Rouzioux, F. Boufassa, G. Pancino, A. Venet, C. Van Lint, J. Martinez-Picado, O. Lambotte, A. Sáez-Cirión, and J.G. Prado. 2016. Long-Term Spontaneous Control of HIV-1 Is Related to Low Frequency of Infected Cells and Inefficient Viral Reactivation. *J. Virol.* **90**:6148–6158. doi:10.1128/jvi.00419-16.

[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)

31. [↵](#)

Oliver, S.E., J.W. Gargano, M. Marin, M. Wallace, K.G. Curran, M. Chamberland, N. McClung, D. Campos-Outcalt, R.L. Morgan, S. Mbaeyi, J.R. Romero, H.K. Talbot, G.M. Lee, B.P. Bell, and K. Dooling. 2020. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine — United States, December 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **69**:1922–1924. doi:10.15585/mmwr.mm6950e2.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

32. [↵](#)

Ou, X., Y. Liu, X. Lei, P. Li, D. Mi, L. Ren, L. Guo, R. Guo, T. Chen, J. Hu, Z. Xiang, Z. Mu, W. Chen, J. Chen, K. Hu, Q. Jin, J. Wang, and Z. Qian. 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **11**. doi:10.1038/s41467-020-15562-9.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

33. [↵](#)

Peng, Y., A.J. Mentzer, G. Liu, X. Yao, Z. Yin, D. Dong, W. Dejnirattisai, T. Rostron, P. Supasa, C. Liu, C. López-Camacho, J. Slon-  
Campos, Y. Zhao, D.I. Stuart, G.C. Paesen, J.M. Grimes, A.A. Antson, O.W. Bayfield, D.E.D.P. Hawkins, D.S. Ker, B. Wang, L. Turtle, K. Subramaniam, P. Thomson, P. Zhang, C. Dold, J. Ratcliff, P. Simmonds, T. de  
Silva, P. Sopp, D. Wellington, U. Rajapaksa, Y.L. Chen, M. Salio, G. Napolitani, W. Paes, P. Borrow, B.M. Kessler, J.W. Fry, N.F. Schwabe, M.G. Semple, J.K. Baillie, S.C. Moore, P.J.M. Openshaw, M.A. Ansari, S. Dunachie, E. Barnes, J. Frater, G. Kerr, P. Goulder, T. Lockett, R. Levin, Y. Zhang, R. Jing, L. P. Ho, T. Dong, P. Klenerman, A. McMichael, G. Ogg, J. Kenneth  
Baillie, R.J. Cornall, C.P. Conlon, G.R. Screaton, J. Mongkolsapaya, and J.C. Knight. 2020. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* **21**:1336–1345. doi:10.1038/s41590-020-0782-6.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

34. [↵](#)

Pereyra, F., X. Jia, P.J. McLaren, A. Telenti, P.I.W. de Bakker, B.D. Walker, S. Ripke, C.J. Brumme, S.L. Pulit, M. Carrington, C.M. Kadie, J.M. Carlson, D. Heckerman, R.R. Graham, R.M. Plenge, S.G. Deeks, L. Gianniny, G. Crawford, J. Sullivan, E. Gonzalez, L. Davies, A. Camargo, J.M. Moore, N. Beattie, S. Gupta, A. Crenshaw, N.P. Burt, C. Guiducci, N. Gupta, X. Gao, Y. Qi, Y. Yuki, A. Piechocka-Trocha, E. Cutrell, R. Rosenberg, K.L. Moss, P. Lemay, J. O'leary, T. Schaefer, P. Verma, I. Toth, B. Block, B. Baker, A. Rothchild, J. Lian, J. Proudfoot, D.M.L. Alvino, S. Vine, M.M. Addo, T.M. Allen, M. Altfeld, M.R. Henn, S. Le Gall, H. Streeck, D.W. Haas, D.R. Kuritzkes, G.K. Robbins, R.W. Shafer, R.M. Gulick, C.M. Shikuma, R. Haubrich, S. Riddler, P.E. Sax, E.S. Daar, H.J. Ribaud, B. Agan, S. Agarwal, R.L. Ahern, B.L. Allen, S. Altidor, E.L. Altschuler, S. Ambardar, K. Anastos, B. Anderson, V. Anderson, U. Andrady, D. Antoniskis, D. Bangsberg, D. Barbaro, W. Barrie, J. Bartczak, S. Barton, P. Basden, N. Basgoz, S. Bazner, N.C. Bellos, A.M. Benson, J. Berger, N.F. Bernard, A.M. Bernard, C. Birch, S.J. Bodner, R.K. Bolan, E.T. Boudreaux, M. Bradley, J.F. Braun, J.E. Brndjar, S.J. Brown, et al. 2010. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* (80-). **330**:1551–1557. doi:10.1126/science.1195271.

[Abstract/FREE Full Text](#)[Google Scholar](#)

35. ↵

Pradenas, E., B. Trinité, V. Urrea, S. Marfil, C. Ávila-Nieto, M.L. Rodríguez de la Concepción, F. Tarrés-Freixas, S. Pérez-Yanes, C. Roviro, E. Ainsua-Enrich, J. Rodon, J. Vergara-Alert, J. Segalés, V. Guallar, A. Valencia, N. Izquierdo-Ueros, R. Paredes, L. Mateu, A. Chamorro, M. Massanella, J. Carrillo, B. Clotet, and J. Blanco. 2021. Stable neutralizing antibody levels 6 months after mild and severe COVID-19 episodes. *Med.* **2**:313–320.e4. doi:10.1016/j.medj.2021.01.005.

[CrossRef](#)[Google Scholar](#)

36. ↵

Rahman, M.M., and G. McFadden. 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.* **2**:0066–0077. doi:10.1371/journal.ppat.0020004.

[CrossRef](#)[Google Scholar](#)

37. ↵

Reiss, S., A.E. Baxter, K.M. Cirelli, J.M. Dan, A. Morou, A. Daigneault, N. Brassard, G. Silvestri, J.P. Routy, C. Havenar-Daughton, S. Crotty, and D.E. Kaufmann. 2017. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. *PLoS One.* **12**. doi:10.1371/journal.pone.0186998.

[CrossRef](#)[PubMed](#)[Google Scholar](#)

38. ↵

Rha, M.S., H.W. Jeong, J.H. Ko, S.J. Choi, I.H. Seo, J.S. Lee, M. Sa, A.R. Kim, E.J. Joo, J.Y. Ahn, J.H. Kim, K.H. Song, E.S. Kim, D.H. Oh, M.Y. Ahn, H.K. Choi, J.H. Jeon, J.P. Choi, H. Bin



Kim, Y.K. Kim, S.H. Park, W.S. Choi, J.Y. Choi, K.R. Peck, and E.C. Shin. 2021. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity*. **54**:44–52.e3. doi:10.1016/j.immuni.2020.12.002.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

39. [↵](#)

Roca, F.J., I. Mulero, A. López-Muñoz, M.P. Sepulcre, S.A. Renshaw, J. Meseguer, and V. Mulero. 2008. Evolution of the Inflammatory Response in Vertebrates: Fish TNF- $\alpha$  Is a Powerful Activator of Endothelial Cells but Hardly Activates Phagocytes. *J. Immunol.* **181**:5071–5081. doi:10.4049/jimmunol.181.7.5071.

[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)

40. [↵](#)

Ruiz-Riol, M., A. Llano, J. Ibarrodo, J. Zamarreño, K. Yusim, V. Bach, B. Mothe, S. Perez-Alvarez, M.A. Fernandez, G. Requena, M. Meulbroek, F. Pujol, A. Leon, P. Cobarsi, B.T. Korber, B. C lotet, C. Ganoza, J. Sanchez, J. Coll, and C. Brander. 2015. Alternative effector-function profiling identifies broad HIV-specific T-cell responses in highly HIV-exposed individuals who remain uninfected. *J. Infect. Dis.* **211**:936–946. doi:10.1093/infdis/jiu534.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

41. [↵](#)

Rydyznski

Moderbacher, C., S.I. Ramirez, J.M. Dan, A. Grifoni, K.M. Hastie, D. Weiskopf, S. Belanger, R.K. Abbott, C. Kim, J. Choi, Y. Kato, E.G. Crotty, C. Kim, S.A. Rawlings, J. Mateus, L.P.V. Tse, A. Frazier, R. Baric, B. Peters, J. Greenbaum, E. Ollmann Saphire, D.M. Smith, A. Sette, and S. Crotty. 2020. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. **183**:996–1012.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.09.038.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

42. [↵](#)

Schulien, I., J. Kemming, V. Oberhardt, K. Wild, L.M. Seidel, S. Killmer, Sagar, F. Daul, M. Salvat Lago, A. Decker, H. Luxenburger, B. Binder, D. Bettinger, O. Sogukpinar, S. Rieg, M. Panning, D. Huzly, M. Schwemmle, G. Kochs, C.F. Waller, A. Nieters, D. Duerschmied, F. Emmerich, H.E. Mei, A. R. Schulz, S. Llewellyn-Lacey, D.A. Price, T. Boettler, B. Bengsch, R. Thimme, M. Hofmann, and C. Neumann-Haefelin. 2021. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. *Nat. Med.* **27**:78–85. doi:10.1038/s41591-020-01143-2.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

43. [↵](#)

Schwarzkopf, S., A. Krawczyk, D. Knop, H. Klump, A. Heinold, F.M. Heinemann, L. Thümmeler, C. Temme, M. Breyer, O. Witzke, U. Dittmer, V. Lenz, P.A. Horn, and M. Lindemann. 2021. Cellular

Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2-Specific IgG. *Emerg. Infect. Dis.* **27**:122–129. doi:10.3201/2701.203772.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

44. [↵](#)

Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer. 2008. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:247–258. doi:10.1038/nri2274.

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

45. [↵](#)

Sekine, T., A. Perez-Potti, O. Rivera-Ballesteros, K. Strålin, J.B. Gorin, A. Olsson, S. Llewellyn-Lacey, H. Kamal, G. Bogdanovic, S. Muschiol, D.J. Wullimann, T. Kammann, J. Emgård, T. Parrot, E. Folkesson, M. Akber, L. Berglin, H. Bergsten, S. Brighenti, D. Brownlie, M. Butrym, B. Chambers, P. Chen, M.C. Jeannin, J. Grip, A.C. Gomez, L. Dillner, I.D. Lozano, M. Dzidic, M.F. Tullberg, A. Färner, H. Glans, A. Haroun-

Izquierdo, E. Henriksson, L. Hertwig, S. Kalsum, E. Kokkinou, E. Kvedaraite, M. Loreti, M. Lourda, K. Maleki, K.J. Malmberg, N. Marquardt, C. Maucourant, J. Michaelsson, J. Mjösberg, K. Moll, J. Muva, J. Mårtensson, P. Naucclér, A. Norrby-

Teglund, L.P. Medina, B. Persson, L. Radler, E. Ringqvist, J.T. Sandberg, E. Sohlberg, T. Soini, M. Svensson, J. Tynell, R. Varnaite, A. Von

Kries, C. Unge, O. Rooyackers, L.I. Eriksson, J.I. Henter, A. Sönnernborg, T. Allander, J. Albert, M. Nielsen, J. Klingström, S. Gredmark-

Russ, N.K. Björkström, J.K. Sandberg, D.A. Price, H.G. Ljunggren, S. Aleman,

and M. Buggert. 2020. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell.* **183**:158–168.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.08.017.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

46. [↵](#)

Singh, A.K., S. Salwe, V. Padwal, S. Velhal, J. Sutar, S. Bhowmick, S. Mukherjee, V. Nagar, P. Patil, and V. Patel. 2020. Delineation of Homeostatic Immune Signatures Defining Viremic Non-progression in HIV-1 Infection. *Front. Immunol.* **11**. doi:10.3389/fimmu.2020.00182.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

47. [↵](#)

Staines, H.M., D.E. Kirwan, D.J. Clark, E.R. Adams, Y. Augustin, R.L. Byrne, M. Cocozza, A.I. Cubas-Atienzar, L.E. Cuevas, M. Cusinato, B.M.O. Davies, M. Davis, P. Davis, A. Duvoix, N.M. Eckersley, D. Forton, A.J. Fraser, G. Garrod, L. Hadcocks, Q. Hu, M. Johnson, G.A. Kay, K. Klekotko, Z. Lewis, D.C. Macallan, J. Mensah-Kane, S. Menzies, I. Monahan, C.M. Moore, G. Nebe-Von-

Caron, S.I. Owen, C. Sainter, A.A. Sall, J. Schouten, C.T. Williams, J. Wilkins, K. Woolston, J.R.A. Fittett, S. Krishna, and T. Planche. 2021. IgG seroconversion and pathophysiology in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Emerg. Infect. Dis.* **27**:85–91. doi:10.3201/EID2701.203074.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

48. [↵](#)

Takahashi, T., M.K. Ellingson, P. Wong, B. Israelow, C. Lucas, J. Klein, J. Silva, T. Mao, J.E. Oh, M. Tokuyama, P. Lu, A. Venkataraman, A. Park, F. Liu, A. Meir, J. Sun, E.Y. Wang, A. Casanovas-Massana, A.L. Wyllie, C.B.F. Vogels, R. Earnest, S. Lapidus, I.M. Ott, A.J. Moore, K. Anastasio, M.H. Askenase, M. Batsu, H. Beatty, S. Bermejo, S. Bickerton, K. Brower, M.L. Bucklin, S. Cahill, M. Campbell, Y. Cao, E. Courchaine, R. Datta, G. DeLuiis, B. Geng, L. Glick, R. Handoko, C. Kalinich, W. Khoury-Hanold, D. Kim, L. Knaggs, M. Kuang, E. Kudo, J. Lim, M. Linehan, A. Luccigan, A.A. Malik, A. Martin, I. Matos, D. McDonald, M. Minasyan, S. Mohanty, M.C. Muenker, N. Naushad, A. Nelson, J. Nouws, M. Nunez-Smith, A. Obaid, I. Ott, H.J. Park, X. Peng, M. Petrone, S. Prophet, H. Rahming, T. Rice, K.A. Rose, L. Sewanan, L. Sharma, D. Shepard, E. Silva, M. Simonov, M. Smolgovsky, E. Song, N. Sonnert, Y. Strong, C. Todeasa, J. Valdez, S. Velazquez, P. Vijayakumar, H. Wang, A. Watkins, E.B. White, Y. Yang, A. Shaw, J.B. Fournier, C.D. Odio, S. Farhadian, C. Delacruz, N.D. Grubaugh, W.L. Schulz, A.M. Ring, A.I. Ko, S.B. Omer, and A. Iwasaki. 2020. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*. **588**:315–320. doi:10.1038/s41586-020-2700-3.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

49. [↵](#)

Tegally, H., E. Wilkinson, M. Giovanetti, A. Iranzadeh, V. Fonseca, J. Giandhari, D. Doolabh, S. Pillay, E.J. San, N. Msomi, K. Mlisana, A. von Gottberg, S. Walaza, M. Allam, A. Ismail, T. Mohale, A.J. Glass, S. Engelbrecht, G. Van Zyl, W. Preiser, F. Petruccione, A. Sigal, D. Hardie, G. Marais, M. Hsiao, S. Korsman, M.-A. Davies, L. Tyers, I. Mudau, D. York, C. Maslo, D. Goedhals, S. Abrahams, O. Laguda-Akingba, A. Alisoltani-Dehkordi, A. Godzik, C.K. Wibmer, B.T. Sewell, J. Lourenço, L.C.J. Alcantara, S.L. Kosakovsky Pond, S. Weaver, D. Martin, R.J. Lessells, J.N. Bhiman, C. Williamson, and T. de Oliveira. 2021. Emergence of a SARS-CoV-2 variant of concern with mutations in spike glycoprotein. *Nature*. doi:10.1038/s41586-021-03402-9.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

50. [↵](#)

Thieme, C.J., M. Anft, K. Paniskaki, A. Blazquez-Navarro, A. Doevelaar, F.S. Seibert, B. Hoelzer, M.J. Konik, M.M. Berger, T. Brenner, C. Tempfer, C. Watzl, T.L. Meister, S. Pfaender, E. Steinmann, S. Dolff, U. Dittmer, T.H. Westhoff, O. Witzke, U. Stervbo, T. Roch, and N. Babel. 2020. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients. *Cell Reports Med*. **1**. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100092.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

51. [↵](#)

Trinité, B., F. Tarrés-Freixas, J. Rodon, E. Pradenas, V. Urrea, S. Marfil, M.L. Rodríguez de la Concepción, C. Ávila-Nieto, C. Aguilar-Gurrieri, A. Barajas, R. Ortiz, R. Paredes, L. Mateu, A. Valencia, V. Guallar, L. Ruiz, E. Grau, M. Massanella, J. Puig, A. Chamorro, N. Izquierdo-Useros, J. Segalés, B. Clotet, J. Carrillo, J. Vergara-Alert, and J. Blanco. 2021. SARS-CoV-2 infection elicits a rapid neutralizing antibody response that correlates with disease severity. *Sci. Rep.* **11**. doi:10.1038/s41598-021-81862-9.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

52. [↵](#)

Vahidy, F.S., A.P. Pan, H. Ahnstedt, Y. Munshi, H.A. Choi, Y. Tiruneh, K. Nasir, B.A. Kash, J.D. Andrieni, and L.D. McCullough. 2021. Sex differences in susceptibility, severity, and outcomes of coronavirus disease 2019: Cross-sectional analysis from a diverse US metropolitan area. *PLoS One*. **16**:e0245556. doi:10.1371/journal.pone.0245556.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

53. [↵](#)

Voysey, M., S.A. Costa

Clemens, S.A. Madhi, L.Y. Weckx, P.M. Folegatti, P.K. Aley, B. Angus, V.L. Baillie, S.L. Barnabas, Q.E. Bhorat, S. Bibi, C. Briner, P. Cicconi, E.A. Clutterbuck, A.M. Collins, C.L. Cutland, T.C. Darton, K. Dheda, C. Dold, C.J.A. Duncan, K.R.W. Emary, K.J. Ewer, A. Flaxman, L. Fairlie, S.N. Faust, S. Feng, D. M. Ferreira, A. Finn, E. Galiza, A.L. Goodman, C.M. Green, C.A. Green, M. Greenland, C. Hill, H.C. Hill, I. Hirsch, A. Izu, D. Jenkin, C.C.D. Joe, S. Kerridge, A. Koen, G. Kwatra, R. Lazarus, V. Libri, P.J. Lillie, N.G. Marchevsky, R.P. Marshall, A.V.A. Mendes, E.P. Milan, A.M. Minassian, A. McGregor, Y.F. Mujadidi, A. Nana, S.D. Padayachee, D.J. Phillips, A. Pittella, E. Plested, K.M. Pollock, M.N. Ramasamy, A.J. Ritchie, H. Robinson, A.

V Schwarzbald, A. Smith, R. Song, M.D. Snape, E. Sprinz, R.K. Sutherland, E.C. Thomson, M.E. Török, M. Toshner, D.P.J. Turner, J. Vekemans, T.L. Villafana, T. White, C.J. Williams, A.D. Douglas, A.V. S. Hill, T. Lambe, S.C. Gilbert, A.J. Pollard, and Oxford COVID Vaccine Trial Group. 2021. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet (London, England)*. **397**:881–891. doi:10.1016/S0140-6736(21)00432-3.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

54. [↵](#)

Wilk, A.J., A. Rustagi, N.Q. Zhao, J. Roque, G.J. Martínez-

Colón, J.L. McKechnie, G.T. Ivison, T. Ranganath, R. Vergara, T. Hollis, L.J. Simpson, P. Grant, A. Subramanian, A.J. Rogers, and C.A. Blish. 2020. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* **26**:1070–1076. doi:10.1038/s41591-020-0944-y.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

55. [↵](#)

Zhao, Q., M. Meng, R. Kumar, Y. Wu, J. Huang, Y. Deng, Z. Weng, and L. Yang. 2020. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **96**:131–135. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.086.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

56. [↵](#)

Zheng, H.-Y., M. Zhang, C.-X. Yang, N. Zhang, X.-C. Wang, X.-P. Yang, X.-Q. Dong, and Y.-T. Zheng. 2020. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* **17**:541–543. doi:10.1038/s41423-020-0401-3.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)