



## REVISTA EUROPEA DE INMUNOLOGÍA

[Eur J Immunol.](#) 2020 Dic; 50(12): 2025–2040.

Publicado en línea 2020 Nov 10. doi: [10.1002/eji.202048970](https://doi.org/10.1002/eji.202048970)

PMCID: PMC7756220

PMID: [33084029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33084029/)

### **Seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 y voluntarios sanos hasta 6 meses después del inicio de la enfermedad**

[Patrícia Figueiredo-Campos](#),<sup>1,\*</sup> [Birte Blankenhaus](#),<sup>1,\*</sup> [Catarina Mota](#),<sup>1,2</sup> [Andreia Gomes](#),<sup>1</sup> [Marta Serrano](#),<sup>1</sup> [Silvia Ariotti](#),<sup>1</sup> [Catarina Costa](#),<sup>1</sup> [Helena Nunes-Cabaço](#),<sup>1</sup> [António M. Mendes](#),<sup>1</sup> [Pedro Gaspar](#),<sup>2</sup> [M. Conceição Pereira-Santos](#),<sup>1</sup> [Fabiana Rodrigues](#),<sup>1</sup> [Jorge Condeço](#),<sup>3</sup> [M. Antonia Escoval](#),<sup>3</sup> [Matilde Santos](#),<sup>3</sup> [Mario Ramírez](#),<sup>1</sup> [José Melo-Cristino](#),<sup>1</sup> [J. Pedro Simas](#),<sup>1,4</sup> [Eugenia Vasconcelos](#),<sup>3</sup> [Ângela Afonso](#),<sup>1</sup> y [Marc Veldhoen](#)<sup>1</sup>

[Información del autor](#) [Notas del artículo](#) [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descargo de responsabilidad](#)

Este artículo ha sido [citado por](#) otros artículos en PMC.

### **Datos asociados**

[Materiales complementarios](#)

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

### **Abstracto**

### **Abstracto**

[Vete a:](#)

### **Introducción**

La infección por SARS-CoV-2 causa una amplia variedad de síntomas de la enfermedad, desde fiebre, astenia o mialgia, hasta neumonía y, en la mayoría de los casos graves, síndrome de dificultad respiratoria aguda conocido como COVID-19. Sin embargo, una gran cantidad de pacientes infectados por SARS-CoV-2 permanece asintomática. El SARS-CoV-2 se propagó rápidamente por todo el mundo y fue declarado pandemia mundial en marzo de 2020. Sigue siendo una amenaza continua para la salud y el bienestar socioeconómico. A pesar de que el

número mundial de infecciones alcanza decenas de millones, incluyendo casi un millón de muertes, debido a las medidas de mitigación, la tasa general de infección es relativamente baja con los puntos críticos de infección locales. Aunque el progreso científico es rápido, sigue existiendo una necesidad apremiante de comprender la respuesta inmune que sigue a la infección por SARS-CoV-2, incluido su papel durante la enfermedad y especialmente sus posibles efectos protectores a largo plazo.

Un objetivo inmune principal durante las infecciones por coronavirus es la proteína Spike (S), estrechamente asociada y dirigida por las respuestas neutralizantes de anticuerpos y la inmunidad protectora, en contraste con la mayoría de las otras proteínas virales [1, 2, 3, 4]. La proteína S es responsable de la interacción del SARS-CoV-2 con las células huésped a través de la unión ACE2 [5, 6, 7]. Se puede dividir en dos regiones, S1 y S2. La región extra-viral S1 contiene dentro de su segundo dominio el dominio de unión al receptor (RBD) [8]. La secuencia RBD del SARS-CoV-2 muestra una homología limitada con los coronavirus estacionales o EMC/2012, la causa del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS). Por el contrario, el SARS-CoV-2 RBD comparte el 73% de su secuencia con el RBD del SARS [3].

Los intentos de reducir y controlar el virus SARS-CoV-2 se basan en el aumento de la distancia interpersonal, incluido el cierre de gran parte de la actividad social y económica, así como las pruebas de infección aguda y las medidas de higiene personal. Esto se implementó temprano durante el brote, con el cierre de la Universidad de Lisboa después del 13 de marzo, 10 días después de los primeros casos registrados en Portugal. Sin embargo, durante la fase de transición posterior, las restricciones se han levantado constantemente. El retorno gradual a la actividad social y económica requiere una vigilancia activa para determinar los brotes locales, el rastreo de contactos y la cuarentena. Además, los más vulnerables a la COVID-19 deberán permanecer bajo una protección reforzada. La información importante es cómo se desarrolla la inmunidad protectora en la población en general y en grupos específicos como los profesionales de la salud. Una evaluación exhaustiva de la duración de la inmunidad protectora es fundamental para determinar las medidas que deben tomarse para prevenir y manejar futuras olas de SARS-CoV-2. Dicha información deberá recopilarse ampliamente, en diferentes lugares del mundo, reflejando las condiciones locales, como las medidas de contención y su calendario. Los datos obtenidos deberán ser precisos y los métodos utilizados transparentes y reproducibles para permitir comparaciones entre ubicaciones y países. El reciente brote de SARS-CoV-2 trae limitaciones con respecto al tiempo de exposición, pero también nos da la oportunidad de adquirir datos en tiempo real y desarrollar estudios de seguimiento longitudinales confiables.

Para determinar la tasa acumulada de infección en las comunidades y obtener información sobre la protección potencial contra la reinfección, los ensayos serológicos son críticos. Dependiendo de los objetivos del estudio, la configuración de tales ensayos se puede utilizar para la detección de la exposición al SARS-CoV-2, así como para obtener información sobre la actividad de neutralización, ya que se ha demostrado que los títulos de anticuerpos tanto para la proteína S como para la RBD se correlacionan bien con la actividad neutralizante [3, 9–11]. Describimos la

configuración detallada y la versatilidad de un ensayo de seroconversión para determinar la inmunidad humoral al SARS-CoV-2 que se utilizó para la detección de pacientes hospitalarios, voluntarios sanos post-COVID-19 y personal de la Universidad de Lisboa. Informamos que en la fase aguda los hombres producen más anticuerpos que las mujeres, pero los niveles se equilibran durante la fase de resolución y son similares entre los sexos en los meses posteriores a la infección por SARS-CoV-2. Demostramos que los anticuerpos contra SARS-CoV-2 Spike y su dominio RBD son fácilmente detectables en la mayoría de los casos, incluso en pacientes que reciben terapia inmunosupresora o antirretroviral. En línea con una respuesta inmune clásica, los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en la sangre alcanzan su punto máximo alrededor de la semana 3 posterior a la infección, y aunque los títulos de anticuerpos se reducen, los anticuerpos IgG siguen siendo detectables y muestran actividad de neutralización del virus durante al menos 6 meses después de la infección por SARS-CoV-2.

[Vete a:](#)

## Resultados

---

### Configuración del ensayo de seroconversión

El estándar de oro para la detección de anticuerpos sigue siendo el ELISA, que ofrece una alta flexibilidad y sensibilidad, pero una escalabilidad limitada [11]. SarS-CoV-2 Spike es un antígeno inmunogénico prominente y su RBD se conserva menos en comparación con otros coronavirus. Por lo tanto, el uso de Spike y su RBD se convirtió rápidamente en el foco de los ensayos de seroconversión. Elegimos para el presente estudio el ensayo desarrollado por Florian Krammer y su laboratorio, un formato que recibió la aprobación de emergencia de la FDA en abril de 2020 y se describe en detalle [12].

Los sueros humanos representan un peligro biológico para los trabajadores de laboratorio y pueden contener potencialmente no solo SARS-CoV-2, sino también otros virus infecciosos. Por lo tanto, todos los pasos de ELISA se realizaron a nivel de bioseguridad (BSL) 2, con equipo de protección personal BSL3. Se recomiendan procedimientos de inactivación, pero pueden tener efectos inciertos sobre la exactitud de las pruebas serológicas [13]. Probamos tres procedimientos comunes: (a) inactivación por calor de 1 h a 56 ° C, o (b) la adición de un surfactante no iónico (0,1% Triton X-100), o (c) la combinación de ambos, en comparación con el suero limpio. Las diluciones seriadas de dos muestras de suero elegidas de SARS-CoV-2 PCR positivas mostraron detección de IgG siguiendo los tres métodos de inactivación y fueron indiscriminadas de los controles no tratados (Fig. 1A).

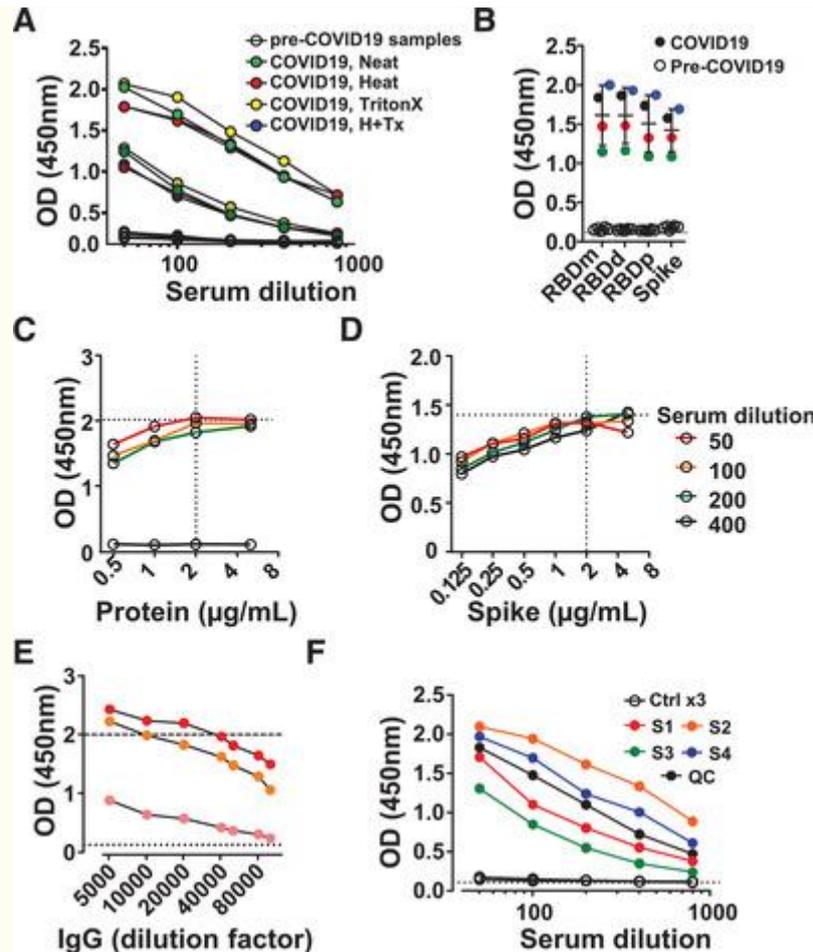


Figure 1

Configuración de SARS-CoV-2 ELISA. Detección de anticuerpos IgG contra el SARS-CoV-2 en muestras de suero de sujetos con PCR positivo para sars-CoV-2 o controles pre-COVID-19 utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos recubiertas con proteína RBD para ELISA. La absorbancia (densidad óptica, OD) se evaluó a 450 nm. (A) Tres muestras de suero, control pre-COVID-19, título medio y alto fueron tratadas por los métodos indicados para inactivar las partículas del virus. (B) Se utilizó monómero RBD aislado, dímero RBD, RBD agrupado y proteína Spike para el recubrimiento en las mismas condiciones, y se analizaron cuatro muestras de suero COVID-19 (coloreadas) frente a cuatro pre-COVID-19 (símbolos abiertos). (C y D) La placa de 96 pozos se recubrió con (C) RBD o (D) proteína Spike a las concentraciones indicadas y se probaron tres sueros COVID-19 (coloreados) y pre-COVID-19 (negros). (E) Titulación de dilución de anticuerpos secundarios anti-IgG, a la dilución indicada en placa de 96 pozos recubierta con 2 µg/ml de proteína RBD para tres sueros. (F) Control de calidad (QC) y dilución seriada de muestras séricas. La muestra de control de calidad es una mezcla de las muestras de suero analizadas de cuatro trabajadores de la salud (S1-S4). La línea discontinua indica valores en blanco. Los datos muestran valores de muestra individuales.

La proteína S tiene una estructura trimérica, mientras que la expresión in vitro de RBD da como resultado la generación de proteínas monoméricas y dimericas. Sin embargo, cuando probamos la capacidad de la proteína mono y dimerica RBD para la unión a anticuerpos, ambas se desempeñaron de manera

similar y comparable a la fracción total de proteínas (Figura [1B](#)). Se optimizaron parámetros adicionales que afectan el rendimiento de los ensayos ELISA, como el tiempo de recubrimiento (o/n – 1 semana a 4°C), el tiempo y la temperatura de incubación sérica, así como la cantidad de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) y el tiempo de desarrollo (ajustado a 10 min) (Información de apoyo Fig. S1A, datos no mostrados). Las placas recubiertas fueron estables durante una semana y la incubación de 1 o 2 h a temperatura ambiente o 37 ° C fue indistinguible. Para garantizar que los ELISA funcionen en condiciones no saturantes, realizamos una titulación completa de los antígenos de captura (de 0,125 a 10 µg/ml) y los anticuerpos secundarios (1:5000–1:100 000) utilizados para la detección de anticuerpos. Las proteínas del SARS-CoV-2 se titularon y evaluaron utilizando sueros de pacientes individuales (títulos altos, medios y bajos). Simultáneamente, se titularon los anticuerpos secundarios, como anti-IgG, pero también anti-IgM, anti-IgA y anti-Ig total, por lo que se utilizó OD de 2.0 como límite superior para evitar la saturación del ensayo (Fig. [1C–E](#); Información de apoyo Fig. S1B–G).

Con el fin de prepararse para el uso diagnóstico, la generación de suero de control de calidad (QC) es fundamental para validar cada ejecución del ensayo. Los sueros de pacientes expuestos son los más deseables, ya que contendrán anticuerpos con una variedad de avidedezes e isotipos, proporcionando propiedades de unión más estables. Sin embargo, es necesario obtener un volumen suficiente para garantizar que haya suficiente material para completar el proceso de validación de ELISA y el estudio o la serie de estudios que se realizarán. Los sueros de cuatro voluntarios expuestos al SARS-CoV-2 pero sanos fueron evaluados y agrupados para servir como control de calidad para ensayos posteriores (Fig. [1F](#)). En última instancia, las señales de anticuerpos deben disminuir de una manera dependiente de la dosis utilizando diluciones en serie de los sueros, lo que permite la determinación precisa de los títulos de anticuerpos (Fig. S1H).

### **Validación del ensayo de seroconversión**

Se utilizaron 100 sueros pre-COVID-19 de voluntarios sanos recolectados entre octubre de 2012 y noviembre de 2017 como controles negativos (Tabla [1](#)). Además, obtuvimos 19 sueros de personal sanitario hospitalario con PCR positivos con síntomas principalmente leves, poco más de 30 días desde los primeros síntomas y el resultado positivo de la PCR SARS-CoV-2 (Tabla [2](#)). Se detectó seroconversión en los sueros de todos los pacientes con PCR positivo para sars-CoV-2 utilizando la parte RBD del antígeno S del SARS-CoV-2 y 18 de 19 utilizando la proteína S del SARS-CoV-2 S mediante el sondeo de IgG (Figura [2A](#)). La curva de características operativas del receptor (ROC) determinó la sensibilidad y la especificidad y el punto de corte del ensayo en 0.4171 y 0.4816 para RBD y proteína S, respectivamente, correspondiente a una especificidad del 100% y una sensibilidad del 99% para RBD y una especificidad del 94.74% y una sensibilidad del 98% para Spike en este análisis inicial (Fig. [2B y C](#) y Tabla [3](#)).

**Table 1**

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, n)	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre-COVID-19		Pre-COVID-19 Allergies		Asymptomatic	
	<b>Age (years)</b>	63.23	(20-93)	68.77	(20-98)	54.7	(20-3)	30.5	(2-9)	62.85
<b>Male</b>	48%	91	54%	42	49%	49	51%	41	55%	22
<b>Female</b>	52%	98	46%	36	51%	51	49%	40	45%	18
<b>Sample collection date</b>	6/4/2020 - 12/8/2020		6/4/2020 - 12/8/2020		31/10/2012 - 10/11/2017		03/01/2019 - 29/10/2019		6/4/2020 - 12/8/2020	
<b>SARS-CoV-2 PCR+</b>	100%		100%		N/A		N/A		100%	

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, n)	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre-COVID-19		Pre-COVID-19 Allergies		Asymptomatic	
	<b>Seroconversion (Spike)</b>	82%	(155/189)	50%	(39/78)	2.0%	(2/100)	6.2%	(5/81)	50%
<b>Seroconversion (RBD)</b>	84%	(159/189)	51%	(40/78)	0.0%	(0/100)	7.4%	(6/81)	50%	(20/40)
<b>Disease Severity</b>										
Mild	18%	31	16%	13	N/A		N/A		0%	
Moderate	73%	127	73%	60	N/A		N/A		0%	
Severe	10%	17	11%	9	N/A		N/A		0%	

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, <i>n</i> )	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre- COVID-19	Pre- COVID-19 Allergies	Asymptomatic
	<b>Symptoms</b>						
Cough	60%	105	61%	50	N/A	N/A	N/A
Myalgia	30%	53	18%	15	N/A	N/A	N/A
Fever	60%	105	59%	48	N/A	N/A	N/A
Anosmia	9%	15	2%	2	N/A	N/A	N/A
Dyspnea	35%	62	49%	40	N/A	N/A	N/A
Diarrhea	13%	23	12%	10	N/A	N/A	N/A

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, <i>n</i> )	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre-COVID-19	Pre-COVID-19 Allergies	Asymptomatic
	Odynophagia	1%	1	0%	0	N/A	N/A
Hypogeusia	3%	6	0%	0	N/A	N/A	N/A
Headache	19%	33	10%	8	N/A	N/A	N/A
Rhinorrhea	1%	1	0%	0	N/A	N/A	N/A
Asthenia	33%	57	27%	0	N/A	N/A	N/A
<b>Days Post Symptom onset at collection</b>	15.53	(3-52)	3.88	(1-7)	N/A	N/A	N/A

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, n)	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre-COVID-19	Pre-COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	<b>PCR+ day to serum collection</b>	12.07	(1-63)	4.04	(0-15)	N/A	N/A	10.74
<b>Underlying conditions</b>								
None	21.71	38	6.10%	5	N/A	N/A	22.22	6
	%						%	
Chronic kidney disease	10.86	19	17.07	14	N/A	N/A	40.74	11
	%		%				%	
Diabetes	25.71	45	25.61	21	N/A	N/A	33.33	9
	%		%				%	

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, n)	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre-COVID-19	Pre-COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	%	n	%	n	%	%	%	n
Hypertension	50.29%	88	57.32%	47	N/A	N/A	77.78%	21
Heart disease	6.29%	11	17.07%	14	N/A	N/A	7.41%	2
Alzheimer	0.00%	0	1.22%	1	N/A	N/A	0.00%	0
Cerebrovascular disease	3.43%	6	7.32%	6	N/A	N/A	0.00%	0
Dementia/Parkinson	14.29%	25	21.95%	18	N/A	N/A	11.11%	3

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, <i>n</i> )	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre- COVID-19	Pre- COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	%	<i>n</i>	
Asthma	1.14%	2	4.88%	4	N/A	N/A	0.00% 0	
Cancer	10.29%	18	7.32%	6	N/A	N/A	40.74% 11	
COPD	2.86%	5	4.88%	4	N/A	N/A	0.00% 0	
HIV	2.86%	5	4.88%	4	N/A	N/A	11.11% 3	
SLE	1.14%	2	0.00%	0	N/A	N/A	0.00% 0	
<b>Medication</b>								

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, n)	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre- COVID-19	Pre- COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	%	n	%	n	%	%	n	
None	89.71%	157	85.37%	70	N/A	NA	55.56%	15
Midostaurin	0.57%	1	0.00%	0	N/A	NA	0.00%	0
Aciclovir	0.57%	1	0.00%	0	N/A	NA	0.00%	0
Tacrolimus	2.29%	4	2.44%	2	N/A	NA	0.00%	0
Prednisolona	4.57%	8	6.10%	5	N/A	NA	0.00%	0
Quimioterapia (Paclitaxel)	0.00%	0	0.00%	0	N/A	NA	7.41%	2

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, <i>n</i> )	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre- COVID-19	Pre- COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	%	%	<i>n</i>
Metotrexato	0.00%	0	1.22%	1	N/A	NA	0.00%	0
Raltegravir	0.57%	1	1.22%	1	N/A	NA	3.70%	1
Darunavir/Cobicistat	0.57%	1	1.22%	1	N/A	NA	3.70%	1
Exemestano	1.14%	2	0.00%	0	N/A	NA	0.00%	0
Azatioprina	1.14%	2	1.22%	1	N/A	N/A	0.00%	0
Dexametasona	0.00%	0	0.00%	0	N/A	N/A	3.70%	1

Demografía de los pacientes participantes, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Clinical data (%, <i>n</i> )	COVID-19		COVID-19 (<Day7)		Pre- COVID-19	Pre- COVID-19 Allergies	Asymptomatic	
	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	%	%	<i>n</i>
Tamoxifeno	0.57%	1	1.22%	1	N/A	N/A	0.00%	0
Abacavir	0.57%	1	1.22%	1	N/A	N/A	7.41%	2
Lamivudina	0.57%	1	1.22%	1	N/A	N/A	7.41%	2
Micofenolato	1.14%	2	1.22%	1	N/A	N/A	0.00%	0
Entecavir	0.57%	1	0.00%	0	N/A	N/A	0.00%	0
Dolutegravir	0.57%	1	0.00%	0	N/A	N/A	7.41%	2

[Open in a separate window](#)

**Table 2**

Demographics of healthcare participants, disease severity categories, and symptoms

<b>Clinical data (% , n)</b>	<b>Healthcare workers</b>	
<b>Age (years)</b>	41.84	(25-61)
<b>Male (%)</b>	16%	3
<b>Female (%)</b>	84%	16
<b>Sample collection date</b>	6/4/2020 - 27/5/2020	
<b>SARS-CoV-2 PCR+</b>	100%	
<b>Seroconversion (Spike)</b>	94.70%	(18/19)
<b>Seroconversion (RBD)</b>	100%	(19/19)
<b>Disease Severity</b>		
Asymptomatic	5%	1
Mild	84%	16
Moderate	11%	2

**Clinical data (% , n)****Healthcare workers**

---

Severe

0%

0

**Symptoms**

Cough

74%

14

Myalgia

79%

15

Fever

68%

13

Anosmia

37%

7

Dyspnea

11%

2

Diarrhea

16%

3

Odynophagia

5%

1

Hypogeusia

21%

4

Headache

63%

12

Clinical data (% , n)	Healthcare workers	
Rhinorrhea	5%	1
Asthenia	32%	6
Days Post Symptom onset at collection	34.5	(3-55)
PCR+ day to serum collection	33.05	(13-63)

[Open in a separate window](#)

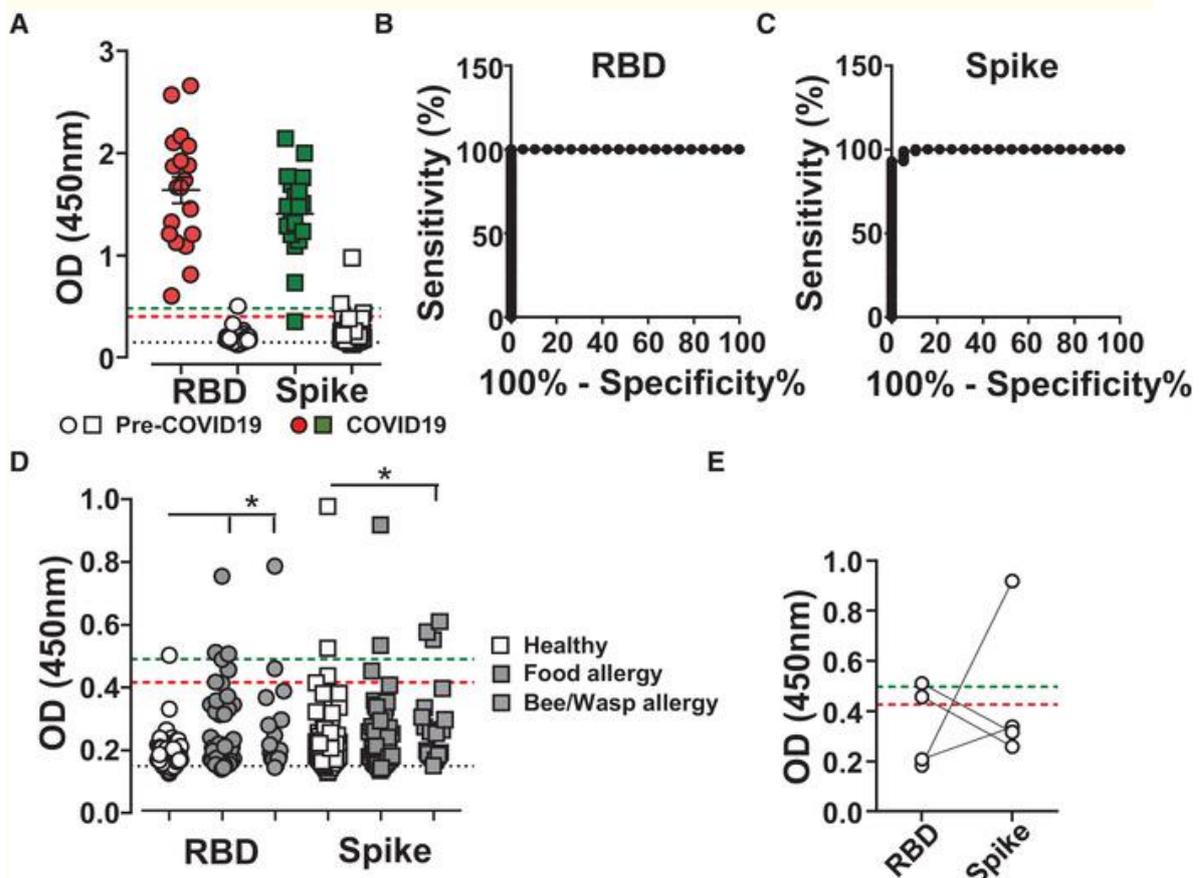


Figure 2

Pruebas ELISA del SARS-CoV-2. Detección de anticuerpos IgG del SARS-CoV-2 en muestras de suero de sujetos con PCR positivo para sarS-CoV-2 (coloreados) o controles pre-COVID-19 (abiertos) utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos recubiertas con proteínas RBD (círculos) o Spike (al cuadrado) para ELISA. La absorbancia se evaluó a 450 nm. (A) Se evaluó el suero a 1/50 de dilución de 19 trabajadores de la salud positivos para PCR-SARS-CoV-2 para RBD anti-SARS-CoV-2 y Spike IgG y se compararon con 100 sueros pre-COVID-19. Las barras indican la media  $\pm$  análisis SD. (B y C) ROC, trazando la sensibilidad contra la especificidad de (B) RBD o (C) muestras de Spike como se muestra en (A). D) Se probaron alergias a las alergias a rbdesinidad y a la proteína Spike de las cohortes pre-COVID-19, sanas (100 donantes, símbolos abiertos), alergias alimentarias (61 donantes, símbolos gris oscuro) y alergias a abejas/avispa (20 donantes, símbolos gris claro). (E) Ejemplo de reactividad cruzada en RBD o proteína Spike del suero pre-COVID-19 como se usa en (D). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con el software Graphpad Prism.  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ . Las líneas discontinuas indican valores negros en blanco; Rojo, corte RBD; Verde, corte de espiga. Los datos muestran valores de muestra individuales. \*\*\*\*

### Cuadro 3

Análisis ROC de RBD o proteína Spike después de la detección inicial de suero y sueros pre-COVID-19 de trabajadores de la salud que eran POSITIVOS PARA PCR al SARS-COV-2

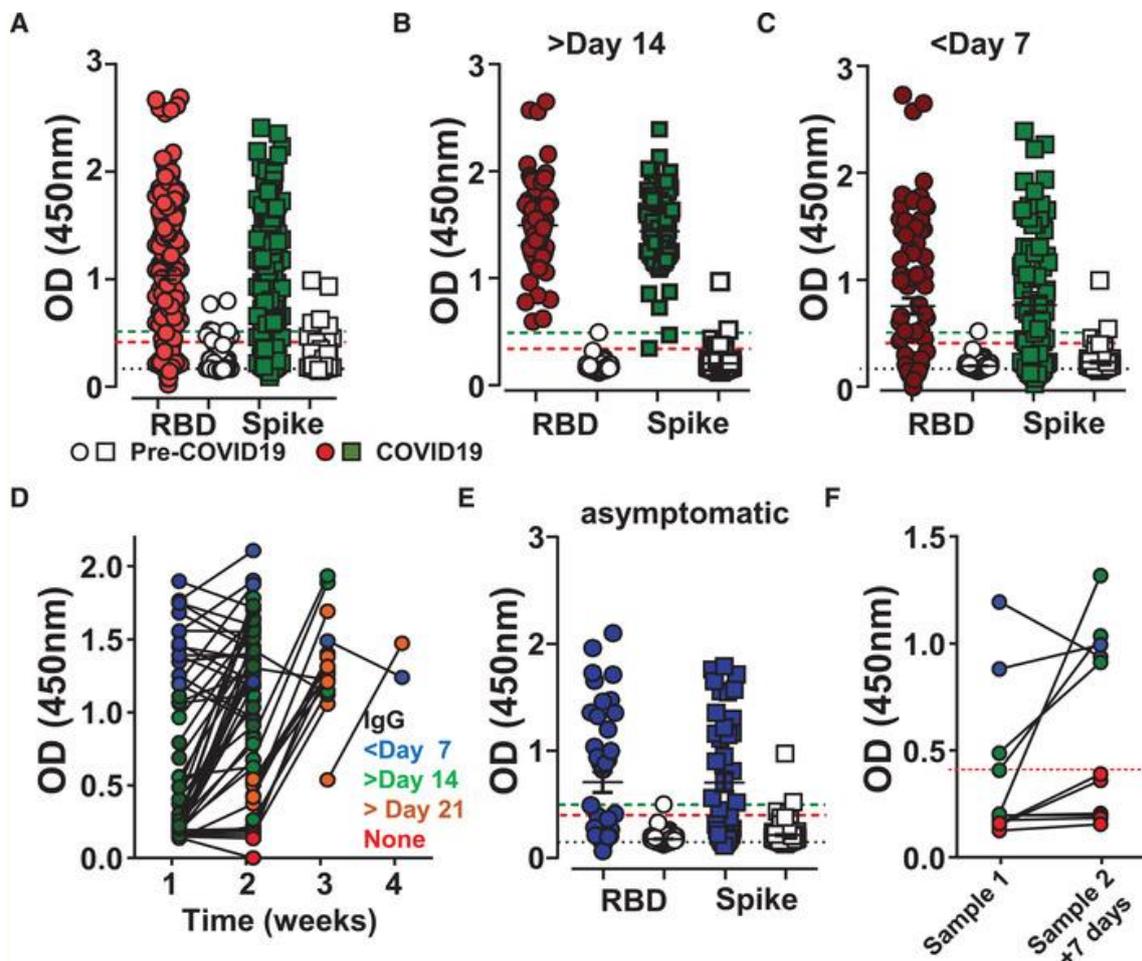
RBD					Clavar				
Corta	Sensibilidad	IC	Especificidad	IC	Corta	Sensibilidad	IC	Especificidad	IC
r	ad %	(%)	ad %	(%)	r	ad %	(%)	ad %	(%)
0.417	99.00	94.55	100.00	82.35	0.481	98.00	92.9	94.74	73.9
1		-		-	6		6-		7-
		99.97		100.0			99.7		99.8
				0			6		7
0.553	100.00	96.38	100.00	82.35	0.630	99.00	99.5	94.74	73.9
2		-		-	2		5-		7-
		100.0		100.0			99.9		99.8
		0		0			7		7

[Abrir en una ventana separada](#)

Con el fin de aumentar el tamaño de la muestra pre-COVID-19 y reflejar un espectro más amplio de la población, obtuvimos 61 muestras de individuos con alergias alimentarias y 20 muestras de individuos con alergias a abejas y avispas, porque estos contienen mayores niveles de anticuerpos [14]. El suero de sujetos alérgicos aumentó el fondo observado tanto en las proteínas RBD como en las spike (Figura 2D). De importancia, a menudo no se observó un aumento de la reactividad a una proteína en la segunda proteína del SARS-CoV-2 (Figura 2E), que corrobora el proceso de dos pasos de detección de RBD y, posteriormente, los sueros que se encontraron positivos para Spike [12].

### **Cribado de seroconversión de pacientes hospitalizados por COVID-19**

Posteriormente analizamos 307 muestras de pacientes hospitalizados que dieron positivo por SARS-CoV-2 por PCR para detectar la presencia de IgG anti-SARS-CoV-2. Las muestras se adquirieron entre el 6 de abril y el 12 de agosto de 2020 y en diferentes momentos tras el desarrollo de los síntomas de COVID-19. Los pacientes demostraron una variedad de síntomas y condiciones médicas subyacentes (Tabla 1). El cribado de seroconversión dio lugar a mediciones variadas de la OD al incluir todas las muestras evaluadas (Fig. 3A). Teniendo en cuenta el número de días que tomó la inmunidad celular adaptativa a iniciar, separamos aún más las muestras en 14 días después del inicio, excluyendo aquellas que eran asintomáticas, lo que reveló una seroconversión robusta en 73 de 73 (100%) muestras en RBD y 71 de 73 (97,3%) en proteína Spike (Fig. 3B). Aunque las respuestas de anticuerpos tardan en madurar, alrededor de la mitad de las muestras obtenidas en la primera semana después de los síntomas mostraron una seroconversión robusta de IgG dentro de la primera semana de los síntomas, 40 de 78 (51%) y 39 de 78 (50%) en RBD y Spike, respectivamente (Fig. 3C). Las muestras de seguimiento de 68 pacientes mostraron que aquellos que se habían seroconvertido en la primera semana de síntomas mantuvieron altos niveles de IgG 1 semana después (27/27, 100%). De todos los sujetos sintomáticos, aquellos que no tuvieron una respuesta IgG dentro de la primera semana, 30 de 41 (73%) mostraron una respuesta robusta siete días después (días 9-14). A los 11 pacientes restantes de 41 (27%) se les analizó su segunda muestra en la segunda semana, antes del día 14 después del inicio de los síntomas, aún no mostraron una respuesta IgG. Sin embargo, aunque algunos pacientes no mostraron una respuesta igG en la segunda o incluso tercera semana después del inicio de los síntomas, los que se probaron nuevamente 1 semana después todos se seroconvirtieron (10/10) (Fig. 3D). De aquellos que no se seroconvirtieron dentro de la semana 2 de los síntomas de COVID-19 (11/41, 27%), algunos tenían afecciones subyacentes, como lupus eritematoso sistémico (LES) (1), linfoma (1), quimioterapia (1) o medicamentos inmunosupresores (3).



**Figura 3**

Seroconversión en pacientes hospitalizados. Detección de anticuerpos IgG del SARS-CoV-2 en muestras de suero de pacientes hospitalarios con PCR positivo para SARS-CoV-2 (coloreados) o controles pre-COVID-19 (abiertos) utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos recubiertas con proteínas RBD (círculos) o Spike (al cuadrado) para ELISA. La absorbancia se evaluó a 450 nm. (A) Resumen de todos los más de 300 sujetos con pruebas PCR positivas para el SARS-CoV-2 del Hospital Santa María y 181 controles pre-COVID-19 acumulados. (B) Muestras seleccionadas presentadas en (A) post-día 14 de los síntomas iniciales reportados de COVID-19 ( $n = 73$  donantes de COVID-19,  $n = 100$  controles sanos pre-COVID-19). (C) Muestras seleccionadas presentadas en (A) pre-día 7 de los síntomas iniciales reportados de COVID-19 ( $n = 78$  donantes de COVID-19,  $n = 100$  controles sanos pre-COVID-19). (D) Seguimiento longitudinal de los pacientes muestreados en la semana indicada de inicio de los síntomas de COVID-19 y re-muestreo 7 días después ( $n = 76$  donantes de COVID-19). El azul indica la señal alta continua, el verde los que se seroconvirtió en el segundo muestreo en la semana 2, el naranja el que se seroconvirtió en el segundo muestreo pasada la semana 2, el rojo aquellos en los que no se detectó seroconversión en el primer y segundo muestreo. (E) Muestras seleccionadas presentadas en (A) sin síntomas reportados de COVID-19 ( $n = 40$  donantes de COVID-19,  $n = 100$  controles sanos pre-COVID-19). (F) Seguimiento longitudinal de pacientes asintomáticos muestreados en la primera semana de inicio de los síntomas de COVID-19 y re-muestreo 7 días después, colores utilizados como en (D) ( $n = 10$  donantes). Las líneas discontinuas indican valores negativos en blanco; Rojo, corte RBD; Verde, corte de

**espiga. Los datos muestran valores de muestra individuales, las barras indican la media  $\pm$  SD.**

Algunos pacientes que fueron positivos para pcr el SARS-CoV-2 dentro de un promedio de 8,7 días (-1-53) después de la extracción de sangre, no mostraron ningún síntoma clásico de COVID-19 (Tabla [1](#)). De estos, 20 de 40 (50%) pacientes mostraron seroconversión para IgG anti-SARS-CoV-2 (Figura [3E](#)). Dado que no se informaron síntomas, no quedó claro en qué etapa de la infección se encontraban estos pacientes. Aquellos que fueron IgG negativos pueden haber estado dentro de los primeros días de la infección, o los niveles de anticuerpos fueron muy bajos. Sin embargo, el muestreo repetido de varios pacientes siete días después reveló que solo 3/11 (27%) pacientes se seroconvirtieron, aunque la OD siguió siendo modesta, mientras que en seis de 11 (55%) los niveles de IgG RBD anti-SARS-CoV-2 permanecieron por debajo del punto de corte del ensayo (Figura [3F](#)). Esto sugiere una respuesta de seroconversión limitada o muy retrasada.

### **Efecto de la medicación demográfica, inmunomoduladora y antiviral sobre la seroconversión**

La seroconversión de IgG, 14 días después del inicio de los síntomas, se detectó igualmente bien entre pacientes femeninos y masculinos, independientemente de la edad, y tanto para RBD como para la proteína Spike (Fig. [4A and B](#)).

Seroconversion detection or the antibody response, since patients were assayed on average 8.5 days after being SARS-CoV-2 PCR positive, were reduced or delayed in those asymptomatic for COVID-19 compared with those experiencing COVID-19 symptoms (Fig. [4C](#)). In line with an adaptive immune response taking several days to develop, the main factor influencing seroconversion was time since the onset of COVID-19 symptoms (Figure [4D](#)).

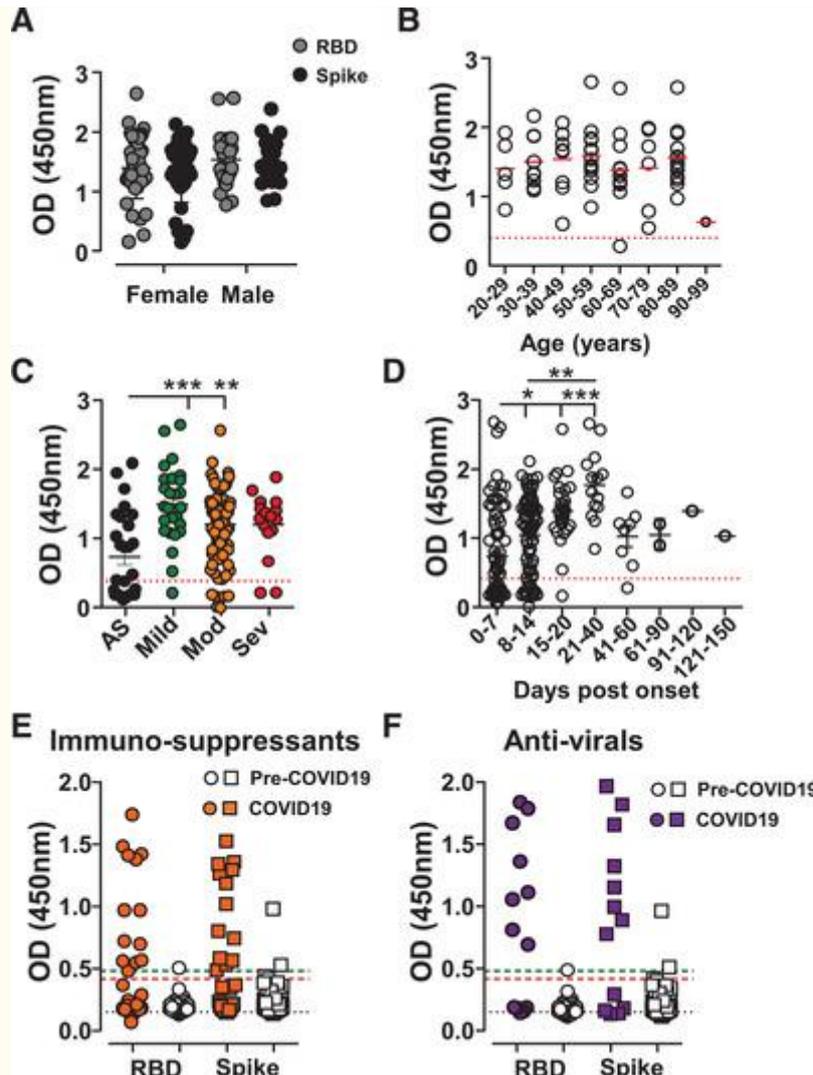


Figura 4

Seroconversión en subgrupos y tiempo. Detección de anticuerpos IgG para sars-CoV-2 en muestras de suero de pacientes hospitalizados con PCR positivo para SARS-CoV-2 o controles pre-COVID-19 utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos recubiertas con proteínas RBD (círculos) o Spike (al cuadrado) para ELISA. La absorbancia se evaluó a 450 nm. (A y B) Se trazaron señales de IgG OD de (A) mujeres ( $n = 42$ ) y hombres ( $n = 28$ ) o (B) por edad en el momento de la toma de muestras de sangre, de esos sujetos 14 días después de los primeros síntomas de COVID-19. La línea roja marca la media. (C y D) Las señales de IgG OD de todos los sujetos se trazaron por (C) gravedad de los síntomas o (D) a lo largo del tiempo desde el día de los primeros síntomas. (E y F) Los pacientes hospitalarios que recibieron (E) medicación inmunomoduladora (naranja,  $n = 31$ ) o (F) medicación antiviral (púrpura,  $n = 12$ ) que dieron positivo a la PCR del SARS-CoV-2 fueron evaluados para anticuerpos IgG y comparados con los controles pre-COVID-19 (símbolos abiertos,  $n = 100$ ). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis utilizando el software Graphpad Prism.  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ . Los datos muestran valores de muestra individuales, las barras indican la media  $\pm$  SD. \*\*\*\*\*

Dentro de la cohorte de pacientes hospitalarios, dos grupos fueron de especial interés, los que recibieron terapia inmunosupresora y los que recibieron medicación antiviral debido a infecciones con vih o virus de la hepatitis B (VHB) (Tabla 4).

Dentro de la cohorte de pacientes que recibieron medicación inmunosupresora, siete de 29 (24%) fueron asintomáticos para COVID-19. La tasa media de seroconversión en ambos grupos fue inferior a la observada en la cohorte colectiva de pacientes o en los trabajadores sanitarios, con un 9/29 (31%) (Tabla 4).

#### Cuadro 4

Demografía de los pacientes participantes bajo medicación inmunomoduladora o antiviral, categorías y síntomas de gravedad de la enfermedad, afecciones subyacentes y medicamentos

Datos clínicos (% , n)	Inmunomodulador		Antiviral	
<b>Edad (años)</b>	60.21	(20–87)	51.87	(43–60)
<b>Hombres (%)</b>	31%	9	100%	12
<b>Mujeres (%)</b>	69%	20	0%	0
<b>Fecha de recogida de la muestra</b>	6/4/2020 - 12/8/2020		6/4/2020 - 12/8/2020	
<b>PCR+ del SARS-CoV-2</b>	100%		100%	
<b>Seroconversión (Spike)</b>	28%	(8/29)	75%	(9/12)
<b>Seroconversión (RBD)</b>	31%	(9/29)	75%	(9/12)
<b>Gravedad de la enfermedad</b>				

<b>Datos clínicos (% , n)</b>	<b>Inmunomodulador</b>		<b>Antiviral</b>	
Asympomatic	24%	7	25%	3
Leve	14%	4	17%	2
Moderado	59%	17	58%	7
Muy fuerte	3%	1	0%	0
<b>Síntomas</b>				
Tos	45%	13	0%	0
Mialgia	10%	3	17%	2
Fiebre	41%	12	58%	7
Anosmia	7%	2	0%	0
Disnea	31%	9	42%	5
Diarrea	0%	0	17%	2

<b>Datos clínicos (% , n)</b>	<b>Inmunomodulador</b>		<b>Antiviral</b>	
Odinofagia	0%	0	0%	0
Hypogeusia	0%	0	0%	0
Jaqueca	7%	2	17%	2
Rinorrea	0%	0	0%	0
Astenia	28%	8	8%	1
<b>Días después del inicio de los síntomas en la recolección</b>	10.96	(2-35)	9.00	(3-11)
<b>PCR+ día a la recolección de suero</b>	6.43	(1-13)	6.17	(1-11)
<b>Condiciones subyacentes</b>				
Ninguno	0.00%	0	0.00%	0
Enfermedad renal crónica	17.24%	5	25.00%	3

<b>Datos clínicos (% , n)</b>	<b>Inmunomodulador</b>		<b>Antiviral</b>	
Diabetes	17.24%	5	16.67%	2
Hipertensión	34.48%	10	16.67%	2
Enfermedad cardíaca	6.90%	2	0.00%	0
Alzheimer	0.00%	0	0.00%	0
Enfermedad cerebrovascular	3.45%	1	0.00%	0
Demencia/Parkinson	17.24%	5	0.00%	0
Asma	0.00%	0	0.00%	0
Cáncer	37.93%	11	0.00%	0
EPOC	0.00%	0	0.00%	0
VIH	0.00%	0	91.67%	11
SLE	6.90%	2	0.00%	0

Datos clínicos (% , n)	Inmunomodulador		Antiviral	
	%	n	%	n

**Medicación**

Ninguno	0.00%	0	0.00%	0
Midostaurin	3.45%	1	0.00%	0
Aciclovir	3.45%	1	0.00%	0
Tacrolimus	17.24%	5	0.00%	0
Prednisolona	41.38%	12	0.00%	0
Quimioterapia (Paclitaxel)	6.90%	2	0.00%	0
Metotrexato	3.45%	1	0.00%	0
Raltegravir	0.00%	0	25.00%	3
Darunavir/Cobicistat	0.00%	0	25.00%	3
Exemestano	6.90%	2	0.00%	0

Datos clínicos (% , n)	Inmunomodulador		Antiviral	
	%	n	%	n
Azatioprina	10.34%	3	0.00%	0
Dexametasona	3.45%	1	0.00%	0
Tamoxifeno	6.90%	2	0.00%	0
Abacavir	0.00%	0	33.33%	4
Lamivudina	0.00%	0	33.33%	4
Micofenolato	6.90%	2	0.00%	0
Entecavir	0.00%	0	8.33%	1
Dolutegravir	0.00%	0	25.00%	3

[Abrir en una ventana separada](#)

Dentro de la cohorte hospitalaria, obtuvimos 29 sueros de pacientes que recibieron fármacos inmunosupresores, incluidos 13 de 29 (40%) que recibieron los glucocorticoides prednisona o dexametasona. Los sueros de estos pacientes se recogieron entre los días 2 y 35 después del inicio de los síntomas de COVID-19. En esta cohorte, todos los pacientes dieron positivo al SARS-CoV-2 por PCR, 20 de 29 (69%) no se seroconvirtieron (Fig. 4E). De estos 20, siete (35%) eran asintomáticos, y tres (15%) se hicieron la prueba dentro de los 7 días posteriores a los síntomas. De acuerdo con la ayuda requerida de células T para el cambio de isotipo, tres de cinco (67%) pacientes con el inhibidor de la calcineurina Tacrolimus, que se combinó con prednisona, no se seroconvirtieron. El uso de corticosteroides tuvo un efecto inhibitorio sobre la producción de anticuerpos, con aquellos pacientes que se seroconvirtieron

mostrando una señal baja. El paciente en quimioterapia (Paclitaxel) no mostró una respuesta IgG RBD anti-SARS-CoV-2. Tres (3/29, 10%) pacientes que recibieron fármacos inmunomoduladores mostraron una respuesta IgG anti-SARS-CoV-2 similar en comparación con los pacientes sin dicha medicación (días 5 a 13). Dos de ellos recibieron prednisolona o metotrexato. Aunque el número de pacientes analizados fue modesto, estos hallazgos indican que los medicamentos inmunosupresores inhiben la seroconversión tras la infección por SARS-CoV-2.

Doce muestras fueron de pacientes que previamente contrajeron VIH1 o VIH2 y fueron tratados con terapia antirretroviral (Raltegravir, Darunavir/Cobicistat, Lamivudina y Dolutegravir) y uno con VHB que recibió Entecavir. Todos los pacientes eran hombres y la seroconversión del SARS-CoV-2 se analizó dentro de los 11 días posteriores al inicio de los síntomas. La mayoría de los pacientes (9/12, 75%) seroconvirtieron (Fig. 4F). De los tres pacientes VIH restantes, dos eran asintomáticos y uno fue una muestra temprana tomada solo 3 días después de los síntomas de COVID-19. Estos resultados sugieren que la medicación antirretroviral no interfiere con la seroconversión del SARS-CoV-2.

### **La gran pantalla de seroconversión muestra una exposición limitada al SARS-CoV-2**

La Universidad de Lisboa decidió cerrar para todos los trabajos no esenciales temprano durante el brote de COVID-19, a partir de la medianoche del 13 de marzo. Desde el brote inicial, los niveles de infección reportados en Portugal se han mantenido modestos en comparación con los países europeos cercanos, con 5200 casos por millón de la población reportados (Johns Hopkins, Worldometer, agosto de 2020). Para determinar la seroprevalencia en el personal de la Universidad, se evaluaron 2571 empleados, en todas las divisiones, con suero obtenido entre el 13 de mayo y el 10 de julio de 2020. Como se mencionó, nuestro ensayo se basa en Stadlbauer et al. [12] que recibieron la aprobación de emergencia de la FDA utilizando un método de dos pasos. Con la expectativa de una baja prevalencia de infección, primero examinamos al personal en una sola dilución utilizando la configuración como se muestra en la Figura. 5A. Se detectaron 68 muestras con una OD por encima del valor de corte de 0,41 (2,6%) (Fig. 5B). Estas muestras se reevaluaron posteriormente, utilizando tanto RBD como proteína Spike, así como dos diluciones séricas, 1/50 y 1/150, como se muestra en la Figura. 5C. De las 68 muestras analizadas, 38 (56%) fueron confirmadas positivas durante el segundo ensayo (Fig. 5D y E), lo que resulta en una prevalencia de infección del 1,5%. Las muestras con una señal intermedia para RBD, a menudo justo por encima del punto de corte, con frecuencia fallaron en el segundo ensayo en Spike o incluso RBD (Fig. 5E y F) y algunas muestras con una señal RBD robusta no respondieron a la proteína Spike en absoluto. Como se observó anteriormente (Fig. 2), las señales entre RBD y la proteína Spike a menudo eran comparables, con solo unas pocas muestras que mostraban una respuesta más fuerte contra Spike. Las muestras que proporcionan una señal robusta para RBD a menudo respondieron de manera similar con Spike (Fig. 5G). Para garantizar que los OD entre placas sean comparables, la variación entre placas de los ensayos se determinó utilizando dos diluciones de una muestra de suero de control de calidad o anticuerpo monoclonal (QC)<sub>hola</sub> y control de calidad<sub>lo</sub> correr en cada plato. Aunque la variabilidad de la placa día a día está

presente, esta es de amplitud muy modesta (Fig. 5H). El promedio y la SD del control de calidad<sub>hola</sub> Los valores de OD para las primeras 12 placas realizadas se calcularon y se tuvieron en cuenta para validar las siguientes placas de diagnóstico. Lo mismo se hizo para el control de calidad<sub>lo</sub> valores.

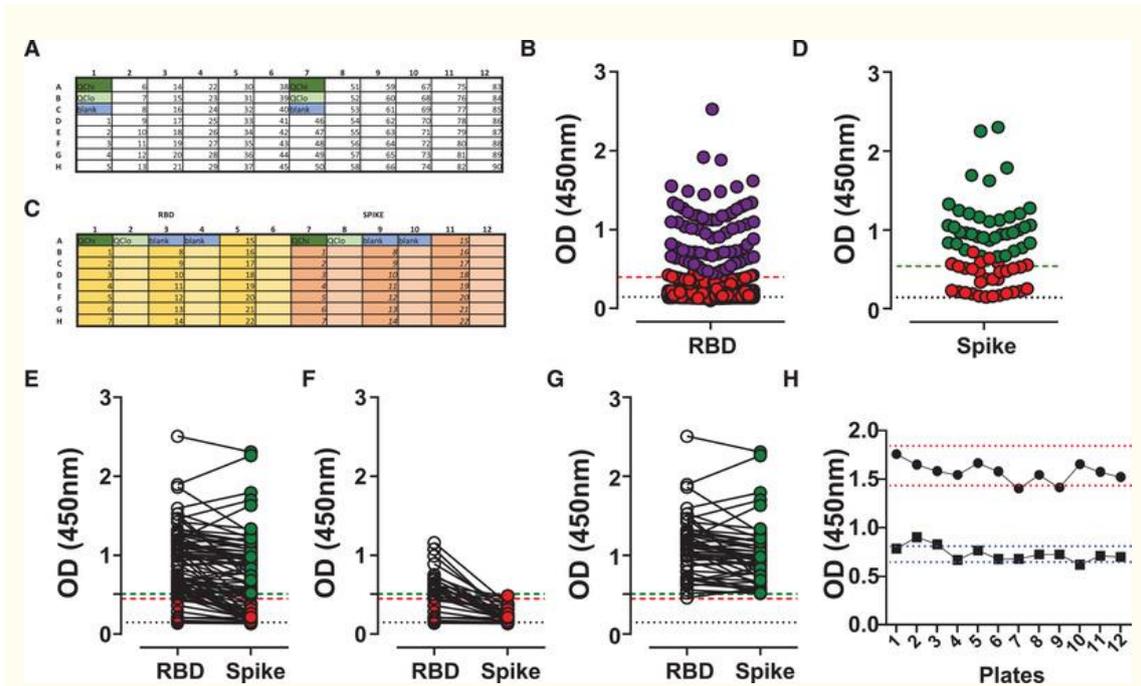


Figura 5

Pruebas de seroconversión a gran escala del personal de la Universidad de Lisboa. Detección de anticuerpos IgG del SARS-CoV-2 en muestras de suero diluido de 1/50 del personal de la Universidad de Lisboa utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos para ELISA. La absorbancia se evaluó a 450 nm. (A) Lista de placas de cribado, recubiertas con 2 µg/ml RBD, con capacidad para 90 muestras/placa, e incluye dos espacios en blanco, dos controles de calidad a alta concentración (QC<sub>hola</sub>), y dos a baja concentración (QC<sub>lo</sub>). B) Resumen del personal evaluado de la Universidad de Lisboa ( $n = 2571$  donantes). Los símbolos rojos indican puntuaciones negativas, los símbolos púrpuras indican OD por encima del límite. (C) Programa de placas de recribado, recubiertas con 2 µg/ml RBD (izquierda) o Spike (derecha), con capacidad para 21 muestras/placa, e incluye dos diluciones por muestra (1/50 y 1/150), dos espacios en blanco, dos QC<sub>hola</sub> y dos QC<sub>lo</sub> por proteína utilizada. (D) Resultados de cribado del re-cribado ( $n = 68$  donantes), mostrando muestras probadas en proteína Spike. El verde representa las muestras por encima del corte para RBD y Spike en dilución de 1/50 y 1/150 ( $n = 38$ ); El rojo indica las muestras por debajo del corte en la segunda pantalla para RBD o Spike ( $n = 30$ ). (E–G) Mostrando señales de proteína RBD y Spike para las muestras reevaluadas y 10 muestras negativas adicionales, (E) todas las muestras, (F) muestras evaluadas negativas (abiertas a símbolos rojos) y 10 adicionales que originalmente eran negativas (símbolos rojos a rojos), (G) muestras evaluadas como positivas (símbolos abiertos a verdes). (H) Señales de control de calidad para 12 placas secuenciales, que muestran el control de calidad<sub>hola</sub> (círculos) y control de calidad<sub>lo</sub> (cuadrados). Las líneas punteadas indican la señal promedio  $\pm$  SD para el control de calidad<sub>hola</sub> (rojo, 200ng/ml) y QC<sub>lo</sub> (azul (10 ng/ml)) de anti-SARS-CoV-2 humano. Los datos muestran valores de muestra individuales.

## Los títulos de anticuerpos siguen un patrón de respuesta inmune clásico

Para determinar las respuestas de anticuerpos con precisión, realizamos valoraciones séricas utilizando la proteína RBD para evaluar las respuestas anti-SARS-CoV-2 IgM, IgG e IgA. De acuerdo con los resultados anteriores, no todos los sujetos evaluados temprano (antes del día 7) después del inicio de COVID-19 o aquellos asintomáticos muestran seroconversión, pero los anticuerpos anti-RBD aumentan rápidamente durante los primeros días de la infección. Este es el caso de los tres isotipos evaluados. Al igual que con muchas respuestas de anticuerpos reportadas, incluido el SARS [15], la respuesta anti-SARS-CoV-2 sigue un patrón clásico con altas respuestas de anticuerpos al comienzo de la respuesta inmune (Información de apoyo Fig. S3A–C).

Además de las respuestas tempranas de los trabajadores de la salud y los pacientes hospitalizados, analizamos a 209 posibles donantes de plasma para la terapia de plasma convaleciente a través del Instituto Portugués de Sangre y Trasplantes (IPST). Los voluntarios eran predominantemente hombres (67%) y en promedio de 38 años de edad. Se informó que todos fueron positivos para PCR al SARS-CoV-2, en promedio 107 días antes de la recolección de la muestra sérica (Tabla 5). Los síntomas de COVID-19 variaron de asintomáticos a leves y moderados. En el momento de la recolección, 184/209 (88%) de los posibles donantes de plasma tenían anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 RBD fácilmente detectables. En línea con una respuesta inmune característica, los títulos de anticuerpos evaluados en voluntarios se redujeron en comparación con los títulos encontrados durante la respuesta inmune temprana en pacientes con COVID19 y trabajadores de la salud, especialmente IgM e IgA (Información de apoyo Fig. S3D–F).

### Cuadro 5

Datos demográficos de los posibles participantes en donantes de plasma y títulos de IgG determinados

#### Posibles donantes de plasma

Edad (años)	37.91	(18-58)
Hombres (%)	67%	139
Mujeres (%)	33%	70

## Posibles donantes de plasma

**Fecha de recogida de la muestra** 8/6/2020 - 30/9/2020

**PCR+ DEL SARS-COV2** 100%

**Seroconversión (RBD)** 88% (184/209)

**PCR+ día a la recolección de suero** 107 (47-199)

**PCR- recolección de día a suero** 81 (15-183)

<b>Título IgG</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
-------------------	----------	----------

Sin título	23	11%
------------	----	-----

Bajo (50–300)	31	15%
---------------	----	-----

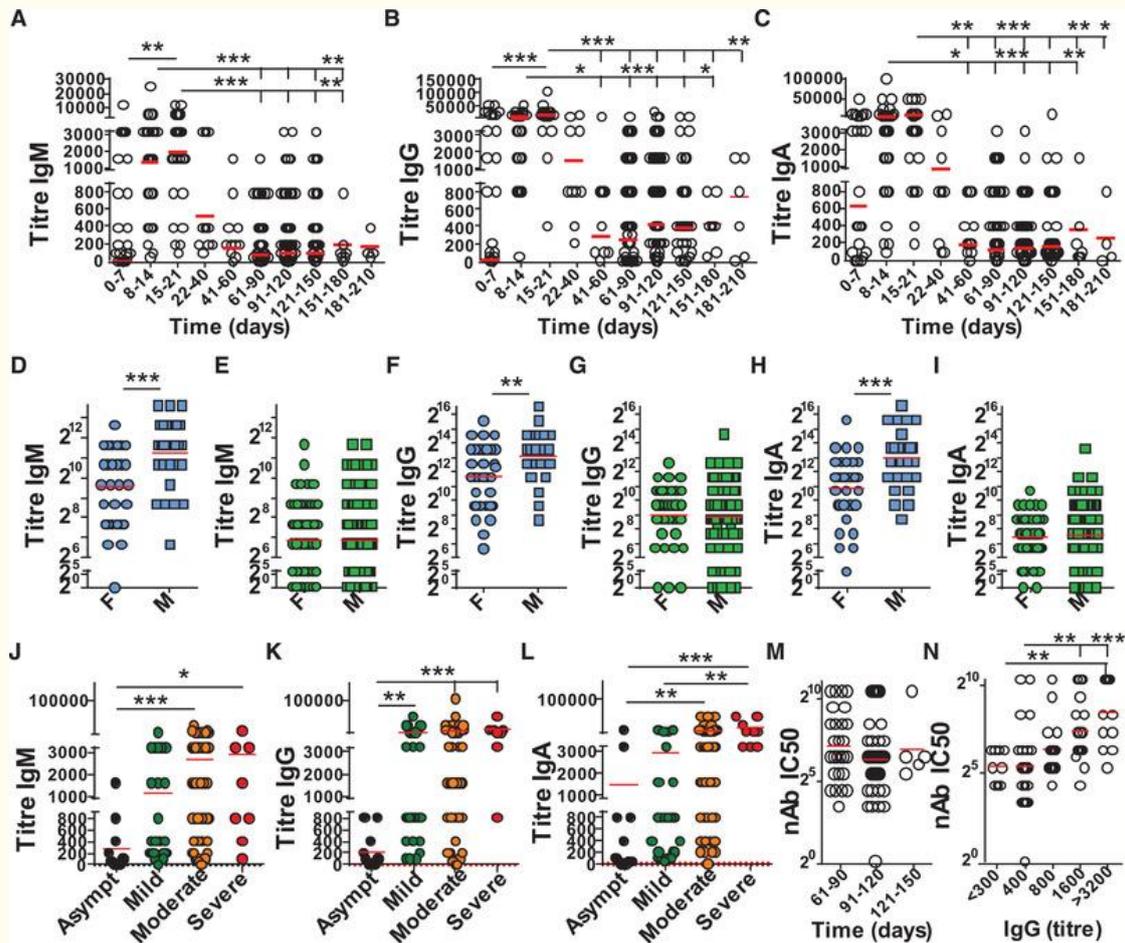
Medio (300–900)	135	65%
-----------------	-----	-----

Alto (>900)	20	10%
-------------	----	-----

[Abrir en una ventana separada](#)

El análisis de las respuestas IgM, IgG total e IgA confirmó una respuesta rápida y casi simultánea de los tres isotipos probados durante las primeras semanas de infección por SARS-CoV-2 (Fig. [6A–C](#)). Las respuestas de anticuerpos alcanzaron

su punto máximo alrededor de tres semanas después de los primeros síntomas, después de lo cual se redujeron los niveles de anticuerpos circulantes. IgM, IgG e IgA alcanzaron su punto máximo en los días 15-21 con medias geométricas de título de anticuerpos de 1915, 10695 y 5212, respectivamente. Desde el segundo mes después del inicio de la enfermedad, los niveles de anticuerpos IgG e IgA permanecieron fácilmente detectables en la mayoría de las personas hasta 6 meses después de los primeros síntomas (Fig. 6A–C; Información de apoyo Fig. S3G). Característicamente para la respuesta de anticuerpos, los títulos de IgM fueron bajos ( $\leq 1/200$ ) en 130 de 182 (72%) de los donantes potenciales de plasma IgG positivos (Fig. 6A–C). Las medias geométricas de los títulos de IgM, IgG e IgA en los días 91-120 fueron 96, 533 y 141, respectivamente. Los niveles tempranos de anticuerpos RBD anti-SARS-CoV-2 (día 40) fueron más altos en los hombres, con títulos significativamente más altos para los tres isotipos de anticuerpos, pero en los últimos puntos de tiempo (día 40-150) no se observaron diferencias entre hombres y mujeres (Figura 6D-I). El aumento del nivel de anticuerpos observado en los hombres no se explicó por la gravedad de COVID-19, con el aumento general de anticuerpos observado independientemente de los síntomas de la enfermedad (Información de apoyo Fig. S3H). Además, estratificar a los sujetos dentro de los primeros 40 días después de COVID-19 por la gravedad de los síntomas destacó que el aumento de la gravedad se correlaciona bien con el aumento de los títulos de anticuerpos en las primeras etapas (Fig. 6J–L).



## Figura 6

Títulos longitudinales de anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se evaluaron en 1/50 muestras de suero diluido de donantes en Portugal utilizando placas Immulon 4HBX de 96 pozos para ELISA. La absorbancia se evaluó a 450 nm. (A–C) Títulos de anticuerpos RBD anti-SARS-CoV-2 trazados a lo largo del tiempo para (A) IgM, (B) IgG y (C) IgA ( $n = 356$  donantes totales). La línea roja marca la media geométrica. (D–I) Títulos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para hombres y mujeres durante (D, F y H) temprano, días 7-40 (mujeres  $n = 32$ , hombres  $n = 29$ ) o (E, G y I) respuesta tardía, días 40-150 (mujeres  $n = 60$ , hombres  $n = 114$ ) para (D y E) IgM, (F y G) IgG o (H e I) IgA. La línea roja marca la media. (J–L) Títulos de anticuerpos RBD anti-SARS-CoV-2 trazados por la gravedad de los síntomas de COVID-19 experimentados para (J) IgM, (K) IgG y (L) IgA. La línea roja indica la media (Asintomática  $n = 13$ , Leve  $n = 28$ , moderada  $n = 54$ , grave  $n = 8$ ). (M y N) La actividad neutralizante del SARS-CoV-2 se determinó en sueros ( $n = 84$  donantes totales) y se trazó contra (M) el tiempo transcurrido desde el título de PCR+ o (N) IgG del SARS-CoV-2. Las líneas rojas indican la media geográfica. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *U* de Mann-Whitney (d-i) o la prueba de Kruskal-Wallis utilizando el software Graphpad Prism.  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ . Los datos muestran valores de muestra individuales. \*\*\*\*\*

Dado que los títulos 2 meses después de que covid-19 se redujeron, a continuación determinamos el potencial de los anticuerpos para neutralizar el SARS-CoV-2. Encontramos actividad de neutralización en todos los sueros probados en los que se determinó IgG anti-SARS-CoV-2, a lo largo de 2-5 meses después de la prueba inicial de PCR-COV-2 pcr positivo para el SARS-CoV (Fig. 6M). Se encontró que el nivel de actividad de neutralización del SARS-CoV-2 era proporcional al título de IgG RBD anti-SARS-CoV-2 determinado, pero no a la IgM y solo a una tendencia para la IgA (Fig. 6N; Información de apoyo Fig. S3I–J). En conjunto, los datos destacan que un nivel sostenido de anticuerpos circula en la sangre durante al menos 6 meses después de COVID-19, lo que muestra una actividad neutralizante del SARS-CoV-2 en línea con el nivel de títulos de IgG RBD anti-SARS-CoV-2.

[Vete a:](#)

## **Discusión**

Para muchos patógenos y vacunas, se han establecido títulos de anticuerpos en las últimas décadas, acumulando un conocimiento detallado de las respuestas promedio de anticuerpos. Sin embargo, cada microorganismo es diferente, y el nivel, la actividad de neutralización y la longevidad de las respuestas de anticuerpos pueden ser diferentes entre patógenos, vacunas y entre individuos. Por lo tanto, sigue siendo importante adquirir datos para cada nueva infección, especialmente aquellas que representan una amenaza para la salud humana, como el SARS-CoV-2. Además, los niveles iniciales de anticuerpos después de la vacunación generalmente se correlacionan bien con un riesgo significativamente reducido de (re)infección y patología. Por lo tanto, la recopilación global de datos de muchas ubicaciones geográficas diferentes, cohortes de pacientes y bajo diferentes condiciones locales contribuirá a una comprensión holística de la nueva pandemia.

Explicamos la configuración de un sistema ELISA en detalle, como se describió anteriormente [9], para facilitar la implementación en otros lugares y la comparación con los resultados publicados. Aunque la proteína Spike utilizada en el ensayo no es

la única proteína inmuno-reactiva del SARS-CoV-2, fue seleccionada porque proporciona información correlativa adicional con respecto a los posibles anticuerpos neutralizantes presentes [3, 4, 16]. El ensayo se configuró utilizando muestras con títulos altos, medios y bajos, y se seleccionó un OD de 2.0 para evitar señales de saturación. Aunque las muestras de suero para la configuración del ensayo se determinaron con los ensayos iniciales antes de la optimización completa, esto no afectó su uso posterior.

Demostramos que ni los métodos de inactivación viral utilizados con frecuencia ni la complejidad de RBD, monomérica, dimérica o una mezcla de ambos afectan la determinación de anticuerpos. Aunque la presencia reportada de SARS-CoV-2 es limitada en sangre [17], la inactivación del suero contribuye a reducir el riesgo de manejo de material humano. El uso de toda la fracción RBD de los sistemas de expresión de mamíferos reducirá los costos debido a su rendimiento superior. Los niveles más altos de expresión utilizando la RBD relativamente pequeña, en comparación con la proteína Spike de longitud completa, hacen que el uso de RBD sea más económico. Mostramos que las muestras individuales pueden mostrar diferencias en la señal para RBD o Spike y que se observa cierta reactividad cruzada limitada con ambas proteínas. Sin embargo, no hay desventaja en el uso de RBD en comparación con la proteína Spike de longitud completa, lo que resulta en una alta especificidad y sensibilidad. Se debe tener cuidado al usar muestras de suero de pacientes con niveles aumentados de anticuerpos. Estos se pueden observar en alergias y afecciones autoinmunes, lo que puede aumentar la señal de fondo en comparación con los controles sanos. La mayoría de los sujetos que se encontraron con sars-CoV-2 se seroconvirtieron, aunque algunos mostraron una cinética retrasada. Solo unos pocos pacientes no mostraron una respuesta IgG que no se explicara por el muestreo temprano (<día 7) o una afección subyacente que requiriera el uso de fármacos inmunosupresores. La mayoría de los no respondedores eran asintomáticos, lo que puede apuntar a una respuesta inmune muy modesta al encontrar una carga viral baja, o, dado que las PCR del SARS-CoV-2 también generan falsos positivos, estos participantes pueden no haber sido infectados.

Dentro de la cohorte de pacientes, hubo grupos adicionales de interés. Dado que el SARS-CoV-2 es un virus de ARN de cadena positiva, el uso de medicamentos antirretrovirales no tuvo un efecto importante en las respuestas de anticuerpos contra el virus. No se sabe que el modo de acción de estos fármacos interfiera con los virus de ARN o la producción de anticuerpos. Nuestros datos muestran el manejo exitoso de los once pacientes previamente infectados con VIH, con todos aquellos pacientes mostrando una respuesta robusta de anticuerpos SARS-CoV-2 después de la segunda semana de síntomas de COVID-19, en línea con trabajos anteriores [18, 19]. El uso de fármacos inmunomoduladores tuvo un efecto inhibitorio sobre la seroconversión del SARS-CoV-2. Esto está en línea con el mecanismo de acción de estos fármacos, inhibiendo la activación o producción de linfocitos. Aunque esto inhibirá la eliminación del SARS-CoV-2, el uso de estos fármacos inmunoinhibidores como la dexametasona podría ser beneficioso en casos de respuesta inmune grave contra el SARS-CoV-2, lo que resulta en una tormenta de citoquinas e inmunopatología [20].

Nosotros y otros [4] encontramos títulos de anticuerpos más altos en los hombres en comparación con las mujeres. Esto es sorprendente ya que las mujeres en promedio tienen más células B y producen más anticuerpos [21]. Los títulos de anticuerpos más altos en los hombres, solo observados durante la etapa aguda, se correlacionan bien con los hombres que muestran síntomas más graves y una mayor mortalidad, como se informó [22, 23]. Las respuestas antivirales innatas, como las mediadas a través del receptor tipo toll-7, se potencian en las mujeres [24], lo que puede explicar su mayor resistencia contra el SARS-CoV-2, de manera similar al virus de la gripe [25].

En muchos países que implementan estrategias de mitigación, la prevalencia de la infección se mantuvo modesta en el momento del muestreo, mayo-junio de 2020, con una baja frecuencia de infección [26, 27, 28, 29]. Esto aumenta la contribución proporcional de cualquier falso positivo al resultado. El ensayo ELISA tal como se usa fue aprobado por la FDA como un método de dos pasos (<https://www.fda.gov/media/137029/download>). Mostramos que el uso de una sola proteína para una gran pantalla de población recoge algunos falsos positivos (30/2571; 1,2%). Especialmente cuando la tasa de infección es baja, el método de dos pasos es altamente beneficioso y muy recomendable [27]. Además, la introducción de un paso de dilución adicional garantiza la robustez, lo que resulta en el 1,5% (38/2571) de los miembros del personal que se seroconvirtió. En general, hubo diferencias limitadas entre la reactividad de RBD y Spike, con algunas muestras que respondieron de manera más robusta a Spike, posiblemente reflejando la mayor cantidad de epítomos disponibles en la proteína más grande.

La cuestión de la inmunidad duradera y protectora contra el SARS-CoV-2 es un foco de investigación actual. Mostramos que la respuesta inicial de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 plantea los tres isotipos principales en estrecha colaboración como se informó anteriormente para el SARS, así como para el SARS-CoV-2 [15, 30]. La cinética de la respuesta sigue un patrón bien conocido con niveles de anticuerpos que alcanzan su punto máximo alrededor de 3 semanas después de los síntomas y disminuyen a partir de entonces. Las respuestas tardías se caracterizan por niveles bajos o a veces indetectables de IgM, IgA modesta, pero al menos hasta 199 días después de la reacción positiva a la PCR, principalmente una respuesta IgG robusta. Entre los días 40 y 199, encontramos que el 90% de los sujetos anteriores con SARS-CoV-2-PCR positivo (198/221), los trabajadores de la salud y los posibles donantes de plasma, portadores de anticuerpos, el 75% de los cuales tenían títulos medios a altos (>300). Además, encontramos que en sujetos con IgG anti-SARS-CoV-2 detectable, la actividad de neutralización estaba de acuerdo con el nivel de título de IgG determinado. Esto concuerda con un informe reciente [16]. Esto y la fuerte correlación entre los títulos de RBD IgG y la actividad neutralizante, así como la inmunidad protectora [16, 31], sugiere que la mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 tendrán inmunidad protectora circulante durante muchos meses después de COVID-19. Además, los informes recientes de la capacidad de respuesta de las células T [32, 33, 34, 35] muestran una respuesta robusta de las células T. Dado que la respuesta al SARS-CoV-2 está en línea con las respuestas inmunes bien conocidas y detalladas estudiadas que resultan en la memoria de los linfocitos, es muy probable que la inmunidad protectora del SARS-CoV-2, que reduce la gravedad de la enfermedad, dure al menos unos pocos años.

## **Materiales y métodos**

---

### **Construcciones de proteínas RBD y Spike del SARS-CoV-2**

Las construcciones de proteínas RBD y Spike se obtuvieron del Dr. Florian Krammer, de la Escuela de Medicina Icahn en Mount Sinai, Nueva York, EE. UU.

### **Producción y purificación de proteínas recombinantes de antígenos**

La producción y purificación de proteínas recombinantes se realizó en el Instituto de Biología Experimental e Tecnológica (iBET) Oeiras, Portugal como parte del consorcio Serology4COVID como lo describieron previamente Stadlbauer et al. [12]. Brevemente, el antígeno Spike o RBD que contiene His-tag se produce por transfección transitoria de células Expi293F™ (Thermo Fisher Scientific) con plásmidos adecuados para la expresión celular de mamíferos (pCAGGS), que albergan el gen Spike o el gen RBD, respectivamente. Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C. A los 3 días después de la transfección, los cultivos se centrifugan y los sobrenadantes se recogen y filtran a través de Sartopore MidiCaps. Los sobrenadantes clarificados se concentran y dializan con tampón de unión por filtración de flujo tangencial, utilizando membranas de 10 kDa o 30 kDa, para la purificación RBD o Spike, respectivamente. La muestra final dializada y concentrada se filtra a través de una membrana de 0,22 µm y se carga en columnas HisTrap HP, equilibradas con tampón de unión. Las proteínas se eluyen con un gradiente lineal de hasta 500 mM de imidazol. Las fracciones que contienen Spike o RBD se concentran a 1-2 mg/ml utilizando dispositivos de flujo cruzado Vivaflow 200. La eliminación de imidazol y el intercambio a tampón de PBS se realiza mediante diafiltración con 10 volúmenes de PBS. La concentración de proteínas está determinada por A280nm combinado con el coeficiente de extinción específico. Los productos concentrados y formulados se filtran a través de una membrana de 0,22 µm, se aliquotan, se congelan a presión en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C.

### **Recogida de muestras humanas**

Tras el consentimiento informado, se tomó sangre por punción venosa y se recolectaron dos tubos de sangre BD Vacutainer CPT y un tubo sérico por paciente. Para la recolección de suero, los tubos se centrifugaron a 2200 rpm, 10 min a 4°C, y 6 × superiores 0,25 ml de suero colocado en seis criotubos. Las muestras se almacenan en una temperatura controlada -80°C ultra bajo congelador en el Biobanco IMM hasta su análisis.

Se obtuvieron muestras de suero de la colección COVID-19 del biobanco IMM y sueros de control prepúdmica de dos colecciones de alergias. Los pacientes fueron reclutados de la unidad COVID-19 y del Servicio de Inmunoalergología del Hospital de Santa María, Centro Hospitalario Lisboa Norte. La colección COVID-19 y el uso científico fueron aprobados por el Comité de Ética del Centro Médico Académico de Lisboa (Ref. nº 155/20), al igual que el cribado del personal (Ref. nº 181/20). Los estudios de alergia fueron aprobados con la referencia 116/13. Los posibles donantes

de plasma se registraron voluntariamente a través del sitio web del IPST. Los criterios para el registro fueron un diagnóstico de COVID-19 documentado por una prueba PCR positiva para SARS-CoV2 seguida de dos pruebas PCR negativas o una negativa 14 o 28 días antes de la recolección, respectivamente. Se realizaron entrevistas médicas para asegurar que se cumplían los criterios para la donación de plasma por aféresis y que se había logrado una recuperación completa de COVID-19.

Se obtuvo el consentimiento informado firmado de todos los voluntarios. Todos los datos fueron tratados de forma confidencial y anónima, según (UE) 2016/679 de 27 de abril de 2016 (Reglamento General de Protección de Datos). Un profesional obligado a la confidencialidad con garantía de las medidas adecuadas de seguridad de la información llevó a cabo la recogida de datos en los términos del RGPD párrafo 2, artículo 29 Ley nº 58/2019, de 8 de agosto.

### **Inactivación de virus**

Para reducir el riesgo de cualquier virus residual potencial en el suero, se probaron tres métodos diferentes de inactivación del virus: incubación durante 1 h a 56 ° C (inactivación por calor), la adición de Triton X-100 al 0,1% (un surfactante no iónico) o la combinación de ambos (H + Tx).

### **Mediciones de anticuerpos**

Los ELISA anti-SARS-CoV-2 se realizaron como se describió anteriormente [12]. Brevemente, placas planas de fondo de 96 pozos (Immulon 4 HBX; Thermo Scientific) se recubrieron con la proteína recombinante RBD o Spike preparada en PBS a una concentración de 2 µg/ml (50 µl/pozo) durante la noche a 4°C. Las placas recubiertas se lavaron con PBS-0.05% Tween (PBS-T) utilizando un Well-wash 1x8 (Thermo Fisher Scientific) o Aquamax200, 3× para la detección de IgG y 10× para el análisis de IgM. Las placas se bloquearon con 200 µl/pozo de leche en polvo sin grasa al 3% en PBS-1%T durante 1 h a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBS-T 3× o 10×, como se describió anteriormente. Las muestras de suero se diluyeron en PBS-0.1% T + 1% leche en polvo sin grasa, se agregaron (100 µl / pozo) y se incubaron durante 1-2 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T 3× o 10×. A continuación, se detectaron varios isotipos de anticuerpos, a saber, IgG total, IgM e IgA anti-SARS-CoV2 utilizando IgG+IgM+IgA (Abcam, ab102420), IgG Fc (Abcam, ab97225), cadena IgM mu (Abcam, ab97205), cadena IgM mu (Abcam, ab97205), cadena alfa IgA (Abcam, ab97215), respectivamente. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en PBS-0,1%T + 1% leche en polvo sin grasa (50 µl/pozo) y se añadieron durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T 3× o 10× y se desarrollaron con solución de sustrato TMB (TMB Substrate Reagent Set, BD OptEIA™, 555214), 100 µl/pozo durante 10 min. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M (50 µl/pozo) y OD a 450nm se midió a través del lector de placas Infinite M200 (TECAN). Cada placa contenía una muestra de control de calidad (QC), compuesta por un grupo de muestras positivas o anticuerpos monoclonales, probados en una dilución alta y baja. Para obtener más información sobre el material, consulte Suplemento de métodos.

## Ensayos de neutralización

Anti-SARS-CoV-2 ELISAs were performed as described in detail recently [36]. SARS-CoV-2 pseudo particles (pp) were kindly provided by Dr Benhur Lee, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA. Briefly, 24 h prior to infection, Vero CCL81 cells grown in DMEM supplemented with 10% FBS were seeded at 20 000 per well in a 96-well plate. SARS-CoV-2pp and serial dilutions of sera (1/10 in DMEM with 10% FBS, and further twofold dilutions) were incubated at room temperature for 30 min. Media from Vero cells was substituted with the SARS-CoV-2pp/serum mix; plates were spinoculated by centrifugation at 1250 rpm for 1 h at 37°C. After overnight incubation at 37°C, culture medium was removed, and Renilla luciferase production was assessed on Tecan 2 plate reader using the Dual-luciferase Reporter Assay system (Promega), according to manufacturer instructions. IC50 were determined as the last serum dilution at which the titration curve matches inhibition equal or above 50% of the 100% assay.

## Statistical analyses

A Kruskal–Wallis test (non-parametric test) was done to compare the geometric ratios between groups with a significance level of 0.05 (Dunn's multiple comparisons test), Student's *t*-test or two-way ANOVA were used as stated in the figure legends, calculated using GraphPad Prism 6.0 software.

[Go to:](#)

## Author contributions

---

P.F.-C. and B.B. setup the ELISA, tested it and run many samples. C.M. and P.G. provided blood samples from COVID19 patients, A.G. and M.S. run all antibody titrations, S.A., C.C. and J.P.S. setup and ran the neutralisation assays, H.N.-C. and A.M. generated sera from COVID19 patients, M.C.P.-S. provided allergy sera, F.R. and Â.A. catalogued all samples and generated sera, J.C., M.A.E., M.S. and E.V. coordinated potential plasma donor blood sample collections, M.R. and J.M.-C. coordinated staff blood collection, M.V. coordinated the work, secured funding and wrote the manuscript.

[Go to:](#)

## Conflict of interest

---

The authors have no commercial or financial conflict of interest.

## Abbreviations

COVID-19

Enfermedad por Coronavirus 2019

ELISA

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Ig

Inmunoglobulina

OD

Densidad  
óptica  
PCR  
Reacción en cadena de la polimerasa  
QC  
Control de  
calidad  
RBD  
Dominio de  
unión al receptor  
ROC  
Receptor característica  
operativa  
SARS-CoV-2  
Síndrome respiratorio agudo  
severo coronavirus 2  
S proteína  
Spike  
protein

[Vete a:](#)

## Información de apoyo

Información de apoyo

[Haga clic aquí para obtener un archivo de datos adicional.](#) (1.6M, pdf)

[Vete a:](#)

## Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a todos los voluntarios que ayudaron con las colectas de sangre (AR Pires, A Ramalho-dos-Santos, A Biscaia-Santos, F Ribeiro, S Caetano, P Napoleão, MJ Silva, P Alves, R Pedroso, P Corredeira, A Friães, M De Niz, I Bento, S Pereira, S Mensurado) y a los donantes y pacientes por proporcionar muestras de sangre y cooperación para hacer posible este estudio. Se solicitaron muestras de suero a Biobanco-IMM, Centro Médico Académico de Lisboa, Lisboa, Portugal. Nos gustaría reconocer la financiación del proyecto ERA H2020 de la Unión Europea (No 667824 – EXCELLtoINNOV) y la Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) a P.F-C. (SFRH/BD/131605/2017), PTDC/MED-IMU/28003/2017, e research4COVID19 (no. 231\_596873172, Ensayo de seroconversión de generación de SARS-CoV2 y n° 729, Evaluación de anticuerpos neutralizantes de SARS-CoV2 de alto rendimiento), con el apoyo adicional de la Sociedade Francisco Manuel dos Santos.

Nos gustaría reconocer el generoso intercambio de las construcciones de expresión por parte de los Doctores Florian Krammer y Benhur Lee, de la Escuela de Medicina Icahn en Mount Sinai, Nueva York, EE. UU. (El desarrollo de los reactivos del SARS-CoV-2 fue parcialmente apoyado por el contrato HHSN272201400008C de los Centros de Excelencia para la Investigación y Vigilancia de la Influenza (CEIRS) del NIAID), y la producción de proteínas por parte de la Dra. Paula Alves,

Pedro Cruz, y Rute Castro en el Instituto de Biología Experimental e Tecnológica (iBET) Oeiras, Portugal como parte del consorcio Serology4COVID.

[Vete a:](#)

## Notas

---

El historial de revisión por pares de este artículo está disponible en <https://publons.com/publon/10.1002/eji.202048970>

[Corrección añadida el 10 de diciembre de 2020 después de la primera publicación en línea: se ha cambiado un período de 5 meses a un período de 6 meses]

[Vete a:](#)

## Declaración de disponibilidad de datos

---

Todos los datos estarán disponibles a petición razonable.

[Vete a:](#)

## Referencias

---

1. Buchholz, U. J. , Bukreyev, A. , Yang, L. , Lamirande, E. W. , Murphy, B. R. , Subbarao, K. y Collins, P. L. . Contribuciones de las proteínas estructurales del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo a la inmunidad protectora. *PNAS* 2004. 101: 9804–9809. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
2. Deming, D. , Sheahan, T. , Heise, M. , Yount, B. , Davis, N. , Sims, A. , Suthar, M. et al., Eficacia de la vacuna en ratones senescentes desafiados con variantes epidémicas y de pico zoonótico recombinantes portadores de SARS-CoV. *PLoS Med.* 2006. 3: e525. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
3. Suthar, M. S. , Zimmerman, M. , Kauffman, R. , Mantus, G. , Linderman, S. , Vanderheiden, A. , Nyhoff, L. et al., Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv* 2020. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
4. Robbiani, D. F. , Gaebler, C. , Muecksch, F. , Lorenzi, J.C.C. , Wang, Z. , Cho, A. , Agudelo, M. et al., Respuestas convergentes de anticuerpos al SARS-CoV-2 en individuos convalecientes. *Naturaleza* 2020. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
5. Bosch, B. J. , van der Zee, R. , de Haan, C. A. y Rottier, P. J. . La proteína espiga del coronavirus es una proteína de fusión de virus de clase I: caracterización estructural y funcional del complejo del núcleo de fusión. *J. Virol.* 2003. 77: 8801–8811. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
6. Hoffmann, M. , Kleine-Weber, H. , Schroeder, S. , Kruger, N. , Herrler, T. , Erichsen, S. , Schiergens, T. S. et al., La entrada de células del SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de la proteasa clínicamente probado. *Celda* 2020. 181: 271–280 e278. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]

7. Wang, Q. , Zhang, Y. , Wu, L. , Niu, S. , Song, C. , Zhang, Z. , Lu, G. et al., Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Celda* 2020. 181: 894–904 e899. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
8. Walls, A.C. , Park, Y. J. , Tortorici, M. A. , Wall, A. , McGuire, A. T. y Veesler, D. . Estructura, función y antigenicidad de la glicoproteína espiga del SARS-CoV-2. *Celda* 2020. 181: 281–292 e286. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
9. Amanat, F. , Stadlbauer, D. , Strohmeier, S. , Nguyen, T. H. O. , Chromikova, V. , McMahon, M. , Jiang, K. et al., Un ensayo serológico para detectar la seroconversión del SARS-CoV-2 en humanos. *Nat. Med.* 2020. 26: 1033–1036. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
10. Okba, N.M. A. , Muller, M. A. , Li, W. , Wang, C. , GeurtsvanKessel, C. H. , Corman, V.M. , Lamers, M.M. et al., Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerger. Infecta. Dis.* 2020. 26: 1478–1488. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
11. GeurtsvanKessel, C. H. , Okba, N.M. A. , Igloi, Z. , Bogers, S. , Embregts, C. W. E. , Laksono, B.M. , Leijten, L. et al., Una evaluación de los ensayos serológicos COVID-19 informa futuros diagnósticos y evaluación de la exposición. *Nat. Commun.* 2020. 11: 3436. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
12. Stadlbauer, D. , Amanat, F. , Chromikova, V. , Jiang, K. , Strohmeier, S. , Arunkumar, G. A. , Tan, J. et al., SARS-CoV-2 Seroconversión en humanos: un protocolo detallado para un ensayo serológico, producción de antígenos y configuración de prueba. *Curr Protoc Microbiol* 2020. 57: e100. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
13. Remy, M.M. , Alfter, M. , Chiem, M. N. , Barbani, M. T. , Engler, O.B. y Suter-Riniker, F. . Inactivación eficaz del virus químico del suero del paciente compatible con el serodiagnóso preciso de las infecciones. *Clin. Microbiol. Infectar.* 2019. 25: 907 e907-907 e912. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
14. Scott-Taylor, T. H. , Axinia, S. C. , Amin, S. and Pettengell, R. . Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy. *Immun Inflamm Dis* 2018. 6: 13–33. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Hsueh, P. R. , Huang, L. M. , Chen, P. J. , Kao, C. L. and Yang, P. C. . Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. 10: 1062–1066. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Wajnberg, A. , Amanat, F. , Firpo, A. , Altman, D. , Bailey, M. , Mansour, M. , McMahon, M. et al., la infección por SARS-CoV-2 induce respuestas de anticuerpos robustas y neutralizantes que son sTable durante al menos tres meses. *medRxiv* 2020. 2020.2007.2014.20151126. [[GoogleScholar](#)]

17. Wang, W. , Xu, Y. , Gao, R. , Lu, R. , Han, K. , Wu, G. y Tan, W. . Detección de SARS-CoV-2 en diferentes tipos de muestras clínicas. *JAMA* 2020. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
18. Blanco, J. L. , Ambrosioni, J. , García, F. , Martínez, E. , Soriano, A. , Mallolas, J. y Miro, J.M. , Investigadores C-iH: COVID-19 en pacientes con VIH: serie de casos clínicos. *Lancet VIH* 2020. 7: e314-e316. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
19. Cooper, T. J. , Woodward, B. L. , Alom, S. y Harky, A. . Resultados de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en pacientes con VIH/SIDA: una revisión sistemática. *Vih Med.* 2020. [[PmC free article](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
20. Group, R.C. , Horby, P. , Lim, W. S. , Emberson, J. R. , Mafham, M. , Bell, J. L. , Linsell, L. et al., Dexametasona en pacientes hospitalizados con Covid-19 - Informe preliminar. *N. Engl. J. Med.* 2020. [[PmC free article](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
21. Klein, S. L. y Flanagan, K. L. . Diferencias de sexo en las respuestas inmunes. *Nat. Rev. Immunol.* 2016. 16: 626–638. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Jin, J.M. , Bai, P. , He, W. , Wu, F. , Liu, X. F. , Han, D.M. , Liu, S. y Yang, J. K. . Diferencias de género en pacientes con COVID-19: enfoque en la gravedad y la mortalidad. *Frente salud pública* 2020. 8:152. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
23. Wenham, C. , Smith, J. y Morgan, R. , Género, Grupo C-W . COVID-19: los impactos de género del brote. *Lancet* 2020. 395: 846–848. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
24. Laffont, S. , Rouquie, N. , Azar, P. , Seillet, C. , Plumas, J. , Aspord, C. y Guery, J.C. . El complemento del cromosoma X y la señalización del receptor de estrógeno contribuyen de forma independiente a la producción mejorada de IFN-alfa mediada por TLR7 de células dendríticas plasmocitoides de mujeres. *J. Immunol.* 2014. 193: 5444–5452. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Klein, S. L. , Hodgson, A. y Robinson, D. P. . Mecanismos de disparidades sexuales en la patogénesis gripal. *J. Leukoc. Biol.* 2012. 92: 67–73. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
26. Gudbjartsson, D. F. , Helgason, A. , Jonsson, H. , Magnusson, O. T. , Melsted, P. , Norddahl, G. L. , Saemundsdottir, J. et al., Propagación del SARS-CoV-2 en la población islandesa. *N. Engl. J. Med.* 2020. 382: 2302–2315. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
27. Behrens, G.M. , Cossmann, A. , Stankov, M. V. , Schulte, B. , Streeck, H. , Foerster, R. , Bosnjak, B. et al., Strategic anti-SARS-CoV-2 serology testing in a low prevalence pandemic: The COVID-19 Contact (CoCo) Study in health care professionals. *medRxiv* 2020. 2020.2008.2006.20169250. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]
28. Pollan, M. , Perez-Gomez, B. , Pastor-Barriuso, R. , Oteo, J. , Hernan, M. A. , Perez-Olmeda, M. , Sanmartin, J. L. et al., Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain

(ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* 2020. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]

29. Stringhini, S. , Wisniak, A. , Piumatti, G. , Azman, A. S. , Lauer, S. A. , Baysson, H. , De Ridder, D. et al., Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en Ginebra, Suiza (SEROCoV-POP): un estudio poblacional. *Lancet* 2020. 396: 313–319. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]

30. Long, Q. X. , Liu, B. Z. , Deng, H. J. , Wu, G.C. , Deng, K. , Chen, Y. K. , Liao, P. et al., Respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19. *Nat. Med.* 2020. 26: 845–848. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

31. Addetia, A. , Crawford, K. H. , Dingens, A. , Zhu, H. , Roychoudhury, P. , Huang, M. , Jerome, K. R. et al., Anticuerpos neutralizantes se correlacionan con la protección contra el SARS-CoV-2 en humanos durante un brote de buque pesquero con alta tasa de ataque. *medRxiv* 2020. 2020.2008.2013.20173161. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]

32. Grifoni, A. , Weiskopf, D. , Ramirez, S. I. , Mateus, J. , Dan, J.M. , Moderbacher, C. R. , Rawlings, S. A. et al., Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Celda* 2020. 181: 1489–1501 e1415. [ Artículo gratuito de [PMC](#)] [[PubMed](#)] [ [GoogleScholar](#)]

33. Braun, J. , Loyal, L. , Frensch, M. , Wendisch, D. , Georg, P. , Kurth, F. , Hippenstiel, S. et al., Presencia de células T reactivas al SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 y donantes sanos. *medRxiv* 2020. 2020.2004.2017.20061440. [ [GoogleScholar](#)]

34. Gangaev, A. , Ketelaars, S. L.C. , Patiwaal, S. , Dopler, A. , Isaeva, O. I. , Hoefakker, K. , De Biasi, S. et al., Respuestas profundas de células T CD8 hacia el SARS-CoV-2 ORF1ab en pacientes con COVID-19. *Researchsquare* 2020. [[Google Scholar](#)]

35. Le Bert, N. , Tan, A. T. , Kunasegaran, K. , Tham, C. Y. L. , Hafezi, M. , Chia, A. , Chng, M. H. Y. et al., Inmunidad específica de células T del SARS-CoV-2 en casos de COVID-19 y SARS, y controles no infectados. *Naturaleza* 2020. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

36. Oguntuyo, K. Y. , Stevens, C. S. , Hung, C. -. T. , Ikegame, S. , Acklin, J. A. , Kowdle, S. S. , Carmichael, J.C. et al., Cuantificando los títulos de neutralización absoluta contra el SARS-CoV-2 mediante un ensayo estandarizado de neutralización del virus permite comparaciones entre cohortes de sueros de COVID-19. *medRxiv* 2020. 2020, 2008.2013.20157222. [[Google Scholar](#)]