



## ARTÍCULO ORIGINAL

# Estudio de inmunidad específica celular y humoral de memoria en pacientes recuperados de COVID-19 sin vacunar

*Study of the specific cellular and humoral memory immunity in unvaccinated patients recovered from COVID-19*

Libera, Natalia <sup>1</sup>; Lerman, Andrea Susana <sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Virología, Departamento Laboratorio, Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán". Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Lerman, Andrea Susana. Servicio de Virología, Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", ANLIS-Malbrán. Ituzaingó 3520 (C.P. 7600), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina; alerman@anlis.gob.ar; lermanandreas@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** A más de tres años del inicio de la pandemia por el nuevo coronavirus, las tasas de mortalidad e internación disminuyeron gracias a la vacunación; sin embargo, nuevas variantes más transmisibles y resistentes a la inmunidad previa podrían ser responsables de nuevos contagios y reinfecciones. **Objetivo:** Investigar la presencia de inmunidad específica celular y humoral de memoria en personas recuperadas de COVID-19 y sin vacunar al momento del estudio. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal entre julio y agosto del 2021 en 27 voluntarios recuperados de COVID-19 sin vacunar. La inmunidad celular se estudió por citometría de flujo mediante la presencia de marcadores de memoria y activación inmunológica en linfocitos TCD4, TCD8 y linfocitos B; luego, se compararon la respuesta basal y la estimulada con SARS-CoV-2 inactivado (Test de Wilcoxon para muestras pareadas, programa *R - Studio*). Se dosaron anticuerpos IgG anti - proteína *spike*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación institucional. **Resultados:** La respuesta celular de memoria en linfocitos CD4, CD8 y CD19 fue significativamente mayor en estado estimulado con SARS-CoV-2 que en estado basal ( $p < 0,05$ ). El 74,07% de los voluntarios (20/27) tuvo una IgG reactiva para SARS-CoV-2. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 hasta el estudio inmunológico fue de 6 a 13 meses. **Conclusiones:** Se detecta inmunidad específica de memoria celular y humoral anti - SARS-CoV-2 luego de aproximadamente un año de la infección natural en individuos no vacunados. Estos resultados nos permiten comprender mejor la respuesta inmune natural anti - SARS-CoV-2 y contribuyen a la planificación de nuevas estrategias de inmunización.

**Palabras clave:** COVID-19, inmunidad celular, inmunidad humoral, memoria inmunológica, inmunización.

## Abstract

**Background:** More than three years after the beginning of the COVID-19 pandemic, mortality and hospitalization rates decreased thanks to vaccination; however, new variants, more transmissible and resistant to previous immunity, could be responsible for new and re-infections. **Objective:** To investigate the presence of specific cellular and humoral-mediated memory immunity in people recovered from COVID-19 who were not vaccinated at the time of this study. **Materials and methods:** A descriptive cross-sectional study was carried out between July and August 2021 in 27 unvaccinated volunteers recovered from COVID-19. Cellular immunity was studied by flow cytometry through the presence of memory and immunological activation markers on TCD4, TCD8 and B lymphocytes, and then comparing basal and stimulated response with inactivated SARS-CoV-2 (Wilcoxon test for paired samples, R study program). Anti-Spike protein IgG antibodies were measured. The study was approved by the institutional Ethics Committee. **Results:** The memory cell response on CD4, CD8 and CD19 lymphocytes was significantly higher in the SARS-CoV-2 stimulated state than in the basal state ( $p < 0.05$ ). The 74.07% of volunteers (20/27) were IgG reactive anti-SARS-CoV-2. The time between the diagnosis of COVID-19 and this immunological study was 6 to 13 months. **Conclusions:** Unvaccinated individuals showed specific cellular and humoral memory immunity against SARS-CoV-2 approximately one year after natural infection. These results allow us to better understand the anti-SARS-CoV-2 immune response and can contribute to the planning of new immunization strategies.

**Keywords:** COVID-19, cellular immunity, humoral immunity, immunological memory, immunization.

## Introducción

El nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés, o síndrome respiratorio agudo y grave por coronavirus 2 emergió a fines de diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, y rápidamente se expandió por todo el mundo.<sup>1</sup> El 11 de marzo del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia.<sup>2</sup> El período de incubación de hasta 14 días, el alto porcentaje de contagiados sintomáticos leves o asintomáticos, sobre todo en población pediátrica<sup>3</sup>, y la ausencia de inmunidad previa anti - SARS-CoV-2<sup>4,5</sup> contribuyeron a la expansión del virus y dificultaron el control de la pandemia.

En nuestro país, desde el inicio de la pandemia hasta el 29 de abril del 2023, se notificaron 10.052.810 de casos confirmados de COVID-19 y 130.502 fallecidos.<sup>6</sup> La vacunación anti-COVID-19 se inició el 29 de diciembre de 2020<sup>7</sup>, y los primeros en recibirla fueron los adultos mayores, personas con comorbilidades y personal de salud. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación, hasta mayo del 2023 en Argentina, se aplicaron 115.539.419 dosis.<sup>8</sup> Gracias a la vacunación, la pandemia por COVID-19 pudo controlarse, y disminuyó notoriamente el número de muertes e internaciones por esta causa.

La mayoría de las personas con inmunidad previa, ya sea por reinfección o vacunación, experimentarán una enfermedad respiratoria leve o moderada; esto significa que la inmunidad anti - SARS-CoV-2 no es esterilizante y, por lo tanto, no evitará ni la reinfección ni la transmisión.<sup>9,10</sup> Como consecuencia, se han documentado nuevos picos de contagios sin una clara estacionalidad, y han aparecido nuevas variantes virales asociadas a mayor contagiosidad que escapan principalmente la inmunidad humoral<sup>11,12</sup>, como ocurrió con la variante ómicron, considerada como variante de preocupación (VOC) por la OMS en noviembre del 2021.<sup>13,14</sup>

Debido a la emergencia sanitaria global, diferentes plataformas vacunales se aprobaron en tiempo récord<sup>15</sup> sin comprender completamente la respuesta inmunológica generada por la infección natural.

La respuesta inmune a las vacunas se ha estudiado *in vitro*. Algunos autores analizaron la capacidad de neutralización de anticuerpos (Ac), otros, la funcionalidad celular.<sup>16-19</sup>

También es sabido que la inmunidad ideal sería aquella que genere una respuesta de memoria sistémica y de mucosas<sup>17</sup> no solo contra la proteína *spike*, sino contra otras proteínas virales, para lo cual es fundamental una respuesta equilibrada Th1/Th2. A fin de que esto ocurra, son imprescindibles los linfocitos T (LT).<sup>18, 20-22</sup> Estudios previos con SARS-CoV-1, descubierto en China a finales del año 2002 y de la misma familia que SARS-CoV-2, demostraron que los Ac generados después de la infección fueron protectores, pero de corta vida media<sup>23,24</sup>, mientras que la respuesta de LT perduró por años.<sup>21,24,25</sup>

Durante el transcurso de la pandemia por SARS-CoV-2, otros autores detectaron respuesta de LT anti - SARS-CoV-2 meses después del diagnóstico, incluso en personas sin Ac

detectables y en contactos estrechos asintomáticos.<sup>16,26</sup>

Sabiendo que el título de anticuerpos disminuye fisiológicamente con el tiempo, es necesario comprender qué sucede con la inmunidad adaptativa de memoria celular. El objetivo principal de este trabajo fue investigar la presencia de inmunidad específica celular y humoral de memoria en personas recuperadas de COVID-19 y sin vacunar al momento del estudio.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal entre julio y agosto del 2021.

### Población y muestra

Se seleccionaron 27 voluntarios que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: ser mayor de 18 años de edad; tener un informe de laboratorio con resultado positivo para SARS-CoV-2 por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR), junto con registros clínicos o ficha clínico - epidemiológica de la fecha del diagnóstico; tener el alta médica según criterio del Ministerio de Salud de la Nación; no haber recibido ninguna vacuna contra SARS-CoV-2 al momento de este estudio; no presentar sintomatología compatible con la definición de caso sospechoso de COVID-19.<sup>27</sup> Las 27 personas aceptadas fueron citadas, respetando los protocolos de distanciamiento social y preventivo, para realizar la extracción de sangre; firmaron un consentimiento informado y completaron una encuesta sobre su recuperación y estado de salud actual.

Quedaron excluidas de la preselección personas inmunocomprometidas (por enfermedad oncológica, trasplante de órgano sólido o médula ósea, infección por virus de inmunodeficiencia humana [VIH], drogas inmunosupresoras o modificadores de respuesta biológica), institucionalizadas en centros de cuidados crónicos, hospital de día o hemodiálisis y/o que tuvieran esperanza de vida menor de 6 meses.

Se analizaron datos clínico - epidemiológicos y de laboratorio de los 27 voluntarios.

### Muestras biológicas

Sangre entera periférica heparinizada (heparina sódica Rivero, Riveparin, Uruguay, REG: 33024) para el aislamiento de células mononucleares (CMN) y recuento celular: una gota de sangre entera para la fórmula leucocitaria y suero para serología.

### Purificación de células mononucleares (CMN)

Siguiendo protocolos ya descritos por otros autores<sup>28,29</sup>, en cabina de flujo laminar (LabGard® Gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A2, NuAire™), se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Lymphoprep™, NYCOMED PHARMA AS, Oslo, Norway, No. 10068032) a partir de sangre entera heparinizada, diluida al 50 % con solución fisiológica estéril; luego de centrifugar durante 20 minutos a 1800 revoluciones por minuto (r.p.m), se obtuvo una interfase opaca, rica en CMN. Las CMN

**Tabla I.** Características clínico - epidemiológicas de los voluntarios INE-ANLIS, Mar del Plata; julio - agosto 2021 (N=27).

	Media	Rango	Desvío Estándar
Edad (años)	37	21 - 64	10,85
	Frecuencia	Porcentaje (%)	IC 95%
Sexo			
Femenino	17	62,96	42,37-80,60
Masculino	10	37,04	19,40-57,63
Nivel educativo			
Primario completo	1	3,70	0,09-18,97
Secundario completo	6	22,22	8,62-42,26
Terciario incompleto	6	22,22	8,62-42,26
Terciario completo	3	11,11	2,35-29,16
Universitario incompleto	7	25,93	11,11-46,28
Universitario completo	4	14,81	4,19-33,73
Aislamiento			
Domiciliario	26	96,30	81,03-99,91
Hotel	1	3,70	0,09-18,97
Viaje previo a COVID-19	3	11,11	2,35-29,16
Signos y síntomas al momento del diagnóstico de COVID-19			
Fiebre	16	59,26	38,80-77,61
Dolor de garganta	17	62,96	42,37-80,60
Dolor de cabeza	16	59,26	38,80-77,61
Fatiga	9	33,33	16,52-53,96
Agitación	5	18,52	6,30-38,08
Tos	9	33,33	16,52-53,96
Nauseas/Vómitos	2	7,41	0,91-24,29
Dolores musculares	12	44,44	13,75-50,18
Pérdida del gusto	14	51,85	31,95-71,33
Pérdida del olfato	16	59,26	38,80-77,61
Dificultad respiratoria	6	22,22	8,62-42,26
Diarrea	2	7,41	0,91-24,29
Adenomegalia	1	3,70	0,09-18,97
Temblores	1	3,70	0,09-18,97
Petequias	1	3,70	0,09-18,97
Rinitis	2	7,41	0,91-24,29
Síntomas pos-COVID-19 (n=26)			
Anosmia	2	7,69	0,95-25,13
Fatiga	1	3,85	0,10-19,64
Migraña	1	3,85	0,10-19,64
Trombosis venosa	1	3,85	0,10-19,64
Autopercepción de la recuperación			
Buena	20	74,07	53,72-88,89
Regular	7	25,93	11,11-46,28
Comorbilidades	2	11,11	2,35-29,16
Serología previa al estudio*	12	44,44	25,48-64,67

► \*De las 12 personas que se realizaron serología previa, diez tuvieron resultados positivos. Fuente: datos recopilados con base en la encuesta personal y la ficha clínico – epidemiológica, al momento del diagnóstico de COVID-19.

se lavaron dos veces con solución fisiológica y una vez con Medio Roswell Park Memorial Institute con glutatión y vitaminas [RPMI 1640 [Gibco®, Life Technology Corporation, N°:31800014]], suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1%).

**Ensayos funcionales**

Los cultivos se realizaron durante 5 días con CMN frescas, obtenidas en el día, en placa estéril de 96 pocillos de fondo plano [Orange Scientific: Cat. 5530 100], en estufa gaseada de dióxido de carbono al 5 % [Excella ECO-170]. Se ajustó el número de CMN a 2.000.000/ mL en RPMI suplementado con penicilina/estreptomicina al 1 %. Se sembraron 200.000 CMN por pocillo [volumen final: 200 uL]. La viabilidad celular se confirmó por exclusión de coloración vital con azul de tripán [Biopack Cod. 9662.01].

A cada voluntario, se le realizaron tres tipos de estímulos por triplicado: basal: CMN con RPMI completo; control positivo: CMN con fitohemaglutinina [PHA 20 ug/ mL] como control positivo de activación celular; estímulo específico: CMN con 1000 dosis infectantes de SARS-CoV-2 inactivado con beta-propiolactona. [Laboratorio de Virosis Respiratorias INEI-ANLIS, Malbrán]. Tanto los estímulos como el cultivo basal se prepararon en el día con RPMI completo, suplementado con suero bovino fetal al 20 % [SBF Gibco® by Life Technologies, Ref 16000-036]. Al quinto día, las CMN se cosecharon, se lavaron con solución fisiológica tres veces, se resuspendieron en 100 uL de *buffer* BD FACSFlow™ [ref. 342003] y se marcaron para citometría de flujo [CMF].

**Citometría de Flujo**

Se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales [Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San José, CA 95131 USA] que permitiera identificar subpoblaciones linfocitarias B, TCD4 y TCD8, además de marcadores de activación y memoria, en un único tubo: CD19 con isotiocianato de fluoresceína [CD19-FITC], CD3 con alofocianina [CD3-APC], CD4 con *Peridin chlorophyll protein-Cyanine5.5* [CD4-PerCP-Cy™5.5], CD8 con alofocianina

**Tabla II.** Resultados basales de inmunidad humoral y poblaciones celulares pos-COVID-19. INE-ANLIS, Mar del Plata; julio-agosto 2021. N=27.

Voluntario	Tiempo desde el diagnóstico al estudio inmunológico [meses]	Recuento de leucocitos [n/mm <sup>3</sup> ]	Recuento de CMN inicial [n/mm <sup>3</sup> ]	Viabilidad inicial (%)	Serología	CD3+ Totales (%)	CD4+ Totales (%)	CD8+ Totales (%)	CD19+ Totales (%)
	x=10 DS=1,18 {6-13}	x=6400 DS=1705,18 {4300-11000}	x=2300 DS=1144,16 {850-4900}	x=98 DS= 2,05 {93-100}	Reactivos 74,07% {20/27}	x=32 DS=8,38 {12,7-46,9}	x=77,7 DS=9,99 {58,7-95,4}	x= 21,6 DS=9,69 {4,6-41,3}	x=9,6 DS= 3,73 {4,4-18,9}
1	12	7500	4800	100	R	32,0	86,5	13,5	12,7
2	10	7450	3950	100	R	35,0	85,5	14,5	11,0
3	10	4350	2000	100	R	30,0	63,7	36,3	5,5
4	10	6800	2100	100	R	33,0	83,0	17,0	9,6
5	11	4650	3300	95	R	27,0	69,5	30,5	7,8
6	10	5300	2150	98	R	32,0	85,9	14,1	8,2
7	8	6200	4900	99	R	23,0	71,9	28,1	8,0
8	12	7300	3600	99	R	32,0	89,2	10,8	6,9
9	7	6400	2500	96	R	26,5	77,2	22,8	6,7
10	12	5400	2300	99	R	30,0	72,9	27,1	11,7
11	12	5000	2300	98	R	35,5	78,4	21,6	7,7
12	8	5800	4100	96	R	33,6	77,7	22,3	11,8
13	10	11000	4050	99	R	34,8	59,2	40,8	8,5
14	12	8800	4350	97	R	46,2	76,7	23,3	18,9
15	13	8900	2200	100	NR	20,8	89,9	10,1	12,7
16	11	7900	2300	95	R	29,0	86,4	13,6	12,7
17	11	4300	1250	98	R	22,5	84,3	15,7	14,1
18	11	8900	1450	99	NR	36,0	89,9	20,1	14,0
19	9	5300	850	94	NR	12,7	62,0	38,0	4,4
20	13	10000	1450	93	R	23,0	81,9	18,9	13,4
21	8	6600	3150	98	R	17,0	73,2	18,1	6,6
22	7	6200	1300	99	R	31,6	70,5	29,5	4,8
23	11	6400	3100	100	NR	43,4	95,4	4,6	14,5
24	10	7300	3050	96	NR	39,3	58,7	41,3	16,9
25	9	5700	1200	98	R	40,4	82,1	17,9	8,5
26	11	7300	2300	96	NR	46,9	74,6	25,4	11,5
27	6	5300	3050	100	NR	39,5	67,2	32,8	7,2

► x, mediana; DS, desvío estándar; R, reactivo; NR, no reactivo

na - análogo de cianina7 (CD8-APC-H7), CD25 con ficoeritrina (CD25-PE) y CD45Ro con ficoeritrina-cianina7 (CD45Ro-PE-Cy7). Se adquirieron 10.000 eventos en un CMF de 6 colores [BD FACSCanto™ *Flow Cytometer*].

La estrategia para el análisis por citometría de flujo se describe en “Anexo I”.

**Serología**

Se realizó un enzoinmunoensayo (ELISA COVIDAR IgG®). Siguiendo indicaciones del fabricante, se obtuvo el título de anticuerpos de tipo IgG anti – proteína *spike* de SARS-CoV-2 en muestras de suero.

## Recolección de datos

Se utilizó un cuestionario autoadministrado que incluía datos clínico-epidemiológicos al momento del diagnóstico, corroborados con la ficha de notificación obligatoria de caso sospechoso de COVID-19 del Ministerio de Salud de la Nación. Se incluyeron datos de la recuperación autopercebida, posterior al COVID.

- Variable dependiente: presencia de linfocitos de memoria que responden específicamente a SARS-CoV-2
- Variables independientes. Al momento del diagnóstico viral: edad [años]; género [varón/mujer/trans]; sexo [masculino/femenino/otro]; fecha de inicio de síntomas [día/mes/año]; fecha de toma de muestra [día/mes/año]; muestra biológica [esputo/aspirado endotraqueal/lavado broncoalveolar [BAL]/mini BAL/líquido pleural/hisopado nasal y faríngeo/biopsia de pulmón/otras]; signos y síntomas [dolor de garganta/náuseas/vómitos/pérdida del olfato/agitación/fatiga/dificultad respiratoria/dolor de cabeza/dolores musculares/otros aclarando que cada signo y síntoma se valoraría con sí/no]; tratamiento [sí/no, especificar]; requiere internación [sí/no, n° de días]; complicaciones: insuficiencia respiratoria/ventilación mecánica [VM] - días de VM -; cardiovasculares: infarto agudo de miocardio/arritmias/pericarditis/otras; coagulación vascular diseminada, tormenta de citoquinas, infección secundaria]; requiere ingreso a UTI [sí/no]; enfermedad de base/comorbilidad [sí/no, ¿cuál?]; Ascendencia [padres/abuelos/bisabuelos]; nivel de educación [ninguno/primario: completo/incompleto, secundario: completo/incompleto, terciario: completo/incompleto, universitario: completo/incompleto]; ocupación [especificar]; número de convivientes [especificar]; número de contagios secundarios entre sus convivientes [especificar]; número de ambientes en vivienda [especificar]; viaje previo [sí/no]. Al momento del estudio inmunológico: Se relevaron serología [IgG reactiva/no reactiva]; serología previa [información complementaria que aportaron algunos de los voluntarios acompañándola con su comprobante de diagnóstico molecular de SARS-CoV-2: sí/no]; recuento de leucocitos totales [n°/mm<sup>3</sup>] y fórmula leucocitaria; viabilidad celular [porcentaje [%] de células vivas después de Ficoll-Paque]; % de CMN positivas [+] para los marcadores de membrana estudiados por CMF [% de LB CD19+, % de LT CD4+ y % de LT CD8+, % de células activadas CD25+ y de memoria CD45Ro +] en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.

## Análisis estadístico

Se presentaron estadísticas descriptivas para las variables demográficas y clínicas. Para las variables continuas, se calcularon medias, rango y desvío estándar; para las variables categóricas, frecuencias absolutas, porcentajes y sus intervalos de confianza de 95% [IC95%]. Las asociaciones entre variables se realizaron mediante el test del chi

cuadrado [X<sup>2</sup>] o prueba exacta de Fisher, según correspondiera. La asociación entre las variables y la presencia de respuesta inmune celular se estimó calculando el *odds ratio* [OR]. Se usaron los programas de soporte: *Epi Info 7*, *EpiDat 4.1*. La respuesta inmune celular global se analizó con el test de Wilcoxon para muestras pareadas con el programa R-Studio; esto se hizo para cada una de las subpoblaciones celulares: LB y LT CD4 y CD8.

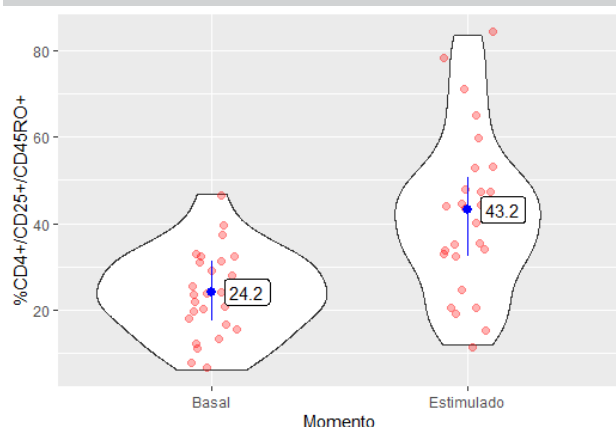
## Ética

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INE, "Juan H. Jara", con sede en la calle Ituzaingo 3520 de Mar del Plata, que cumple con el reglamento de Registro y Acreditación de Comités Institucionales de Ética en Investigación, Registro N° 059/2016, FOLIO 107 DEL Libro de Actas N°2, con fecha 02/09/2016 [Código: LERMAN 02/2020]. Cada participante proporcionó su consentimiento informado por escrito antes de cualquier actividad del estudio. Se mantiene la confidencialidad de los participantes.

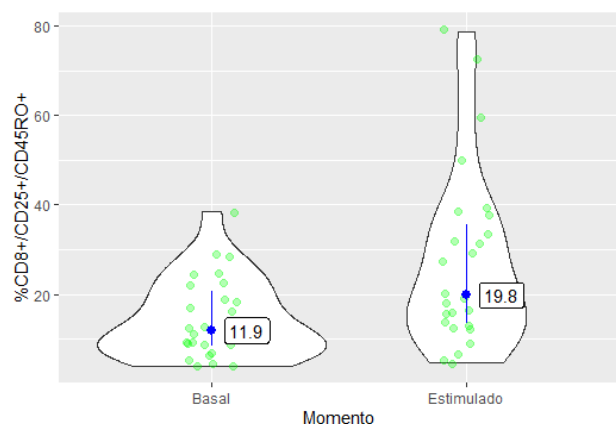
## Resultados

De un registro de más de 20.000 diagnósticos de COVID-19 por RT-qPCR, se preseleccionaron 158 personas, de las cuales solo se estudiaron 27 [17,1 %]. El resto (n=131) no se incluyó por las siguientes causas: no pudo ser ubicado (n=38), había recibido la vacuna (n=83), fue citado y no se presentó al estudio (n=7) o había fallecido (n=3). De los 27 voluntarios, 26 fueron diagnosticados con COVID-19 en 2020: 1 en enero del 2021; 17 [62 %] eran de ascendencia europea, 2, mestizos y 8 no respondieron a esa pregunta. Datos de la encuesta revelaron que 15 de las 27 personas [55,55 %] sabían de quiénes se habían contagiado; el resto lo desconocía. Ocho [29,63 %] afirmaron haber contagiado a algún conviviente, y 4 [14,81 %] contagiaron a su vez a algún contacto estrecho no conviviente. No se halló asociación estadísticamente significativa entre el número de contagios secundarios entre convivientes y el número de ambientes en la vivienda [p > 0,05].

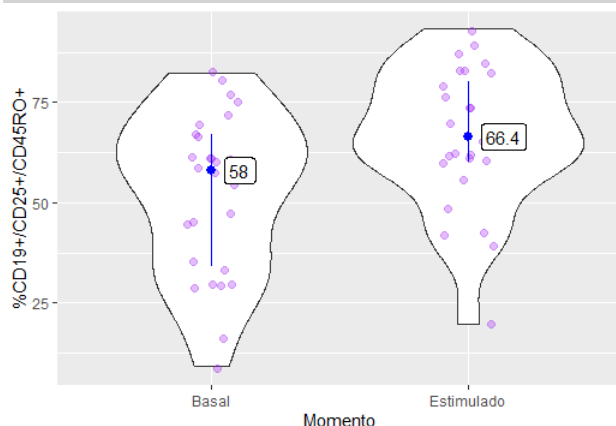
Las características clínico - epidemiológicas de las personas estudiadas se detallan en la Tabla I. Solo dos personas presentaron alguna comorbilidad o factor de riesgo al diagnóstico de COVID-19: una de ellas cursaba embarazo avanzado y diabetes, otro era fumador. Ninguno de los voluntarios requirió internación, pero uno desarrolló una trombosis venosa posterior al COVID-19. Ninguno presentó leucopenia, leucocitosis, linfopenia o linfocitosis al momento del estudio. Los resultados basales del estudio inmunológico humoral y de poblaciones celulares se presentan en la Tabla II. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 hasta la fecha del estudio inmunológico fue, en promedio, 10 meses [6 a 13 meses]. El 74,07 % [20 / 27] resultó IgG anti - SARS-CoV-2 reactivo. No se halló asociación estadísticamente significativa entre la presencia o no de Ac anti - SARS-CoV-2 y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 [p=0,0627]; tampoco, con el porcentaje

**Figura 1.** LT CD4+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.

► Test de Wilcoxon para muestras pareadas.  
Programa R-Studio ( $p=0,00000131$ ).

**Figura 2.** LT CD8+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.

► Test de Wilcoxon para muestras pareadas.  
Programa R-Studio ( $p=0,0000221$ ).

**Figura 3.** LB CD19+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.

► Test de Wilcoxon para muestras pareadas.  
Programa R-Studio ( $p=0,000598$ ).

de CD19 total ( $p=0,4148$ ). Al comparar las CMN en estado basal con las estimuladas específicamente durante 5 días con SARS-CoV-2 inactivado, se observó una respuesta celular de memoria significativa ( $p < 0,05$ ) en las 3 subpoblaciones linfocitarias estudiadas, aunque con mayor dispersión en los LB (Figuras 1, 2 y 3).

## Discusión

Este estudio es uno de los pocos publicados en Argentina que documenta la inmunidad de memoria posterior al COVID-19 *in vitro* mediante ensayos funcionales luego de aproximadamente un año de la primoinfección, en individuos no vacunados.

Existe consenso respecto de que tanto la infección natural como la vacunación generan una respuesta inmune de memoria celular y humoral anti - SARS-CoV-2<sup>30-34</sup>. Esta inmunidad, aunque efectiva para mitigar las manifestaciones clínicas y disminuir las hospitalizaciones, no siempre nos protege contra una reinfección ni evita la transmisión. Otros autores reportaron que personas con esquema completo de vacunación transmiten el virus con cargas virales similares a las de aquellas sin vacunar<sup>35</sup>, que la inmunidad generada por vacunas como Pfizer-BioNTech disminuye más rápidamente que en convalecientes<sup>36</sup> y que la eficacia de las vacunas decrece más rápidamente en adultos mayores y adultos con comorbilidades que en inmunocompetentes.<sup>37</sup>

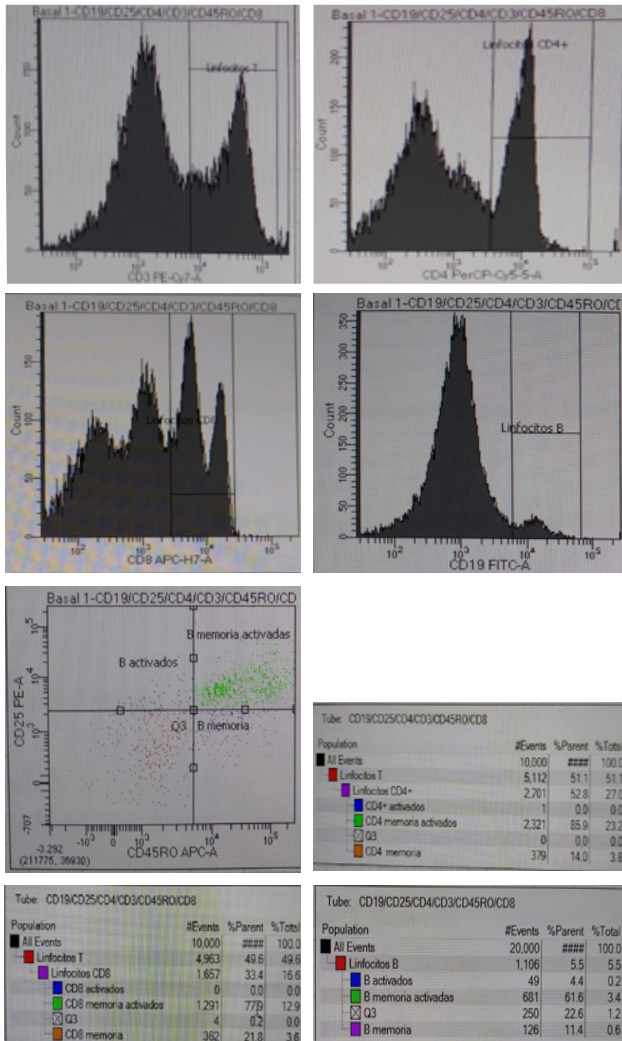
Nuevas variantes del coronavirus-2, como ómicron, nos recuerdan que la epidemiología de los virus respiratorios cambió y que el sistema de salud debe estar atento a la posible aparición de otras variantes más transmisibles y resistentes a inmunización previa.

Entre las limitaciones del estudio, se identificaron la imposibilidad de estudiar un mayor número de individuos y de representar todos los rangos etarios, especialmente, el de los adultos mayores; tampoco se incluyeron personas con comorbilidades significativas o que hayan cursado la enfermedad con parámetros de gravedad, como requerimiento de internación o asistencia respiratoria, entre otras. El motivo fue que, en Argentina, la campaña de vacunación anti COVID-19 se inició antes de realizar este estudio, y los primeros en acceder a las vacunas fueron los grupos de riesgo: personal de salud, mayores de 65 años y personas con comorbilidades. En septiembre del 2021, la vacunación comenzó a ser libre y voluntaria para mayores de 18 años.

Otro punto a mencionar es que, al momento del ensayo, todas las personas habían decidido voluntariamente no vacunarse, se encontraban en perfecto estado de salud y declararon no haber tenido síntomas compatibles con COVID-19 en el periodo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y este estudio; sin embargo, no podemos garantizar que la respuesta inmune específica anti-SARS-CoV-2 aquí estudiada se deba exclusivamente a la memoria inmunológica generada por la primoinfección natural, ya que existe la posibilidad de haber incluido también la respuesta asintomática a una o más exposiciones al virus,



## Anexo I. Estrategia para el análisis por citometría de flujo.



► En el caso de los LT, se realizó un gate inicial en las CMN CD3+; sobre ellas, se discriminaron las subpoblaciones CD4+ o CD8+; finalmente, se analizaron en un plot los clusters de doble positivas para los marcadores de activación y memoria celular (CD25+ y CD45Ro+, respectivamente). Para los LB, se realizó un gate inicial en las CMN CD19+; luego, se analizó en un plot el cluster CD25+ y CD45Ro+. La misma estrategia se aplicó tanto para el estadio basal como para el estimulado.

como describen otros autores.<sup>38</sup>

En este estudio, solo se evaluó la inmunidad sistémica, pero sería interesante estudiar también la inmunidad de mucosas dosando IgA sérica y secretoria, indispensables como primer mecanismo de defensa contra virus respiratorios.

Si bien la vacunación redujo la morbilidad asociada al SARS-CoV-2, se necesitan más investigaciones para caracterizar su durabilidad y efecto protector. Se han reportado varios casos de efectos adversos potencialmente asociados con las vacunas, como miocarditis<sup>39,40</sup>, hipertensión<sup>41</sup>, enfermedad glomerular<sup>42</sup>, efectos oculares<sup>43</sup> y enfermedades autoinmunes.<sup>44,45</sup> La incidencia de estos efectos adversos podría ser mayor en personas que han

cursado COVID-19 antes de la vacunación.<sup>46,47</sup>

Este estudio, junto con otros abordajes de naturaleza similar, llevan a revisar las estrategias de vacunación y adaptarlas a poblaciones específicas, tal como comunicó la OMS en enero del 2022 respecto de la necesidad de desarrollar vacunas alternativas, como las nasales<sup>48</sup>, aplicando conocimientos básicos de inmunología.<sup>21</sup>

Habiendo detectado inmunidad específica de memoria en convalecientes sin vacunar, después de un año de la infección natural, consideramos que, para personas ya expuestas al virus o vacunadas que no pertenezcan a ningún grupo de riesgo, podría implementarse un nuevo esquema de inmunización anual de única dosis.

## Agradecimientos

Al Servicio Virosis Respiratorias, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” por facilitarnos el virus inactivado; a la Dra. Florencia Quiroga del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (UBA-CONICET), quien nos facilitó PHA y azul tripano; a Lorena Keller y Diego Rodríguez del Laboratorio del Hospital Interzonal Especializado Materno Infantil “Don Victorio Tetamanti” de Mar del Plata por el uso del CMF y a todo el personal del laboratorio del Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara”, ANLIS-Malbrán, especialmente, a la Mg. Andrea Silva por el análisis de datos y a la Lic. Silvina Lavayen.

## Fuentes de financiación

Beca “Salud Investiga” para proyectos de Investigación 2020 - 2021, otorgada por el Ministerio de Salud de la Nación a Natalia Libera.

## Conflictos de interés

Las autoras declaran no poseer conflictos de interés.

## Referencias bibliográficas

- World Health Organization (WHO). Coronavirus. [Internet]. Geneva. WHO; 2023. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). COVID-19: cronología de la actuación de la OMS. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
- Yonker LM, Neilan AM, Bartsch Y, Patel AB, Regan J, Arya P, et al. Pediatric severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): clinical presentation, infectivity, and immune responses. J Pediatr. 2020;227:45. DOI: 10.1016/j.jpeds.2020.08.037.
- Lee S, Meyler P, Mozel M, Tauh T, Merchant R. Asymptomatic carriage and transmission of SARS-CoV-2: What do we know? Can J Anaesth. 2020;67(10):1424-1430. DOI: 10.1007/s12630-020-01729-x.
- Salzberger B, Buder F, Lampl B, Ehrenstein B, Hitzentichler F, Holzmann T, et al. Epidemiology of SARS-CoV-2. Infection. 2021;49(2):233-239. DOI: 10.1007/s15010-020-01531-3.
- Ministerio de Salud Argentina. Boletín Epidemiológico Nacional N° 651 SE 17. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-epidemiologico-nacional-651-se-17>
- Ministerio de Salud. Comenzó la campaña de vacunación contra COVID-19 en Argentina. [Internet]; 2023. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/comenzo-la-campana-de-vacunacion-contra-covid-19-en-argentina>
- Ministerio de Salud. Monitor Público de vacunación. [Internet]. 2023. Dis-

- ponible en: <https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/aplicadas>
9. Organización Mundial de la Salud. Coronavirus. [Internet]. 2023. Disponible en: [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_1)
  10. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med*. 2021;384(6):533-540. DOI: 10.1056/NEJMoa2034545.
  11. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19 Vaccine Effectiveness Research. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/effectiveness-research/protocols.html>
  12. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021;184(9):2372-2383. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.013.
  13. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variantclassifications.html>
  14. Gao SJ, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! *J Med Virol*. 2022;94(4):1255-1256. DOI: 10.1002/jmv.27491.
  15. Ministerio de Salud. ¿Cuáles vacunas estamos aplicando en el país? [Internet]. 2023. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/cuales?gad=1&gclid=EALaQobChMIncCAxejp\\_gIV-4CytBhOOctgCTEAYASAAEgJ85fD\\_BwE](https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/cuales?gad=1&gclid=EALaQobChMIncCAxejp_gIV-4CytBhOOctgCTEAYASAAEgJ85fD_BwE)
  16. Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling MJ, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(1):113-21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
  17. Smith N, Goncalves P, Charbit B, Grzelak L, Beretta M, Planchais C, et al. Distinct systemic and mucosal immune responses during acute SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol*. 2021;22(11):1428-1439. DOI: 10.1038/s41590-021-01028-7.
  18. Vibholm LK, Nielsen SSF, Pahus MH, Frattari GS, Olesen R, Andersen R, et al. SARS-CoV-2 persistence is associated with antigen-specific CD8 T-cell responses. *EBioMedicine*. 2021;64:103230. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103230.
  19. Karlsson AC, Humbert M, Buggert M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;18;5(53). DOI: 10.1126/sciimmunol.abe8063.
  20. DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;538:211-217. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.10.060.
  21. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Paveli E, Molnar V, Matišić V, et al. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol*. 2022;13:848582. DOI: 10.3389/fimmu.2022.848582.
  22. ordan SC. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin Exp Immunol*. 2021;204(3):310-320. DOI: 10.1111/cei.13582.
  23. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011;186(12):7264-8. DOI: 10.4049/jimmunol.0903490.
  24. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol*. 2014;88(19):11034-11044. DOI: 10.1128/JVI.01505-14.
  25. Shah VK, Fimal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol*. 2020;11:1949. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01949.
  26. Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Respiratory Viruses (ESGREV). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(7):981-986. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.001.
  27. Ministerio de Salud. COVID-19. Definiciones y clasificaciones de caso. Caso sospechoso de Covid-19. [Internet]. 2021. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus/definicion-de-caso#:~:text=Todo%20caso%20sospechoso%20de%20COVID,reversa%20\(RT%20PCR\)](https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus/definicion-de-caso#:~:text=Todo%20caso%20sospechoso%20de%20COVID,reversa%20(RT%20PCR))
  28. Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity*. 2006;25(4):533-43. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.09.005.
  29. Chen H, Schürch CM, Noble K, Kim K, Krutzik PO, O'Donnell E, et al. Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol*. 2020;21(1):15. DOI: 10.1186/s12865-020-00345-0.
  30. De Giorgi V, West KA, Henning AN, Chen LN, Holbrook MR, Gross R, et al. Naturally Acquired SARS-CoV-2 Immunity Persists for Up to 11 Months Following Infection. *J Infect Dis*. 2021;224(8):1294-1304. DOI: 10.1093/infdis/jiab295.
  31. Radbruch A, Chang HD. A long-term perspective on immunity to COVID-19. *Nature*. 2021;595(7867):359-360. DOI: 10.1038/d41586-021-01557-z.
  32. Yao L, Wang GL, Shen Y, Wang ZY, Zhan BD, Duan LJ, et al. Persistence of Antibody and Cellular Immune Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients Over Nine Months After Infection. *J Infect Dis*. 2021;224(4):586-594. DOI: 10.1093/infdis/jiab255.
  33. Sherina N, Piralla A, Du L, Wan H, Kumagai-Braesch M, Andréll J, et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med*. 2021;2(3):281-295. DOI: 10.1016/j.medj.2021.02.001.
  34. Vitiello A, Ferrara F, Troiano V, La Porta R. COVID-19 vaccines and decreased transmission of SARS-CoV-2. *Inflammopharmacology*. 2021;29(5):1357-1360. DOI: 10.1007/s10787-021-00847-2.
  35. Riemersma K.K., Grogan B.E., Kita-Yarbro A., Minor N., Eickhoff J., Grogan B.E., et al. Shedding of Infectious SARS-CoV-2 Despite Vaccination. *PLoS Pathog*. 2021;18:e1010876. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010876.
  36. Israel A, Shenhar Y, Green I, Merzon E, Golan-Cohen A, Schäffer AA, et al. Large-Scale Study of Antibody Titer Decay following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection. *Vaccines (Basel)*. 2021;10(1):64. DOI: 10.1101/2021.08.19.21262111.
  37. Andrews N., Tessier E., Stowe J., Gower C., Kirsebom F., Simmons R., et al. Duration of Protection against Mild and Severe Disease by Covid-19 Vaccines. *J. Med*. 2022;386:340-350. DOI: 10.1056/NEJMoa2115481.
  38. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020;183(1):158-168. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017.
  39. Simone A, Herald J, Chen A, Gulati N, Shen AY, Lewin B, et al. Acute Myocarditis Following COVID-19 mRNA Vaccination in Adults Aged 18 Years or Older. *JAMA Intern Med*. 2021;181(12):1668-1670. DOI: 10.1001/jamainternmed.2021.5511.
  40. Kim HW, Jenista ER, Wendell DC, Azevedo CF, Campbell MJ, Darty SN, et al. Patients With Acute Myocarditis Following mRNA COVID-19 Vaccination. *JAMA Cardiol*. 2021;6(10):1196-1201. DOI: 10.1001/jamacardio.2021.2828.
  41. Zappa M, Verdecchia P, Spanevello A, Visca D, Angeli F. Blood pressure increase after Pfizer/BioNTech SARS-CoV-2 vaccine. *Eur J Intern Med*. 2021;90:111-113. DOI: 10.1016/j.ejim.2021.06.013.
  42. Caza TN, Cassol CA, Messias N, Hannoudi A, Haun RS, Walker PD, et al. Glomerular Disease in Temporal Association with SARS-CoV-2 Vaccination: A Series of 29 Cases. *Kidney360*. 2021;2(11):1770-1780. DOI: 10.34067/KID.0005372021.
  43. Ng XL, Betzler BK, Testi I, Ho SL, Tien M, Ngo WK, et al. Ocular Adverse Events After COVID-19 Vaccination. *Ocul Immunol Inflamm*. 2021;29(6):1216-1224. DOI: 10.1080/09273948.2021.1976221.
  44. Lui DTW, Lee KK, Lee CH, Lee ACH, Hung IFN, Tan KCB. Development of Graves' Disease After SARS-CoV-2 mRNA Vaccination: A Case Report and Literature Review. *Front Public Health*. 2021;9:778964. DOI: 10.3389/fpubh.2021.778964.



45. Chen Y, Xu Z, Wang P, Li XM, Shuai ZW, Ye DQ, et al. New-onset autoimmune phenomena post-COVID-19 vaccination. *Immunology*. 2022;165(4):386-401. DOI: 10.1111/imm.13443.
46. Mathioudakis AG, Ghrew M, Ustianowski A, Ahmad S, Borrow R, Papa-vasileiou LP, et al. Self-Reported Real-World Safety and Reactogenicity of COVID-19 Vaccines: A Vaccine Recipient Survey. *Life* [Basel]. 2021;11(3):249. DOI: 10.3390/life11030249.
47. Tré-Hardy M, Cupaiolo R, Papeux E, Wilmet A, Horeanga A, Antoine-Moussiaux T, et al. Reactogenicity, safety and antibody response, after one and two doses of mRNA-1273 in seronegative and seropositive health care workers. *J Infect*. 2021;83(2):237-279. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.03.025.
48. WHO Interim Statement on COVID-19 Vaccines in the Context of the Circulation of the Omicron SARS-CoV-2 Variant from the WHO Technical Advisory Group on COVID-19 Vaccine Composition [TAG-CO-VAC, 2022] [Internet] 2022. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/11-01-2022-interim-statement-on-covid-19-vaccines-in-the-context-of-the-circulation-of-the-omicron-sars-cov-2-variant-from-the-who-technical-advisory-group-on-covid-19-vaccine-composition>.



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución -No Comercial- Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.