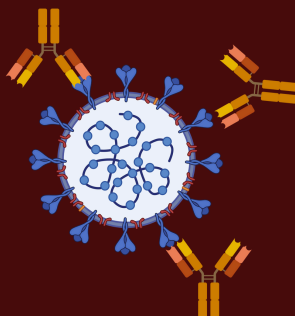




VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Doctorado en Medicina

RESPUESTA DE ANTICUERPOS
FUNCIONALES FRENTE A
SARS-CoV-2
(VARIANTE ÓMICRON)
EN LA POBLACIÓN GENERAL



TESIS DOCTORAL

Jorge Camacho Marín

Dirigida por David Navarro Ortega



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**RESPUESTA DE ANTICUERPOS FUNCIONALES
FRENTE A SARS-COV-2 (VARIANTE ÓMICRON)
EN LA POBLACIÓN GENERAL**



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA [Q̇ 人]
Facultat de Medicina i Odontologia

David Navarro Ortega, jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por el Graduado Jorge Camacho Marín, titulado *“Respuesta de anticuerpos funcionales frente a SARS-CoV-2 (variante Ómicron) en la población general”* se ha realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que cumpla con la normativa prevista por el Programa Doctorado en Medicina de la Universidad de Valencia y así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a enero de 2025,

Fdo. David Navarro Ortega

Agradecimientos

Esta quizá sea una de las páginas más difíciles de desarrollar de toda esta tesis doctoral. Y es que se hace complicado resumir, en unas pocas frases, no solo toda la gratitud que tengo, sino también mencionar a todas las personas que han hecho esto posible.

En primer lugar, y como no podía ser de otra manera, me gustaría agradecer a mis padres y a mi hermano por ser el perfecto pilar sobre el que cimentar todo triunfo personal. A través de vuestro ejemplo, me habéis enseñado el valor y la importancia del esfuerzo, la lealtad y el compromiso. Sin lugar a dudas, nunca podré agradecerlos lo suficiente todas las oportunidades que me habéis brindado con vuestro trabajo y apoyo, todo nacido desde el amor más profundo. Estoy seguro de que los abuelos y tito Salvador están orgullosos de lo que hemos conseguido. Esto va por ellos.

A todos mis compañeros y amigos del Servicio de Microbiología del HCUV: desde técnicos, residentes y ex-residentes, hasta adjuntos. Más allá de lo recibido en el ámbito profesional, me quedo con todo el cariño diario que me habéis dado durante estos cuatro años. Vuestra cercanía, desde el primer segundo que pisé el servicio, me hizo saber que, además de mucho trabajo, también habría muchas risas. Esto me ha ayudado enormemente a trabajar con motivación y desempeño (unos días más que otros). Os llevaré siempre conmigo allá donde vaya. Mención especial a Estela, Eliseo, Nacho, Bea, Paula, Diego y Sofía: vuestra ayuda, sabiduría, paciencia y apoyo han sido imprescindibles en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos de Fuengirola, Granada, Bolonia y Valencia: gracias por todos los momentos vividos y por estar siempre ahí, por quererme con mis defectos. La vida ha hecho un buen trabajo al juntarme con gente tan maravillosa. Compartiremos logros allá donde estemos.

Y por último, siendo el gran responsable de todo esto: gracias al *Boss*, David Navarro. Y no es solo porque le guste la marca de ropa, sino porque su sola presencia ya te indica que estás frente a uno de los grandes, con la excelencia y dedicación al mundo de la microbiología como estandarte. Si alguien puede expresar el mayor potencial investigador en una persona, ese es él. Una de mis canciones favoritas del grupo *Foo*

Fighters pregunta: “*Is someone getting the best of you?*” Y creo que por fin he encontrado esa respuesta: “*Yeah, and that’s David!*” Gracias por esta gran oportunidad.

A mi familia

Presentación

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones en virtud del nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Las publicaciones que componen esta tesis doctoral se citan a continuación:

- I. Camacho J, Giménez E, Albert E, Zulaica J, Álvarez-Rodríguez B, Torres I, et al. Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the Valencian Community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant. *J Med Virol.* 2022; 95(1):e28284. DOI:10.1002/jmv.28284
- II. Camacho J, Albert E, Zulaica J, Álvarez-Rodríguez B, Rusu L, Olea B, et al. A performance comparison of two (electro) chemiluminescence immunoassays for detection and quantitation of serum anti-spike antibodies according to SARS-CoV-2 vaccination and infections status. *J Med Virol.* 2022; 95(1):e28397. DOI:10.1002/jmv.28397
- III. Camacho J, Zulaica J, Giménez E, Rusu L, Velandia-Álvarez S, Albert E, et al. Neutralizing antibodies against Omicron BA.4/5 after COVID-19 vaccination in SARS-CoV-2 experienced versus naïve individuals in the general population. *J. Infect.* 2023; 86(3):256-308. DOI:10.1016/j.jinf.2022.12.029
- IV. Camacho J, Albert E, Álvarez-Rodríguez B, Rusu L, Zulaica J, Rodríguez Moreno A, et al. A machine learning model for predicting serum neutralizing activity against Omicron SARS-CoV-2 BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population. *J Med Virol.* 2023; 95(4):e28739. DOI:10.1002/jmv.28739

Abreviaturas y acrónimos

- ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ARNsg: ARN subgenómico
- BAU: Binding Antibody Units; Unidades de anticuerpos de unión
- CAP: Centros de atención primaria
- CART: Classification and Regression Trees; Árboles de Clasificación y Regresión
- CHAID: Chi-squared Automatic Interaction Detection; Detección Automática de Interacciones de Chi Cuadrado
- COI: Índice de corte
- CoP: Correlato de protección
- CoV: Coronavirus
- COVID-19: Enfermedad por Coronavirus 2019
- CT: Cycle threshold; Umbral del ciclo
- CV: Comunidad Valenciana
- E: Proteína de la envoltura del SARS-CoV-2
- ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
- ECIL: Conferencia Europea sobre Infecciones en Leucemia
- ECLIA: Electrochemiluminescence Immunoassay; Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
- ERGIC: Complejo intermedio RE-Golgi
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- FN, FP: Falso negativo, falso positivo
- GFP: Proteína fluorescente verde
- GIV: Gestión Integral de la Vacunación COVID-19
- HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia

- HR 1/2: Repeticiones de heptada 1/2
- IC: Intervalo de confianza
- IC₅₀: Concentración inhibitoria media
- ICS: Intracellular cytokine staining; Tinción intracelular de citoquinas
- ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
- IFN- γ /I/III: Interferón- γ /I/III
- IgA/D/E/G/M: Inmunoglobulina A/D/E/G/M
- IL6R: Receptor de interleucina 6
- IQR: Rango intercuartílico
- I²SysBio: Instituto de Biología Integrativa de Sistemas
- JAK: Janus Kinase
- M: Proteína de la membrana de SARS-CoV-2
- mAb: Anticuerpos monoclonales
- MERS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
- ML: Machine Learning; Aprendizaje automatizado
- μ l, ml: Microlitro, mililitro
- N: Proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2
- NPA: Negative percent agreement; Porcentaje de concordancia negativo
- NSP: Proteínas no estructurales
- NtAb: Anticuerpos neutralizantes
- NTD: Dominio N-terminal de la proteína S del SARS-CoV-2
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ORF: Open Reading frame; Marco de lectura abierto
- PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
- PBS: Tampón fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PDIA: Prueba diagnóstica de infección activa
- PPA: Positive percent agreement; Porcentaje de concordancia positivo
- PRNT: Ensayo de neutralización por reducción de placas
- ProVaVac: Programa Valenciano de Investigación de la Vacuna frente a la COVID-19
- PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
- R0: Número básico de reproducción

- RBD: Receptor binding domain; dominio de unión al receptor
- RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN
- RE: Retículo endoplasmático
- RedMiVa: Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana
- ROC: Receiver operating characteristic
- Rpm: Revoluciones por minuto
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- S: Proteína Spike del SARS-CoV-2
- SARS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
- SARS-CoV-2: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2
- SVS: Sistema Valenciano de Salud
- TC: Cohorte de entrenamiento
- TMPRSS2: Proteasa transmembrana serina 2
- Unvac-Ex: No vacunados con infección previa por SARS-CoV-2
- Unvac-N: No vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve)
- Vac-Ex: Vacunados con infección previa por SARS-CoV-2
- Vac-N: Vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve)
- VLP: Virus-like particle; Partícula similar a virus
- VN,VP: Verdadero negativo, Verdadero positivo
- VOC: Variant of concern; Variante de preocupación
- VOI: Variant of interest; Variante de interés
- VSV: Virus de la estomatitis vesicular
- VUM: Variant under monitoring; Variante bajo vigilancia
- VC: cohorte de validación
- ZAP: Zonas de atención primaria

Índice

Agradecimientos	VII
Presentación	XI
Abreviaturas y acrónimos.....	XIII
Índice.....	XVII
Resumen	1
I. INTRODUCCIÓN	25
1. Marco histórico y taxonomía	25
2. Estructura viral.....	26
2.1 Genoma.....	26
2.2 Proteínas estructurales	27
3. Variantes del SARS-CoV-2	29
4. Infección viral y patogenia del SARS-CoV-2.....	31
4.1 Interacción con el receptor ACE2.....	31
4.2 Expresión génica viral y síntesis de ARN	32
4.3 Ensamblaje y salida del virus	33
5. Características clínicas y epidemiológicas de la COVID-19	33
6. Diagnóstico	34
6.1 Diagnóstico mediante la detección de ácidos nucleicos	34
6.2 Diagnóstico radiológico.....	35
6.3 Diagnóstico mediante la detección de antígenos	35
6.4 Diagnóstico serológico	35
7. Respuesta inmunitaria a la infección por SARS-CoV-2	36
8. Vacunas frente a la COVID-19	38
8.1 Vacunas de ARNm	40
8.2 Vacunas basadas en vectores virales	40

8.3 Vacunas de subunidades proteicas.....	41
8.4 Vacunas de virus inactivados.....	41
9. Tratamiento frente a la COVID-19	42
II. HIPÓTESIS	47
III. OBJETIVOS.....	51
1. Evaluar la respuesta inmune de la población general de la Comunidad Valenciana tras la aparición de la subvariante Ómicron BA.1	52
2. Comparar el rendimiento analítico de dos inmunoensayos utilizados para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos frente a la proteína S del SARS-CoV-2.	52
3. Analizar la actividad neutralizante de los sueros de individuos vacunados frente a nuevas subvariantes del SARS-CoV-2.	52
4. Elaborar un modelo para predecir la actividad neutralizante sérica frente a distintas subvariantes del virus en la población general a partir de parámetros simples.....	52
IV. METODOLOGÍA	55
1. Población y diseño del estudio	55
2. Muestras	56
3. Definiciones	57
4. Ensayos inmunológicos.....	58
5. Método ML: CART.....	63
6. Análisis estadísticos	64
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
1. Estudio de la incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2 en la población general de la Comunidad Valenciana	69
1.1 Características de los participantes	69
1.2 Incidencia acumulada de la infección por SARS-CoV-2	71
1.3 Determinación de anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2.....	72

1.4 Análisis de anticuerpos neutralizantes contra las subvariantes Wuhan-Hu-1 y Ómicron.....	76
1.5 Evaluación de la respuesta de las células T productoras de IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2	79
2. Comparación del rendimiento de dos inmunoensayos de quimioluminiscencia para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos a la espícula del SARS-CoV-2 en suero.....	84
2.1 Características de los pacientes	84
2.2 Concordancia cualitativa entre inmunoensayos.....	84
2.3 Concordancia cuantitativa entre inmunoensayos.....	87
2.4 Correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos y los anticuerpos neutralizantes.....	90
3. Análisis comparativo de los anticuerpos neutralizantes contra Ómicron BA.4/5 tras la vacunación frente a la COVID-19 en personas con infección previa por SARS-CoV-2 frente a personas naïve en la población general.....	99
3.1 Características de los pacientes.....	99
3.2 Análisis de la respuesta de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 en pacientes vacunados con y sin infección previa por SARS-CoV-2	100
4. Evaluación de la capacidad predictiva de un modelo de aprendizaje automático (<i>machine learning</i>) en la detección de actividad neutralizante de sueros frente a las subvariantes Ómicron BA.2 y BA.4/5	104
4.1 Características de los participantes incluidos en las cohortes de entrenamiento y validación	104
4.2 Niveles de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 en suero que predicen la detección de anticuerpos neutralizantes frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5	104
4.3 Modelo CART para predecir la actividad neutralizante detectable en suero frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 basado en mediciones del nivel de anticuerpos totales anti-RBD.....	107

4.4 Validación del modelo CART	109
VI. CONCLUSIONES.....	117
VII. BIBLIOGRAFÍA	121
VIII. ANEXOS.....	143
1. Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral	143
2. Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral	148
<i>Artículos</i>	149

Resumen

Marco teórico

La presente tesis doctoral, titulada “Respuesta de anticuerpos funcionales frente a SARS-CoV-2 (variante Ómicron) en la población general”, se estructura como un compendio de publicaciones científicas que abordan, de manera integrada, la respuesta inmunitaria humoral frente al SARS-CoV-2, con especial énfasis en la variante Ómicron y sus subvariantes. La unidad temática de los artículos radica en la evaluación de la respuesta humoral de la población general tras la aparición de Ómicron, viendo cómo puede afectar el rendimiento analítico de herramientas serológicas enfocadas en la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos contra la proteína espicular del SARS-CoV-2 y estimando la actividad neutralizante sérica a partir de modelos predictivos basados en aprendizaje automático (*machine learning*).

La pandemia de COVID-19, causada por el SARS-CoV-2, ha supuesto un desafío sin precedentes para la salud pública global. A finales de diciembre de 2019, las autoridades sanitarias de Wuhan, en la provincia de Hubei, China, detectaron un brote de neumonía de origen desconocido en varios pacientes, todos ellos vinculados epidemiológicamente a un mercado mayorista de animales vivos y mariscos. Investigaciones científicas posteriores, basadas en la secuenciación de ARN metagenómico y el aislamiento del virus en muestras de pacientes con neumonía grave, identificaron un nuevo betacoronavirus nunca antes observado. Este hallazgo marcó el inicio de una crisis sanitaria sin precedentes.

En cuestión de semanas, el virus se propagó rápidamente por China y otros países, registrándose miles de nuevos casos diarios. La confirmación de la transmisión de persona a persona aumentó la preocupación mundial. Como respuesta, el 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote como una emergencia de salud pública de interés internacional y poco después, el 11 de febrero, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) denominó oficialmente al respiratorio agudo severo patógeno como coronavirus del síndrome tipo 2 (SARS-CoV-2), dada su similitud con el SARS-CoV, responsable del brote de 2002-2003. Paralelamente, la OMS designó el nombre de ‘COVID-19’ a la enfermedad causada por este virus, facilitando su identificación en el ámbito clínico y epidemiológico.

Desde un punto de vista taxonómico, los coronavirus pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, dentro de la familia *Coronaviridae*, y al orden *Nidovirales*. Esta subfamilia se divide en cuatro géneros principales: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus*. Según los análisis genómicos, el SARS-CoV-2 se clasifica dentro del género *Betacoronavirus*, al igual que otros coronavirus que han causado brotes en humanos como el SARS-CoV y MERS-CoV con el que comparte un 79% y un 50% de identidad de secuenciación genómica, respectivamente.

El SARS-CoV-2 posee un genoma de aproximadamente 30 kb que contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORF) y codifica 29 proteínas virales. En el extremo 5' del genoma, los ORF1a y ORF1b codifican dos poliproteínas superpuestas, pp1a y pp1b, que posteriormente son procesadas por proteasas virales para generar 16 proteínas no estructurales esenciales en la replicación y transcripción del virus. Por otro lado, en el extremo 3' del genoma, el SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas estructurales clave: la proteína de la espícula (S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N). Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en el ensamblaje del virión y en la evasión de la respuesta inmune del huésped. Además, el genoma viral contiene genes que codifican nueve proteínas accesorias implicadas en la patogénesis del virus.

La proteína S, compuesta por 1.273 aminoácidos, es una glicoproteína transmembrana de tipo I que forma un homotrímero que sobresale de la superficie del virión, dándole su característica apariencia de corona. Su función principal es mediar la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped, permitiendo la entrada del virus. Esta proteína se escinde en dos subunidades funcionales: S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD), que puede adoptar dos conformaciones: un estado cerrado ("abajo") que protege las regiones de unión al receptor y un estado abierto ("arriba") que permite la interacción con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la célula huésped. La subunidad S2, por su parte, contiene regiones estructurales altamente conservadas, como el péptido de fusión, dos repeticiones de heptada (HR1 y HR2) y una región transmembrana. Estas regiones permiten la fusión de la membrana viral con la membrana celular tras la activación conformacional de la proteína S.

Dado su papel central en la infección, la proteína S es la principal diana para estudios evolutivos, así como para el desarrollo de vacunas y tratamientos con anticuerpos monoclonales. Su constante evolución bajo presión selectiva unido a la alta tasa de replicación, típica de los virus ARN, facilita la aparición de mutaciones que pueden dar lugar a variantes con ventajas adaptativas como una mayor transmisibilidad, evasión inmunológica o aumento de la virulencia.

Las Variantes de Preocupación (VOC), se caracterizan por presentar mutaciones que pueden afectar la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad, la evasión inmunológica o la efectividad de los diagnósticos y tratamientos. Además han demostrado un impacto negativo confirmado en la salud pública. Este impacto puede manifestarse en una mayor transmisibilidad, aumento de la virulencia o reducción de la eficacia de las vacunas, terapias y medidas de control.

Para facilitar la clasificación y comunicación sobre las variantes emergentes, la OMS implementó un sistema de nomenclatura basado en letras del alfabeto griego. Hasta la fecha de realización de esta tesis, la OMS ha reconocido cinco VOC:

- Alfa (B.1.1.7): Detectada en el Reino Unido en septiembre de 2020 y clasificada como VOC en diciembre del mismo año. Se caracterizó por un aumento significativo en la transmisibilidad.

- Beta (B.1.351): Identificada en Sudáfrica en mayo de 2020 y clasificada como VOC en diciembre de 2020. Presentó mutaciones que afectaban la eficacia de la respuesta inmunitaria.

- Gamma (P.1): Emergió en Brasil en noviembre de 2020 y fue clasificada como VOC en enero de 2021. Mostró tanto una mayor transmisibilidad como una reducción en la efectividad de la respuesta inmunitaria.

- Delta (B.1.617.2): Detectada en India en octubre de 2020 y designada como VOC en mayo de 2021. Se asoció con un incremento en la transmisibilidad, la virulencia y la evasión inmunológica.

- Ómicron (B.1.1.529): Identificada en Sudáfrica y Botsuana en noviembre de 2021 y clasificada como VOC en el mismo mes. Se distinguió por su alta transmisibilidad y capacidad de evasión inmunológica.

Desde principios de 2022 hasta 2023, se registraron más de 500 millones de nuevos casos de COVID-19 en el mundo, con más de 1,5 millones de muertes, la mayoría asociadas a la variante Ómicron. Aunque esta variante causó síntomas generalmente menos graves que sus predecesoras, su transmisibilidad fue hasta nueve veces mayor que la variante ancestral Wuhan-Hu-1. Además, mostró una alta capacidad de evasión de los anticuerpos neutralizantes, lo que la convirtió en una de las variantes más preocupantes.

Ómicron acumuló más de 60 mutaciones en comparación con la variante original de Wuhan, muchas de ellas en la proteína S. Su rápida evolución condujo a la aparición de varias subvariantes, entre ellas:

- BA.1: Primera subvariante detectada a finales de 2021. Mostró una mayor transmisibilidad y evasión inmunitaria en comparación con Delta.

- BA.2: Apodada la "variante sigilosa" debido a la ausencia de una delección en el gen S que dificultaba su detección mediante ciertas pruebas PCR. Fue más contagiosa que BA.1 y provocó nuevas olas de contagio a inicios de 2022.

- BA.3: Su propagación fue más limitada y se restringió principalmente a Sudáfrica.

- BA.4 y BA.5: Identificadas en el primer trimestre de 2022, estas subvariantes compartían múltiples mutaciones genéticas. Se destacaron por su alta transmisibilidad y por ser las más eficientes en evadir la respuesta inmunitaria, debido a mutaciones como L452Q, L452R y F486V.

La COVID-19 presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones asintomáticas o leves hasta formas graves y fulminantes. Los síntomas más comunes incluyen fiebre, tos seca, mialgias y fatiga. En los casos más severos, la enfermedad puede progresar a disnea, neumonía e insuficiencia respiratoria, con riesgo de muerte. Todas las edades pueden verse afectadas por la infección, aunque los adultos mayores de 60 años o personas con comorbilidades como hipertensión, obesidad, diabetes o cáncer tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad grave que requiera hospitalización. El período de incubación del virus es de aproximadamente

cinco días, y en los casos más graves, la enfermedad tiende a agravarse alrededor del octavo día tras la aparición de los síntomas.

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través del contacto con secreciones nasales, orales y oculares de personas infectadas, así como por inhalación de gotículas expulsadas al toser o estornudar. Estudios han demostrado que tanto pacientes sintomáticos como asintomáticos pueden portar altas cargas virales en el tracto respiratorio superior, lo que convierte a los individuos asintomáticos en reservorios clave para la propagación del virus y dificulta el control de la infección. Se ha estimado que el número básico de reproducción (R_0) del SARS-CoV-2 es de aproximadamente 2,5, pudiendo ser de hasta 10 para la variante Ómicron, aunque este número podría verse subestimado debido a la dificultad de detectar casos asintomáticos.

El diagnóstico temprano del SARS-CoV-2 es crucial para controlar su propagación. Existen varias metodologías como la detección de ácidos nucleicos, en el que la RT-qPCR a partir de muestras nasofaríngeas sigue siendo el *gold standard* en el diagnóstico de la infección activa cuyos kits comerciales suelen dirigirse a genes como S, N, E y ORF1ab. Por otra parte, la detección de antígenos virales puede ser una opción viable para el diagnóstico en el lugar de atención del paciente por su rapidez, bajo coste y facilidad de uso. Por último, el diagnóstico serológico mediante el uso de ensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA) nos permite tanto detectar personas previamente infectadas por el virus con la posibilidad de realizar estudios de seroprevalencia, como evaluar la respuesta inmune humoral frente al SARS-CoV-2 tras la vacunación o infección del virus. El ECLIA se caracteriza por presentar una sensibilidad y especificidad mayor al ELISA. Sin embargo, existen numerosos ECLIA comercializados para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-S del SARS-CoV-2 que difieren entre sí en el diseño analítico, la clase de inmunoglobulina medida y el antígeno del SARS-CoV-2 que detectan, lo que podría presentar discrepancias a nivel de rendimiento analítico.

La respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2 es compleja y multifactorial. La inmunidad adaptativa juega un papel crucial en la protección contra el SARS-CoV-2. Las células T CD4⁺ y CD8⁺, junto con las células B productoras de anticuerpos, son esenciales para limitar la enfermedad. Los anticuerpos neutralizantes frente al virus son

inmunoglobulinas altamente específicas, dirigidas principalmente a la región RBD de la proteína S del virus, que bloquean la entrada del virus a las células huésped. El Ensayo de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT) es el *gold standard* para medir la actividad neutralizante de los anticuerpos, aunque su uso está limitado a laboratorios de bioseguridad de nivel 3. Por ello, los ECLIA que detectan y cuantifican anticuerpos contra la proteína S, viables en la rutina diaria de los laboratorios de microbiología, deben tener una alta correlación con los ensayos de neutralización.

El concepto de correlato de protección (CoP) es fundamental para evaluar la inmunidad individual y colectiva. Aunque los anticuerpos neutralizantes pueden considerarse un CoP, aún no se ha establecido un umbral estandarizado de protección contra la infección. Sin embargo, estudios han demostrado que niveles elevados de anticuerpos inducidos por infección o vacunación reducen el riesgo de enfermedad sintomática y COVID-19 grave. Por otra parte, la respuesta inmunitaria varía según la gravedad de la infección, la edad y el estado inmunológico del individuo. Se ha demostrado que la inmunidad híbrida, resultante de la infección más la vacunación, es más fuerte y duradera que la inmunidad generada únicamente por la infección. No obstante, la duración de la protección sigue siendo incierta y puede depender de la variante viral predominante.

La vacunación contra la COVID-19 ha sido crucial para prevenir infecciones, controlar la propagación del virus y reducir las complicaciones asociadas, incluso frente a variantes posteriores al virus original de Wuhan-Hu-1. Las vacunas actualmente comercializadas inducen respuestas inmunes fuertes, especialmente en el centro germinal, donde se generan células B de memoria y células plasmáticas de larga duración, responsables de producir anticuerpos específicos y de alta afinidad contra el virus. Estas vacunas no solo inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, sino que también activan respuestas celulares, como las células T y B de memoria, importantes para una protección duradera.

Actualmente, las recomendaciones de vacunación contra la COVID-19 del Ministerio de Sanidad de España comprenden a: personas mayores de 60 años y aquellas que viven en residencias o centros de atención de larga estancia; embarazadas en cualquier trimestre y mujeres en el puerperio; niños de 6 meses a 12 años con

condiciones de alto riesgo, como inmunodeficiencias, trasplantes, enfermedades cardíacas o respiratorias graves, y otras patologías crónicas; adultos y adolescentes mayores de 12 años con comorbilidades; y trabajadores de la salud o aquellos que convivan con personas de alto riesgo.

El tratamiento de la COVID-19 se divide en dos categorías principales cuyo potencial terapéutico varía según la fase de la enfermedad: agentes antivirales y terapias dirigidas al huésped. Agentes virales como el Remdesivir, que es un profármaco de nucleótidos que actúa inhibiendo la ARN polimerasa del virus, o Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir), que actúa inhibiendo la proteasa viral; están indicados en la fase inicial de la enfermedad (dentro de los primeros 5 días tras el inicio de los síntomas) en pacientes con riesgo alto de desarrollar COVID-19 grave. Si la enfermedad progresa a la fase pulmonar o moderada, el enfoque terapéutico se centra en reducir la inflamación con el uso de corticosteroides o anticuerpos monoclonales como el tocilizumab y en mejorar la oxigenación.

Para la profilaxis pre-exposición en personas inmunodeprimidas o alérgicas a componentes de las vacunas, la Comisión Europea autorizó en marzo de 2022 el uso de Evusheld (AZD7442), una combinación de anticuerpos monoclonales (cilgavimab y tixagevimab) que está destinado a quienes no responden bien a la vacunación, con riesgo de desarrollar COVID-19 grave. Hasta el día de hoy se ha utilizado un umbral de 260 BAU/ml de anticuerpos contra la proteína S para evaluar una respuesta adecuada a la vacunación, aunque este valor se basó en estudios en el contexto de la cepa original de Wuhan y podría no ser plenamente aplicable a las variantes actuales. Según estudios iniciales, Evusheld podría reducir el riesgo de enfermedad sintomática por SARS-CoV-2 en un 77%.

Objetivos

Los estudios de seroprevalencia previos a la variante Ómicron en España fueron clave para entender la transmisión del SARS-CoV-2 y orientar las decisiones de salud pública. Actualmente, con gran parte de la población vacunada, es esencial evaluar la respuesta inmune humoral y celular tras la aparición de la subvariante Ómicron BA.1.

Por otra parte, se considera que la inmunidad híbrida (vacunación e infección previa) proporciona una protección más fuerte que la vacunación o la infección por

separado. No obstante, la aparición de nuevas subvariantes con mayor capacidad de evadir los anticuerpos neutralizantes (NtAb) hace necesario confirmar esta hipótesis. Los anticuerpos que se unen a la proteína S del virus, en especial los NtAb, desempeñan un papel fundamental en la protección frente a la infección y la progresión de la COVID-19, por lo que su detección y cuantificación son esenciales para evaluar el estado inmunitario y determinar la necesidad de dosis de refuerzo o anticuerpos monoclonales en poblaciones vulnerables.

Existen diversos inmunoensayos para detectar anticuerpos contra la espícula del SARS-CoV-2, pero difieren en su diseño, tipo de inmunoglobulina medida y el antígeno utilizado, lo que afecta su rendimiento analítico y su correlación con los NtAb. Estas variaciones, junto con el estado diverso de vacunación e infección en la población, pueden generar resultados variables. Por ello, es fundamental evaluar la efectividad de estas herramientas diagnósticas.

La medición directa de NtAb mediante virus o pseudotipos es compleja para la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, la correlación entre los anticuerpos anti-RBD y los NtAb permite desarrollar modelos que predigan la actividad neutralizante.

Por ello, nos planteamos una serie de objetivos:

Primero, quisimos evaluar la respuesta inmune en la Comunidad Valenciana tras la aparición de Ómicron BA.1, determinando la incidencia acumulada de infección por el virus y analizando el impacto de la vacunación en infección natural en la inmunidad humoral y celular.

Segundo, quisimos comparar el rendimiento de dos ECLIA para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos contra la proteína S del virus, evaluando su concordancia cualitativa y cuantitativa según el estado de vacunación e infección de los participantes, y analizando la correlación entre los anticuerpos detectados y los títulos de NtAb frente a diferentes variantes del virus.

Como tercer objetivo, nos planteamos analizar la actividad neutralizante en sueros de individuos vacunados frente a nuevas subvariantes del virus con el poder de comparar la respuesta de NtAb contra las subvariantes Ómicron BA.4/5 y la variante original Wuhan-Hu-1 en personas vacunadas, con o sin infección previa y determinar si

la inmunidad híbrida genera una respuesta más robusta frente a Ómicron BA.4/5 que la vacunación por sí sola.

Por último, quisimos desarrollar un modelo predictivo de la actividad neutralizante sérica frente a subvariantes del virus. La idea fue crear un modelo de aprendizaje automático y evaluar su precisión en cohortes externas, tras haber establecido previamente un umbral de anticuerpos anti-RBD que identifique individuos con actividad neutralizante detectable frente a BA.2 y BA.4/5.

Metodología

- Población de estudio:

Esta tesis doctoral abarca varios estudios realizados con sujetos de la población general atendidos en distintas zonas de atención primaria (ZAP) del Sistema Valenciano de Salud (SVS). En el segundo estudio también se incluyeron pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). El primer estudio y la cohorte de entrenamiento del último comparten la misma población, mientras que la tercera publicación y la cohorte de validación del cuarto artículo provienen del mismo estudio de seroprevalencia.

El número de participantes fue de 931, 797 y 130 para el primer, segundo y tercer estudio, respectivamente. Respecto al cuarto estudio, se utilizaron dos cohortes previas de participantes (931 y 787) pertenecientes a dos estudios de seroprevalencia realizados en abril y octubre de 2022.

- Muestras:

La única muestra que se utilizó para la realización de los diferentes estudios fue la de suero, a excepción del primer estudio, en el que también se usó sangre total para el análisis de la respuesta celular. Para las muestras de suero, se recolectaron muestras de sangre en tubos con gel separador, centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos para obtener el suero, que se procesó en las primeras 24 horas y se conservó a 4°C hasta las pruebas. Para el primer estudio, se recogió un tubo adicional de 5 cc con heparina sódica.

- Definiciones

Los participantes se clasificaron en cuatro categorías según su historial de infección por SARS-CoV-2 y su estado de vacunación contra la COVID-19:

1. Vacunados con infección previa (Vac-Ex): individuos vacunados con prueba diagnóstica positiva de infección activa (PDIA), evidencia serológica de infección previa (anticuerpos IgG anti-nucleocápside) o anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 S RBD en no vacunados.

2. Vacunados/Naïve (Vac-N): sujetos vacunados sin evidencia de infección previa.

3. No vacunados con infección previa (Unvac-Ex): individuos no vacunados con antecedentes o pruebas serológicas de infección.

4. No vacunados/Naïve (Unvac-N): personas no vacunadas sin evidencia de infección.

Los antecedentes de infección se verificaron en el registro de la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA), mientras que el estado de vacunación se obtuvo del registro de vacunación de la CV.

Para el cuarto artículo, los participantes se subclasificaron según el esquema de vacunación en: 1) No vacunados. 2) Vacunados sin dosis de refuerzo (calendarios completos o incompletos). 3) Vacunados con refuerzo homólogo. 4) Vacunados con refuerzo heterólogo.

Se consideró vacunación completa la inyección de dos dosis de Comirnaty (Pfizer/BioNTech), Spikevax (Moderna), Vaxzevria (AstraZeneca), CoronaVac (Sinovac), Sputnik V (Gamaleya), o una dosis de Jcovden (Janssen).

- Ensayos inmunológicos

Para la determinación cuantitativa de anticuerpos contra la proteína S del SARS-CoV-2 se utilizó el inmunoensayo de Roche Diagnostics (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S) que es un ECLIA con un formato sándwich de doble antígeno que detecta anticuerpos totales dirigidos contra el RBD de la proteína S del virus. Para el segundo estudio también se usó el inmunoensayo de DiaSorin S.p.A (LIAISON® SARS-CoV-2

TrimericS IgG) que se trata de un ECLIA indirecto que detecta IgG contra la proteína S en su conformación trimérica.

Ambas técnicas estaban calibradas según el estándar internacional de la OMS (IS; NIBSC 20/136). Las muestras que superaron el límite de cuantificación se diluyeron y reanalizaron. Los análisis se realizaron en el Servicio de Microbiología del HCUV dentro de las 24 horas posteriores a la recolección de las muestras.

Para la determinación cualitativa de anticuerpos contra la proteína N del SARS-CoV-2 se utilizó el ensayo Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 que mide anticuerpos IgG reactivos contra la nucleocápside (N) con un formato sándwich de doble antígeno, al igual que el anterior.

El título de anticuerpos neutralizantes frente a las diferentes subvariantes del SARS-CoV-2 se obtuvo a partir de ensayos de neutralización del virus utilizando un virus de la estomatitis vesicular (VSV) modificado para expresar la espícula del SARS-CoV-2 y una proteína fluorescente verde (GFP), que facilitó la cuantificación de la infección. El cálculo de la neutralización se realizó a partir de la dilución recíproca del suero que lograba una neutralización del 50% del virus. El ensayo de neutralización se realizó en el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio) de la Universidad de Valencia-CSIC.

En el primer artículo también se evaluó la respuesta inmune mediada por células T, específicamente las células T CD4+ y CD8+ productoras de interferón- γ (IFN- γ), tras la exposición a péptidos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2. Para ello, se recolectaron 137 muestras de sangre completa en tubos con heparina sódica y se enviaron el mismo día al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). Tras la estimulación de la sangre con péptidos (S1 y S2) del SARS-CoV-2, la activación de las células T con anticuerpos monoclonales y la adición final de brefeldina A, la sangre fue lisada y analizada en un citómetro de flujo tras seguir un protocolo de tinción intracelular de citoquinas (ICS).

- Método ML: CART

En el cuarto artículo se desarrolló un modelo de aprendizaje automático supervisado (*Machine Learning*, ML) con el objetivo de predecir la actividad

neutralizante sérica frente a diferentes subvariantes Ómicron del SARS-CoV-2. Para ello, se utilizó el enfoque de Árboles de Clasificación y Regresión (CART), seleccionado por su facilidad de interpretación y visualización.

El modelo se basó en un conjunto de variables explicativas de fácil recopilación, que incluyen: edad, sexo, número de dosis de vacuna recibidas (0 a 4), calendario de vacunación, tiempo desde la última dosis de vacuna y antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2.

Se utilizó el algoritmo CHAID para la construcción del árbol de decisión. El árbol se limitó a una profundidad máxima de 10 niveles, con un nivel de significación del 5% y aplicando la corrección de Bonferroni. Las variables que presentaron multicolinealidad (alta correlación entre ellas) fueron eliminadas automáticamente para evitar redundancias en el modelo.

El proceso de desarrollo del modelo incluyó las siguientes fases:

1. Entrenamiento inicial: Se utilizó toda la cohorte de entrenamiento (TC) para desarrollar el modelo.

2. Verificación: Se seleccionó un subgrupo aleatorio de 30 participantes para verificar la robustez del modelo.

3. Validación: Finalmente, el modelo se aplicó a una cohorte de validación (VC) para evaluar su capacidad predictiva en un conjunto de datos independiente.

- **Análisis Estadísticos**

La mayoría de los análisis estadísticos realizados en los estudios se basaron en pruebas no paramétricas, dado que las poblaciones estudiadas no seguían una distribución normal. Las variables continuas se reportaron como medianas y rangos intercuartílicos (IQR). Para las comparaciones entre grupos se utilizaron la prueba exacta de Fisher, las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis y la prueba de rangos de Wilcoxon. El coeficiente kappa de Cohen y la correlación de rangos de Spearman, así como el porcentaje de concordancia positiva (PPA) y el porcentaje de concordancia negativa (PPN) se utilizaron para evaluar la concordancia entre los diferentes inmunoensayos.

Los términos como sensibilidad y especificidad se utilizaron para referirse a la capacidad de detectar o no anticuerpos en los diferentes grupos. Se utilizó la prueba de Bland-Altman para evaluar las diferencias medias de los valores medidos por los dos inmunoensayos y se construyeron curvas ROC para evaluar la sensibilidad y especificidad para cada posible punto de corte de un inmunoensayo dado (BAU/ml) que predice la detección de NtAb, además de para investigar el punto de corte más apropiado para discriminar entre los sueros que mostraban una actividad neutralizante detectable o indetectable frente a cada sublinaje Ómicron del SARS-CoV-2. La significancia estadística se consideró cuando el valor $p < 0,05$. Los análisis y gráficos se realizaron con SPSS versión 20.0 y GraphPad Software Inc. V6.0, respectivamente. El software XLSTAT se utilizó para generar el modelo de aprendizaje automático mediante árboles de clasificación y regresión.

Resultados

1. Estudio de la incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2 en la población general de la Comunidad Valenciana

1.1 Características de los participantes

De los 935 participantes, 812 (86,8%) habían recibido un esquema de vacunación completo (en la mayoría de los casos, Comirnaty o Spikevax), 39 (4,1%) no recibieron una pauta completa de vacunación y 84 (8,9%) no estaban vacunados. El porcentaje de participantes totalmente vacunados aumentó con la edad. Se administraron dosis de refuerzo de la vacuna a 582 participantes (69%), de las cuales 276 fueron homólogas y 306 heterólogas a la vacuna previamente utilizada. La mediana del tiempo transcurrido entre la última dosis de vacuna y el reclutamiento de las muestras fue de 118 días.

1.2 Incidencia acumulada de la infección por SARS-CoV-2

La incidencia acumulada bruta de infección previa por SARS-CoV-2 en la CV fue del 47,4%, mientras que la incidencia acumulada ponderada por edad/sexo fue del 51,9%. Observamos que la tasa de infección previa por SARS-CoV-2 estaba inversamente correlacionada con la edad. Los participantes se agruparon como Vac-Ex ($n = 379$), Vac-N ($n = 472$), Unvac-Ex ($n = 63$) y Unvac-N ($n = 21$), a efectos analíticos.

1.3 Determinación de anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2

Observamos que 906 de los 931 participantes (97,3%) tenían anticuerpos totales anti-RBD detectables. La mediana de los niveles totales de anticuerpos anti-RBD fue significativamente mayor en los participantes Vac-Ex que en los Vac-N. A su vez, los individuos Vac-Ex y Vac-N mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos que los participantes Unvac-Ex.

En general, el número de dosis de vacuna recibidas tuvo un impacto directo en el nivel de anticuerpos totales anti-RBD, independientemente del estado de infección por SARS-CoV-2. Curiosamente, entre los participantes que recibieron una tercera dosis de vacuna, las vacunas de refuerzo heterólogas dieron lugar a un aumento de los niveles de anticuerpos anti-RBD en comparación con los esquemas homólogos en los participantes naïve, independientemente de la edad y el sexo. Sin embargo, no se encontró correlación entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna y los niveles totales de anticuerpos anti-RBD (ρ : -0,02) en los individuos Vac-Ex, mientras que se observó una correlación inversa moderada (ρ : -0,52) en los Vac-N. Es importante destacar que, en los participantes del grupo Vac-Ex con un resultado positivo en una PDIA ($n = 220$), el tiempo transcurrido desde la documentación de la infección por SARS-CoV-2 mostró una correlación inversa débil con los niveles de anticuerpos anti-RBD (ρ :-0,30).

1.4 Análisis de anticuerpos neutralizantes contra las subvariantes Wuhan-Hu-1 y Ómicron

Se examinó a un total de 100 participantes seleccionados al azar de todos los grupos de edad para detectar la presencia de NtAb contra las (sub)variantes de SARS-CoV-2. Las proporciones de participantes que presentaron NtAb contra la variante Wuhan-Hu-1 fueron del 100%, 93% y 40% en los grupos Vac-Ex, Vac-N, Unvac-Ex, respectivamente; para Ómicron BA.1, los porcentajes fueron del 94%, 75% y 50%, respectivamente; y para Ómicron BA.2, del 97%, 84% y 40%, respectivamente.

En general, los títulos de NtAb fueron inferiores frente a Ómicron BA.1 y BA.2 que frente a Wuhan-Hu-1 en todos los grupos de comparación; a su vez, los niveles medios de NtAb de unión a Ómicron BA.1 y BA.2 fueron comparables en todos los grupos de estudio. Cabe destacar que los NtAb dirigidos a todas las (sub)variantes

analizadas fueron mayores en los individuos Vac-Ex que en los Vac-N, aunque se alcanzó significación estadística para los dirigidos contra Wuhan-Hu-1 y BA.1, pero no contra BA.2. Además, tanto Vac-Ex como Vac-N mostraron títulos de NtAb más altos que los participantes Unvac-Ex.

En general, observamos títulos comparables de NtAb frente a todas las (sub)variantes analizadas entre los participantes Vac-Ex, tanto si habían recibido una dosis adicional de vacuna como si no. No obstante, se observó una significativa, aunque débil, correlación inversa entre los títulos de NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 y el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna en los individuos Vac-N (Rho: -0,34 y -0,39), pero no en los Vac-Ex (Rho: -0,26 y 0,06).

1.5 Evaluación de la respuesta de las células T productoras de IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2

Enumeramos las células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2 en 137 participantes. En general, 101 participantes (73,7%) tenían células T IFN- γ detectables para el SARS-CoV-2-S: CD4+ (n = 15; 14,9%), CD8+ (n = 41; 40,6%) o ambas (n = 45; 44,6%). Concretamente, las cifras fueron del 73%, 75% y 64% para Vac-Ex, Vac-N y Unvac-Ex, respectivamente. Las medianas de ambos subconjuntos de células T fueron comparables en todos los subgrupos. Las frecuencias de subconjuntos de células T del SARS-CoV-2 fueron comparables independientemente de haber recibido dosis adicional de vacuna o del tiempo transcurrido desde la última dosis de esta, tanto en individuos Vac-Ex como Vac-N.

2. Comparación del rendimiento de dos inmunoensayos de quimioluminiscencia para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos a la espícula del SARS-CoV-2 en suero

2.1 Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 1176 sueros de 797 sujetos pertenecientes al Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, de los cuales 286 sueros se recogieron de 204 Vac-Ex, 581 de 316 Vac-N, 147 de 134 Unvac-Ex, y 162 de 143 Unvac-N. Para los sujetos con un registro positivo para una PDIA, la mediana del tiempo transcurrido

desde el diagnóstico hasta la determinación serológica fue de 120 días en general, y de 172,5 y 29 días en vacunados y no vacunados, respectivamente. Se observó, además, que en participantes vacunados, la mediana del tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna recibida y la recogida de los sueros, fue de 51 días para los pacientes naïve, y de 98 días para aquellos con una infección previa por SARS-CoV-2.

2.2 Concordancia cualitativa entre inmunoensayos

En general, un número mayor de sueros dio resultados positivos con el ensayo de Roche en comparación con el ensayo de DiaSorin, lo que se traduce en que el ensayo de Roche mostró una mayor sensibilidad para la detección de la exposición o vacunación previas (89,3% vs. 77,6%). No obstante, la concordancia entre los resultados proporcionados por los dos inmunoensayos difirió entre los grupos, siendo mayor para los sueros de Vac-N (κ : 0,58) que para los sueros de Vac-Ex (κ : 0,19) o Unvac-Ex (κ : 0,18).

La tasa de resultados discordantes, en la mayoría de los casos anti-RBD positivo/anti-S-trimérico negativo, fueron mayores entre los sueros de Unvac-Ex (34,7%), seguidos de Vac-N (14,6%) y Vac-Ex (2,7%). La especificidad de ambos ensayos se calculó teniendo en cuenta únicamente los sueros de individuos Unvac-N, y resultó ser del 98,8% para el ensayo de Roche y del 98,1% para el ensayo de DiaSorin.

2.3 Concordancia cuantitativa entre inmunoensayos

De los 774 sueros que arrojaron resultados positivos en ambas pruebas serológicas, 469 mostraron niveles de anticuerpos que se situaban en el intervalo cuantitativo de ambos inmunoensayos y se incluyeron en el análisis que se detalla a continuación. En general, los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos no difirieron significativamente; sin embargo, se observó una tendencia hacia valores BAU/ml más altos medidos por el ensayo de Roche para sueros de Vac-Ex; por el contrario, se observó una tendencia hacia valores BAU/ml más altos medidos por el ensayo de DiaSorin para sueros de Vac-N y Unvac-Ex. En general la correlación entre los niveles de anticuerpos cuantificados por ambos inmunoensayos fue fuerte (ρ = 0,82), y continuó siendo fuerte para los sueros de Vac-Ex (ρ = 0,84) y Vac-N (ρ = 0,80), pero solo fue moderada para los sueros Unvac-Ex (ρ = 0,66), siendo estadísticamente significativa esta diferencia.

2.4 Correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos y los anticuerpos neutralizantes

Se evaluó la capacidad de neutralización del virus de la estomatitis vesicular (VSV) pseudotipado con diferentes genotipos de la proteína S (Wuhan-Hu-1/Ómicron BA.1 y BA.2) de un total de 127 sueros elegidos al azar de entre los que arrojaron resultados positivos en los ensayos de Roche y DiaSorin. Estos sueros fueron recogidos de personas totalmente vacunadas que en el momento de la prueba eran naïve ($n = 88$) o con infección previa por SARS-CoV-2 ($n = 39$). La tasa de sueros con NtAb detectables fue mayor frente a Wuhan-Hu-1 (89%) que frente a Ómicron BA.1 (56%) o BA.2 (70%). En general, los títulos de NtAb fueron más altos para Wuhan-Hu-1 seguido de Ómicron BA.1 y BA.2. Se encontraron diferencias importantes entre Vac-Ex y Vac-N; En Vac-Ex se observó una mayor tasa de sueros con NtAb detectables y mayores títulos de NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 en comparación con Vac-N ($p < 0,001$ para ambas comparaciones); por el contrario, la tasa de NtAb detectables contra BA.2 fue mayor en Vac-N en comparación con Vac-Ex ($p = 0,015$) aunque los niveles de anticuerpos fueron comparables en ambos grupos ($p = 0,92$).

En general, la correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin con los títulos de NtAb fue moderada para los dirigidos contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1. Sin embargo, fue débil o inexistente para los dirigidos contra BA.2. La correlación entre los NtAb de todas las (sub)variantes fue siempre mayor en los sueros de Vac-N que en los Vac-Ex, independientemente del inmunoensayo utilizado.

Independientemente de si los sueros se analizaron en la plataforma de Roche o DiaSorin, los puntos de corte de los anticuerpos asociados con la detección de NtAb fueron los más bajos para Wuhan-Hu-1 y los más altos (y menos precisos) para Ómicron BA.2. Sin embargo, los niveles de anticuerpos medidos con el inmunoensayo de Roche asociados con la detección de NtAb contra la variante Wuhan-Hu-1, fueron 1,9 veces más bajos que los obtenidos con el inmunoensayo de DiaSorin. Por el contrario, fueron necesarios niveles más altos (2,8 veces más) de anticuerpos medidos por el inmunoensayo de Roche en comparación con el de DiaSorin para predecir la

detección de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Omicron BA.1 y BA.2. Un análisis similar utilizando solo sueros de Vac-N arrojó resultados similares.

3. Análisis comparativo de los anticuerpos neutralizantes contra Ómicron BA.4/5 tras la vacunación frente a la COVID-19 en personas con infección previa por SARS-CoV-2 frente a personas naïve en la población general

3.1 Características de los pacientes

Para la realización del tercer trabajo, se analizaron los sueros de 130 individuos de un total de 787 participantes. De estos, 91 se clasificaron como Vac-Ex tras la detección de anticuerpos IgG contra la proteína N del SARS-CoV-2. Veintidós de los 91 tuvieron un registro positivo de un ensayo de RT-PCR en muestras nasofaríngeas.

3.2 Análisis de la respuesta de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 en pacientes vacunados con y sin infección previa por SARS-CoV-2

La mayoría de los participantes Vac-Ex (100%) y Vac-N (94,7%) mostraron respuestas NtAb detectables contra la variante Wuhan-Hu-1. Por el contrario, el porcentaje de individuos Vac-N que mostraron NtAb detectables frente a Ómicron BA.4/5 fue significativamente inferior al de Vac-Ex (52,6% frente a 98,9%; $p < 0,001$). En general, los títulos de NtAb frente a Ómicron BA.4/5 fueron significativamente más bajos que frente a Wuhan-Hu-1 tanto en Vac-Ex y Vac-N. No obstante, en comparación con Vac-N, Vac-Ex mostró títulos de NtAb significativamente más altos frente a Wuhan-Hu-1 (hasta 7 veces más) y Ómicron BA.4/5 (hasta 61 veces más), independientemente de si los participantes recibieron una pauta de vacunación normal o reforzada con una dosis de vacuna adicional.

De los 22 individuos Vac-Ex con un registro positivo de RT-PCR de SARS-CoV-2, en 13 la infección se documentó durante 2022 dentro de oleadas dominadas ($\geq 95\%$ de los casos) por BA.1 ($n = 6$) y BA.2 ($n = 7$), y antes de la aparición de BA.4/5 en la CV; los 9 individuos restantes contrajeron la infección por SARS-CoV-2 durante 2020/2021, antes de la aparición de la variante Ómicron en la CV. Tras el emparejamiento de los individuos de ambos grupos de comparación según el tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna, los títulos de NtAb frente a Ómicron BA.4/5, pero no frente a Wuhan-Hu-1, fueron significativamente inferiores en

los individuos que contrajeron la infección antes de 2022. Es importante destacar que los individuos Vac-N mostraron títulos de NtAb más bajos frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 que los Vac-Ex, independientemente del momento en que se documentó la infección por SARS-CoV-2.

4. Evaluación de la capacidad predictiva de un modelo de aprendizaje automático (machine learning) en la detección de actividad neutralizante de sueros frente a las subvariantes Ómicron BA.2 y BA.4/5

4.1 Características de los participantes incluidos en las cohortes de entrenamiento y validación

Se incluyeron un total de 931 participantes en la cohorte de entrenamiento (TC) y 781 en la cohorte de validación (VC). Cabe destacar que el porcentaje de participantes vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex) fue significativamente mayor en la VC que en la TC (63% frente a 41%).

4.2 Niveles de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 en suero que predicen la detección de anticuerpos neutralizantes frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5

Un total de 100 sueros seleccionados al azar de 100 participantes diferentes fueron examinados para hallar niveles detectables de NtAb frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 (encontrados en 88 y 84 participantes, de forma respectiva), con una mediana de título recíproco IC₅₀ de 148 y 1.031, respectivamente. El análisis ROC indicó que un umbral de anticuerpos totales anti-RBD de 2.300 BAU/ml discrimina eficazmente entre participantes con respuestas detectables de NtAb y aquellos con niveles indetectables. Este umbral mostró una sensibilidad del 90%, especificidad del 71% y precisión del 87% para BA.2, y una sensibilidad del 88%, especificidad del 67% y precisión del 84% para BA.4/5.

4.3 Modelo CART para predecir la actividad neutralizante detectable en suero frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 basado en mediciones del nivel de anticuerpos totales anti-RBD.

Se construyó un modelo CART para predecir la presencia de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 por encima de 2.300 BAU/ml, como sustituto de respuestas NtAb detectables. El modelo incluyó finalmente las siguientes variables: edad,

calendario de vacunación, días transcurridos desde la recepción de la última dosis de vacuna y antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2; y comprendió un total de 25 nodos.

La primera segmentación del árbol de clasificación se basó en el calendario de vacunación; la probabilidad de mostrar anticuerpos totales anti-RBD ≥ 2.300 BAU/ml osciló entre el 94% para los vacunados completamente con dosis de refuerzo heteróloga, al 42% para los no vacunados con infección previa por SARS-CoV-2. En el caso de los participantes vacunados sin dosis de refuerzo, la infección previa por SARS-CoV-2, la edad (en el caso de los participantes naïve) y el número de dosis de vacuna recibidas (en el caso de los participantes con infección previa) modularon la probabilidad de presentar niveles de anticuerpos por encima de 2.300 BAU/ml. Entre los participantes vacunados que recibieron una dosis de refuerzo homóloga, la probabilidad osciló entre el 75% y el 100% en función de la edad; mientras que en los vacunados con una dosis de refuerzo heteróloga la probabilidad osciló entre el 78% y el 100% en función de la edad, llegando a un intervalo del 91% al 100% para los que tenían entre 50 y 65 años en función de si habían presentado o no una infección previa por SARS-CoV-2.

El modelo fue capaz de clasificar correctamente el 88% (793/901) de los participantes en la TC: 717/749 (95,7%) de los que mostraban ≥ 2.300 BAU/ml y 76/152 (50%) de aquellos con < 2.300 BAU/ml. El modelo funcionó mejor en los participantes Vac-N y Vac-Ex que en los individuos Unvac-Ex. Posteriormente, se utilizó en una subcohorte compuesta por 30 sujetos seleccionados aleatoriamente, clasificando correctamente a 29 de los 30 participantes: 26/27 (96%) de aquellos con niveles de anticuerpos > 2.300 BAU/ml y 3/3 (100%) con < 2.300 BAU/ml.

4.4 Validación del modelo CART

Por último, se validó el modelo CART en una nueva cohorte compuesta por 787 participantes que se incluyeron en un estudio de seroprevalencia realizado en octubre de 2022. El modelo CART clasificó correctamente al 95% (596/627) y al 33% (53/160) de los participantes con anticuerpos totales por encima y por debajo de 2.300 BAU/ml, respectivamente, con una precisión global del 82%.

En concreto, en Unvac-Ex, un total de 23 participantes (38%) presentaban ≥ 2.300 BAU/ml, pero fueron clasificados como < 2.300 BAU/ml (FN) por el modelo.

Lamentablemente, faltaron datos sobre la fecha de infección en la mayoría de ellos. En el grupo de Vac-N, 63 participantes (31%) tenían anticuerpos < 2.300 BAU/ml, pero fueron clasificados como ≥ 2.300 BAU/ml (FP). Esto puede explicarse, en parte, porque el modelo se desarrolló utilizando una cohorte que fue analizada con una mediana de 166 días después de recibir la última dosis de la vacuna. En cambio, el grupo utilizado para validar el modelo fue analizado con una mediana de 316 días tras la última dosis de vacuna recibida. En el grupo de Vac-Ex, el 91% de los participantes fueron correctamente clasificados con anticuerpos totales ≥ 2.300 BAU/ml. Al igual que en la TC, en la VC el modelo funcionó mejor para identificar a los participantes Vac-N y Vac-Ex con niveles de anticuerpos totales ≥ 2.300 BAU/ml.

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. Marco histórico y taxonomía

A finales de diciembre de 2019, varios centros de salud en Wuhan, capital de la provincia de Hubei en China, informaron sobre grupos de pacientes con neumonía de causa desconocida. Todos ellos se relacionaron epidemiológicamente con un mercado mayorista de animales vivos y marisco fresco (1). Mediante la secuenciación de ARN metagenómico y el aislamiento del virus a partir de muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con neumonía grave, equipos de científicos chinos identificaron que el causante de esta nueva enfermedad, se trataba de un *betacoronavirus* nunca antes observado (1,2). A finales de enero, el virus se había propagado de forma masiva por todo el país chino comunicándose miles de nuevos casos al día y confirmándose la transmisión de persona a persona (3–6); por lo que el 30 de enero, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró este brote como una emergencia de salud pública de interés internacional (7). El 11 de febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) denominó a este nuevo virus como coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2), por sus similitudes con el SARS-CoV, y la OMS nombró como 'COVID-19' a la enfermedad producida por este coronavirus (8).

Los coronavirus son un grupo diverso de virus que infectan a distintos animales y pueden causar infecciones respiratorias en humanos, que van desde leves hasta graves. Los síntomas y el tropismo tisular de la infección por coronavirus pueden variar entre las diferentes especies hospedadoras (9). Los murciélagos son importantes huéspedes naturales de *alfacoronavirus* y *betacoronavirus*; de hecho, hasta la fecha, el virus cuya secuencia genómica más se aproxima a la del SARS-CoV-2 (al 96,2%) es un coronavirus de murciélago detectado en *Rhinolophus affinis* de la provincia de Yunnan, China, llamado 'RaTG13' (10). Esta alta similitud genética respalda la hipótesis de que el SARS-CoV-2 se podría haber originado en los quirópteros.

Los coronavirus pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae* de la familia *coronaviridae*, en el orden de los nidovirales. Esta subfamilia consta de cuatro géneros: *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *deltacoronavirus* y *gammacoronavirus*. Según el análisis de la secuencia genómica, el SARS-CoV-2 se clasifica en el género

betacoronavirus (1,11). Hasta la fecha, los estudios han informado sobre siete cepas diferentes de coronavirus humanos. Se sabe que las cuatro cepas de coronavirus comunes, incluidas 229E, NL63, OC43 y HKU1, causan infecciones leves de las vías respiratorias en todo el mundo. En 2002 y 2012, respectivamente, dos coronavirus altamente patógenos de origen zoonótico, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), que pertenece al subgénero *Sarbecovirus* al igual que el SARS-CoV-2 con el que comparte un 79% de identidad de secuencia genómica; y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), aparecieron en los seres humanos y causaron enfermedades respiratorias mortales, lo que convirtió a este grupo de virus emergentes en un nuevo problema de salud pública en el siglo XXI (12).

2. Estructura viral

2.1 Genoma

Los coronavirus son virus envueltos que poseen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo con una longitud de entre 26 y 32 kb (13). Esta familia de virus se caracteriza por altas tasas de recombinación genética y mutación, lo que da lugar a su diversidad ecológica (12). La secuencia genómica del SARS-CoV-2, de aproximadamente 30kb, contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORF) y codifica 29 proteínas virales.

Aproximadamente dos tercios del extremo 5' del genoma del virus (ORF1a y ORF1b) codifican dos poliproteínas superpuestas: pp1a y pp1b que serán digeridas por proteasas virales dando lugar a 16 proteínas no estructurales, que son esenciales para la replicación y transcripción viral. El virus presenta cuatro proteínas estructurales: la proteína de la espícula (S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N). Estas proteínas son codificadas a partir de cuatro ORFs situados en el extremo terminal 3' del genoma viral y son responsables del ensamblaje del virión, además de contribuir a la supresión de la respuesta inmune del huésped (14). Entre los genes estructurales, se encuentran las secuencias que codifican las 9 proteínas accesorias que juegan un rol importante en la patogénesis del virus.

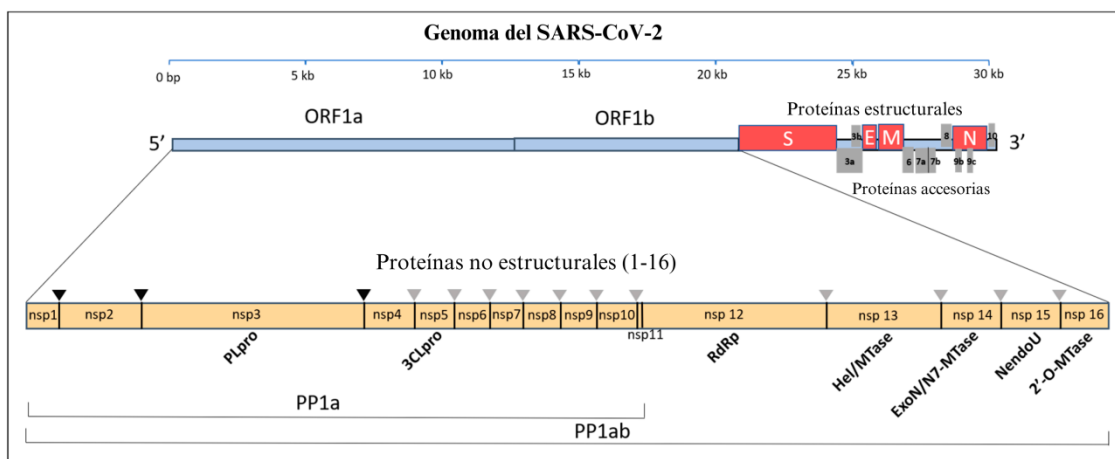


Figura I.1. Genoma del SARS-CoV-2.

2.2 Proteínas estructurales

La proteína S está formada por 1.273 aminoácidos que conforman un homotrímero que sobresale del virión, dándole el aspecto de corona al virus. Perteneciente a la familia de proteínas de membrana de tipo I y está anclada en la membrana viral, donde media la fusión de esta con la membrana de la célula huésped. La proteína S puede ser escindida en dos subunidades funcionales S1 y S2, por medio de proteasas ubicadas en la superficie de la célula huésped como la furina (15). Esta escisión mediada por furina resulta específica de SARS-CoV-2 respecto a otros virus relacionados del subgénero *Sarbecovirus*, como el SARS-CoV; ya que se genera a partir de un sitio de escisión polibásico, mediante una inserción de cuatro residuos de aminoácidos en la unión de las subunidades S1 y S2. El sitio de escisión polibásica puede reducir la estabilidad de la proteína S del SARS-CoV-2, facilitando la adaptación conformacional que se requiere para la unión del dominio de unión al receptor (RBD) a su receptor (16–18). Esto, unido a la amplia expresión de furina en los tejidos humanos, especialmente en el respiratorio, podría explicar una mayor transmisibilidad del SARS-CoV-2 en comparación con otros virus relacionados, como el SARS-CoV (16).

La subunidad S1 contiene el RBD, el cual puede adoptar dos estados conformacionales distintos: el estado cerrado “abajo” y el estado abierto “arriba” (19). En el estado cerrado los ángulos del RBD se conforman para proteger las regiones de unión al receptor, mientras que en el estado abierto, el RBD expone sus regiones

determinantes, mediante un movimiento conformacional tipo bisagra, para reconocer el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la membrana de la célula huésped. La subunidad S2 comprende cuatro regiones estructurales conservadas: un péptido de fusión, dos repeticiones de heptada (HR1 y HR2) y una región transmembrana, que median la fusión de las membranas virales y celulares tras los reordenamientos conformacionales (20–22).

La proteína S del SARS-CoV-2 constituye una diana para los estudios evolutivos y vacunales debido a su capacidad de conferir selectividad y susceptibilidad al huésped y, por consiguiente, infectividad viral. Además, al ser el principal objetivo del sistema inmunológico del huésped, la proteína de la espícula sufre una constante y rápida evolución molecular y presión selectiva (23–25). Es, por lo tanto, la fuente más relevante de antígenos para el desarrollo de vacunas.

La proteína E del SARS-CoV-2 va a ser la responsable de regular la lisis viral y la posterior liberación del genoma viral, una vez el virus ha ingresado en la célula huésped. Durante la replicación en la célula huésped, se localiza en las membranas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Además, esta proteína puede conducir a la activación del inflammasoma celular, mejorando así la respuesta antiviral del huésped (14,26).

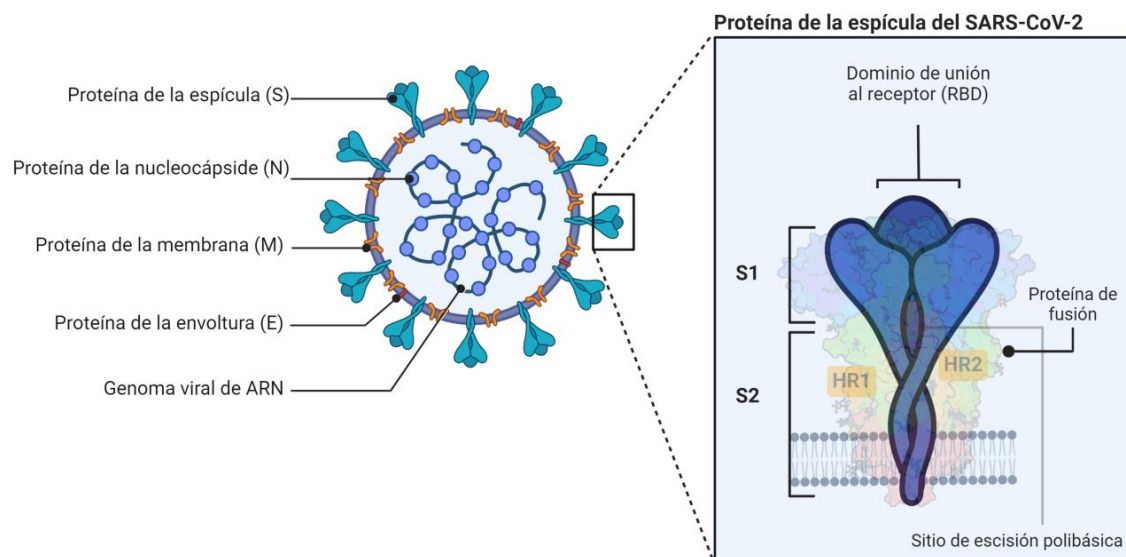


Figura I.2. Representación gráfica de las proteínas estructurales y subunidades de la proteína S del SARS-CoV-2.

La proteína M del virus es la glicoproteína estructural más abundante. Tiene tres dominios transmembranales y define la estructura de la envoltura viral, ayudando a mantener la integridad del virión. Interactúa con otras proteínas, como E y N, para coordinar el ensamblaje del virus en la célula huésped, formando nuevos viriones listos para infectar otras células (14,27).

La proteína N, con dos dominios estructurales conservados, es la única proteína estructural que se localiza dentro del virión. Va a ser la responsable de proteger el genoma del ARN viral empaquetándolo en un complejo de ribonucleoproteína, esencial para la posterior replicación y transcripción del virus. También actúa como antagonista del interferón (IFN) y como represor de ARN de interferencia, lo que podría ser beneficioso para la replicación del virus y su supervivencia. Es estable, poco propensa a la mutación y altamente inmunogénica (27,28).

3. Variantes del SARS-CoV-2

Como la mayoría de virus de ARN, el SARS-CoV-2 presenta una alta tasa de replicación. Esto, unido a la presión selectiva de la inmunidad y a la transmisión a nivel global del virus hace que se produzcan mutaciones que puedan conferir alguna ventaja selectiva. Las mutaciones suelen afectar principalmente a la proteína S del SARS-CoV-2, originando variantes que evaden mejor la respuesta inmunitaria, que son más transmisibles o que presentan mayor mortalidad (29,30). Como ejemplo, a partir de la aparición de la mutación D614G (en la región del RBD) en Europa en febrero de 2020, variantes con dicha mutación, relacionada con una mayor infectividad, comenzaron a ser más dominantes a nivel mundial (31).

Para simplificar la nomenclatura científica de los linajes del virus, la OMS recomendó utilizar letras del alfabeto griego para nombrar las variantes del SARS-CoV-2. Estas variantes se clasifican en: variante de interés (VOI), variante de preocupación (VOC) y variante bajo seguimiento (VUM) (32). La primera de ellas se define como el tipo de variante que se predice o se sabe que afecta características del virus, tales como la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad, el escape inmunológico o la dificultad diagnóstica o terapéutica; y que se identifica como causa de una transmisión

comunitaria significativa o con una alta prevalencia creciente en varios países, lo que sugiere un riesgo emergente para la salud pública (31).

Una VOC se define como una variante del SARS-CoV-2 que cumple con la condición de VOI y se ha demostrado que presenta una o más de las siguientes características: aumento de la transmisibilidad, aumento de la virulencia y/o disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de las vacunas, terapias y diagnósticos disponibles. La diferencia entre la VOC y la VOI radica en el impacto negativo confirmado en la salud pública que tiene la primera. Una variante que se sospeche que pueda representar un riesgo futuro debido a las características del virus, pero que el impacto fenotípico o epidemiológico no está aún claro, se denomina VUM. Hasta el momento de la realización de esta tesis, la OMS ha designado cinco VOCs: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) y ómicron ($\omicron$). En la tabla I.1 se resumen las principales características fenotípicas y epidemiológicas de cada variante de preocupación (33–39).

Tabla I.1. Características fenotípicas y epidemiológicas de las VOCs del SARS-CoV-2						
VOCs (OMS)	Linaje	País y fecha en las que se detectaron	Fecha en la que se definieron como VOCs	Características		
				T	I	G
Alfa	B.1.1.7	Reino Unido, septiembre 2020	Diciembre 2020	Sí	No	Sí
Beta	B.1.351	Sudáfrica, mayo 2020	Diciembre 2020	Sí	Sí	No
Gamma	P.1	Brasil, noviembre 2020	Enero 2021	Sí	Sí	Sí
Delta	B.1.617.2	India, octubre 2020	Mayo 2021	Sí	Sí	Sí
Ómicron	B.1.1.529	Sudáfrica/Botsuana, noviembre 2021	Noviembre 2021	Sí	Sí	No

G, impacto en la gravedad de la enfermedad; I, impacto en la evasión inmunológica/eficacia vacunal; T, impacto en la transmisibilidad del virus.

Desde principios de 2022 hasta el año 2023, se reportaron más de 500 millones de nuevos casos de COVID-19 a nivel mundial, registrándose más de 1,5 millones de muertes atribuibles en su mayoría a la variante Ómicron del virus. Aunque los síntomas de la infección producida por Ómicron son menos graves y la mortalidad es menor respecto a otras variantes, su alta transmisibilidad (hasta 9 veces más contagioso que la variante ancestral Wuhan-Hu-1) y su evasión a la respuesta de los anticuerpos neutralizantes, la hacen una variante altamente preocupante (40–43).

Se han identificado más de 60 mutaciones en el genoma de Ómicron respecto a la variante ancestral de Wuhan, la mayoría de ellas localizadas en el gen de la proteína S (44). La evolución rápida y significativa en las regiones genómicas de la variante Ómicron ha dado lugar a la formación de varias subvariantes, identificadas como BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5. La subvariante BA.1 fue la primera en detectarse a finales de 2021, presentando una transmisibilidad y una capacidad de evasión de la respuesta inmunitaria generada por infecciones previas o vacunas, mayor que su predecesora, Delta. BA.2 fue apodada como la variante “sigilosa” por su capacidad de evadir la detección de algunos métodos de PCR en ciertos genes, debido a la carencia de una delección en el gen S (45). Esta variante fue más contagiosa que BA.1 lo que impulsó nuevas olas de contagio a principios de 2022 (46). La propagación de la subvariante BA.3 fue muy limitada, restringiéndose principalmente a Sudáfrica. A partir del primer trimestre de 2022, aparecieron las subvariantes BA.4 y BA.5, las cuales comparten una gran cantidad de mutaciones en su secuencia genética. De todos los linajes Ómicron, BA.4 y BA.5 son los más transmisibles, además de ser los que mejor evaden la respuesta inmunitaria del huésped debido a las mutaciones L452Q, L452R y F486V presentes en estas nuevas subvariantes (45,47).

4. Infección viral y patogenia del SARS-CoV-2

4.1 Interacción con el receptor ACE2

Los coronavirus se unen a los receptores de las células huésped a partir de las proteínas de la espícula, que median la fusión de membranas y la entrada del virus en la célula. En el caso del SARS-CoV-2, el principal receptor celular es la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), al igual que sucede con el SARS-CoV (23,48).

En la subunidad S1 del SARS-CoV-2 se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD) cuya interacción con el ACE2 va a dar lugar a la escisión proteolítica en la subunidad S1 N-terminal y la subunidad S2 C-terminal. Esta escisión es catalizada por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) y puede ser activada por furina o proteasas similares a la furina. Para que se dé la interacción entre el RBD y su receptor, es necesario que el primero experimente un movimiento conformacional para exponer los determinantes de unión al receptor (estado abierto) (19). Así, tras la unión al

receptor, la escisión proteolítica activa a la S2 haciendo posible la fusión de las membranas del virus y la célula diana, seguida de la liberación del ARN viral al citoplasma de la célula (49).

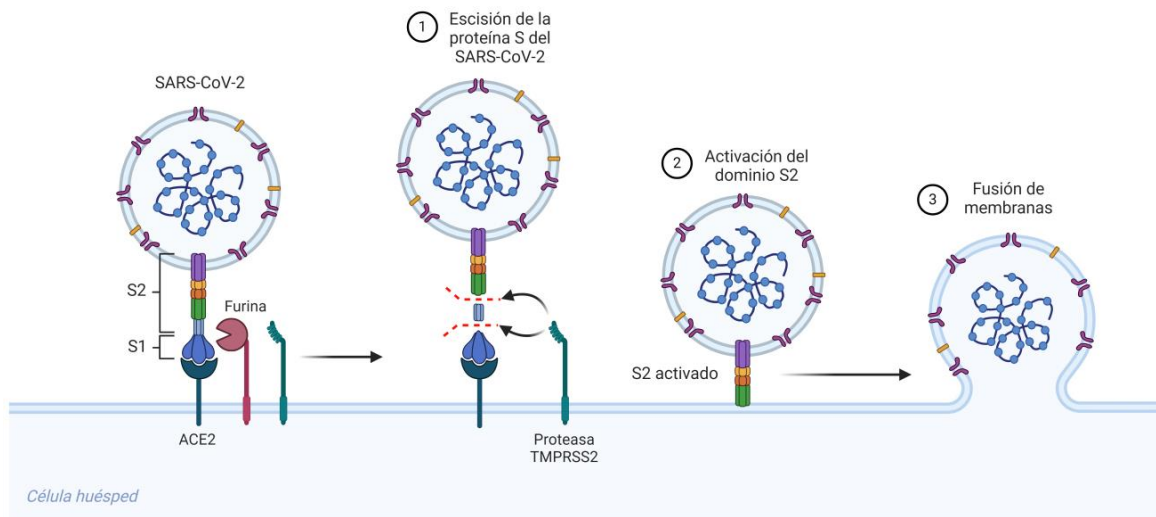


Figura I.3. Entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped mediante la unión de la proteína S al receptor ACE2.

4.2 Expresión génica viral y síntesis de ARN

La liberación del genoma del SARS-CoV-2 en el citoplasma de la célula permite la traducción de ORF1a y ORF1b, ambos localizados en el extremo 5' del genoma, para la producción de dos poliproteínas, pp1a y pp1b, respectivamente. 16 proteínas no estructurales van a ser resultado de la traducción de estas dos poliproteínas; entre ellas se encuentra la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y sus dos cofactores nsp7 y nsp8, que van a ser los encargados de la síntesis del ARN viral (50).

La replicación del ARN viral se inicia con la síntesis de copias de material genómico completo de sentido negativo que funcionan como plantillas para la generación del ARN de sentido positivo. Además de la generación de ARN completo, el proceso discontinuo de síntesis del material genético da lugar a porciones más cortas del genoma denominadas ARN subgenómico (ARNsg). La traducción del ARNsg da lugar a las proteínas estructurales (S, M, E y N) y a las accesorias (22,51).

4.3 Ensamblaje y salida del virus

Las proteínas estructurales ya generadas se insertan en el retículo endoplasmático (RE), desde donde viajan al compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC) para el ensamblaje de nuevos viriones. La proteína M es imprescindible para el ensamblaje, ya que interactúa con el resto de proteínas estructurales. La proteína de la nucleocápside se une al genoma de ARN viral para formar el complejo ARN-proteína que se empaquetará en el virión. Después del ensamblaje en el ERGIC, los viriones recién formados son transportados en vesículas hacia la membrana plasmática a través de la vía de secreción de la célula. Estas vesículas contienen las partículas virales y se mueven hacia la superficie de la célula a través de un proceso mediado por el aparato de Golgi. Una vez estos viriones alcanzan la membrana plasmática, se liberan al exterior mediante un proceso de exocitosis (14,52).

La patogenia de la infección por SARS-CoV-2 en humanos puede provocar desde síntomas leves hasta problemas respiratorios graves. El virus se une a las células del tracto respiratorio, donde comienza a replicarse hasta infectar las células alveolares. Esta rápida replicación puede activar una fuerte respuesta del sistema inmunológico. En algunos casos, esta respuesta excesiva, llamada 'tormenta de citocinas', provoca un síndrome de dificultad respiratoria aguda, lo que puede llevar a insuficiencia respiratoria, siendo esta la principal causa de muerte en pacientes con COVID-19 (53).

5. Características clínicas y epidemiológicas de la COVID-19

Los pacientes infectados por el SARS-CoV-2 presentan una amplia gama de manifestaciones clínicas, que van desde una enfermedad leve o asintomática hasta una afección moderada, pudiendo evolucionar a una enfermedad grave, de rápida progresión y fulminante. Los síntomas típicos de la COVID-19 son fiebre, tos seca, mialgias y fatiga y, en los casos más graves, disnea y neumonía pudiendo ocasionar insuficiencia respiratoria y la muerte. Otros síntomas menos frecuentes son la producción de esputo, dolor de cabeza, hemoptisis, diarrea, dolor de garganta, náuseas, vómitos y trastornos del olfato (hiposmia) y del gusto (hipogeusia) (54–56).

Todas las edades son susceptibles a la infección, sin embargo, las manifestaciones clínicas difieren con la edad. En general, los individuos mayores de 60 años con comorbilidades (hipertensión, obesidad, diabetes, cáncer, etc.) tienen mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad respiratoria grave que requiera hospitalización. Por otra parte, los niños y adultos jóvenes suelen presentar infecciones asintomáticas o leves, aunque no están exentos de sufrir un episodio grave relacionado con la COVID-19 (57–59). El período de incubación del virus es de unos 5 días y la enfermedad grave suele desarrollarse unos 8 días después del inicio de los síntomas (57). En general, la enfermedad suele autolimitarse, pero en un pequeño porcentaje de infectados por el SARS-CoV-2, pueden persistir los síntomas durante semanas, meses e incluso años; lo que se conoce como 'long COVID' (60).

La transmisión temprana del SARS-CoV-2 en Wuhan en diciembre de 2019 se vinculó inicialmente al mercado mayorista de mariscos de Huanan, sugiriéndose así, como la fuente del brote. Posteriormente, se confirmó la transmisibilidad de persona a persona lo que contribuyó a la propagación rápida del virus (1,4–6). Se ha estimado un número básico de reproducción (R_0) de 2,5 (que oscila entre 1,8 y 3,6) para el SARS-CoV-2, aunque debido a la dificultad de detección que presentan las infecciones asintomáticas, este número podría ser mayor. En general, se acepta que el SARS-CoV-2 es más transmisible que el SARS-CoV y el MERS-CoV (61). La transmisión suele darse por contacto con las secreciones nasales, orales y de la mucosa ocular del paciente infectado, así como la transmisión directa por inhalación de gotitas cuando el paciente tose o estornuda (4,62). Varios estudios han confirmado la presencia de cargas virales altas en el tracto respiratorio superior de pacientes sintomáticos o asintomáticos, sin diferencias significativas entre ellos, lo que convierte a los individuos que no presentan síntomas en reservorios perfectos y contribuye a la propagación del virus, suponiendo un desafío para el control de la infección por SARS-CoV-2 (63,64).

6. Diagnóstico

6.1 Diagnóstico mediante la detección de ácidos nucleicos

Para controlar la propagación del SARS-CoV-2 es imprescindible realizar un diagnóstico temprano. La detección del ARN del virus en muestras nasofaríngeas y

orofaríngeas mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) sigue siendo el “gold standard” para el diagnóstico de la infección activa. Los kits comercializados suelen tener como diana a los genes S, N, E u ORF1ab (incluido RdRp) (10,65–67). Es importante tener en cuenta el factor del tiempo en el diagnóstico mediante PCR debido a que la carga viral tiende a ir disminuyendo a lo largo de las semanas tras el inicio de los síntomas (68).

6.2 Diagnóstico radiológico

La tomografía computarizada de tórax, también puede servir para complementar el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Las opacidades en vidrio esmerilado multilobares bilaterales con una distribución periférica o posterior, suelen ser características en la infección respiratoria por el virus (69).

6.3 Diagnóstico mediante la detección de antígenos

Las pruebas de antígenos, a diferencia de los métodos basados en PCR, detectan componentes virales o el virus directamente sin necesidad de amplificación térmica. Los inmunoensayos de flujo lateral, a partir de muestras tomadas de la nasofaringe, son capaces de detectar la proteína N del SARS-CoV-2, ofreciendo un resultado claro en cuestión de minutos. A pesar de que las pruebas de antígenos tienen menor sensibilidad en comparación con la PCR y dependen de la cantidad de virus presente, su rapidez, bajo costo y facilidad de uso las convierten en una opción viable para el diagnóstico en el lugar de asistencia al paciente (“point-of-care-testing”). (70,71)

6.4 Diagnóstico serológico

Los métodos de diagnóstico serológico tienen como objetivo la detección de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 en muestras de suero. Un anticuerpo es una proteína producida por el sistema inmunitario en respuesta a un antígeno. Existen cinco clases de anticuerpos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, aunque el diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas se centra principalmente en la detección de IgM e IgG.

En el caso del SARS-CoV-2 existen numerosas técnicas comercializadas para la detección y cuantificación de anticuerpos. Estas varían en el diseño, características de rendimiento, las clases de inmunoglobulina detectadas y el antígeno del SARS-CoV-2 al que se dirigen (S o N) (72,73). Las técnicas dirigidas frente al antígeno N detectan

anticuerpos específicos tras la infección natural por SARS-CoV-2, mientras que aquellas que tienen a la proteína S como diana, son útiles para medir la respuesta inmunitaria tras la vacunación o infección natural (74). Una de las plataformas más utilizadas en el diagnóstico serológico es el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), que presenta una sensibilidad y especificidad mayores que el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Mientras que el ELISA se basa en una reacción enzimática en la que una enzima unida al anticuerpo o antígeno convierte un sustrato en un producto detectable, como un cambio de color; en ECLIA, los anticuerpos son marcados con un reactivo electroquimioluminiscente que produce una señal luminosa cuando se produce la reacción antígeno-anticuerpo. Cada ECLIA tiene características específicas, como el tipo de inmunoensayo, el rango de medición y el tipo de antígeno utilizado. La estandarización por parte de la OMS en BAU/mL permite una mayor comparabilidad entre los inmunoensayos.

Existe una diferencia interindividual significativa en los niveles y la aparición cronológica de los anticuerpos en los pacientes con COVID-19, pero se ha observado una mediana de seroconversión de aproximadamente dos semanas, donde IgM e IgG suelen aparecer de forma casi simultánea (10-13 y 12-14 días, respectivamente). Además, se han descrito niveles máximos para IgM e IgG en la semana 2-3 y 3-6, respectivamente, tras el inicio de los síntomas (75–77) que van disminuyendo para desaparecer, en el caso de IgM alrededor de la semana 6-7, mientras que se siguen manteniendo niveles altos de IgG (75,78).

7. Respuesta inmunitaria a la infección por SARS-CoV-2

Se ha demostrado que la rápida y descontrolada replicación viral del SARS-CoV-2 puede evadir la activación del sistema inmunitario innato del huésped en las primeras etapas de la infección. Esto resulta en una producción desmesurada de interferón en los pulmones que podría contribuir a la tormenta de citoquinas y al daño tisular que caracteriza los casos graves de COVID-19 (49).

La respuesta celular frente a la infección se inicia cuando los PAMPs virales (patrones moleculares asociados a patógenos) son reconocidos por los PRRs (receptores de reconocimiento de patrones). Esto activa una cascada de señales que genera una

producción elevada de interferones tipo I y III (IFN-I-III) y una respuesta inflamatoria generalizada. Estos interferones y sus señales secundarias son esenciales para controlar la infección en sus fases iniciales; sin embargo, el SARS-CoV-2 posee mecanismos que bloquean la activación y la función antiviral de los mismos (49,79).

Las respuestas de células T CD4⁺ (colaboradoras) y CD8⁺ (citotóxicas), y de células B productoras de anticuerpos, juegan un papel imprescindible en la protección frente la infección y gravedad de la enfermedad (80,81). Numerosos estudios han respaldado la utilidad de los anticuerpos dirigidos contra la proteína S del SARS-CoV-2, en particular aquellos que muestran actividad neutralizante obtenida tras la vacunación o infección natural (82–84). Los anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 (NtAb) son inmunoglobulinas altamente específicas dirigidas principalmente a la región RBD de la proteína S del virus, aunque algunas pueden reconocer el dominio N-terminal de la subunidad S1 (NTD). Su función es la de bloquear la interacción virus-receptor celular y, por lo tanto, la entrada viral en la célula huésped (85). Existen diversos ensayos de neutralización de virus, aunque el Ensayo de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT) sigue siendo el “gold standard” debido a su alta sensibilidad, especificidad y capacidad para medir la neutralización directa del virus infeccioso. Sin embargo, este método, además de ser laborioso y requerir varios días para su realización, necesita un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3), lo que lo hace inviable para el uso rutinario en los servicios de microbiología.

Por otro lado, a diferencia de los anticuerpos dirigidos contra la nucleocápside del SARS-CoV-2, que no son funcionalmente relevantes para conferir protección o inmunidad frente a la infección, es probable que, al menos, una proporción de los anticuerpos dirigidos contra la proteína S desempeñen la función de anticuerpos neutralizantes.

Por ello, es fundamental que los inmunoensayos que detectan y cuantifican anticuerpos dirigidos a la proteína S del SARS-CoV-2, aplicables en la actividad diaria de un laboratorio de microbiología, presenten una alta correlación con los ensayos de neutralización. En este contexto, diversos estudios han evaluado la relación entre los resultados de distintos ensayos de detección de anticuerpos contra la proteína S del

SARS-CoV-2 y los ensayos de neutralización del virus, mostrando altos grados de correlación entre ellos (ρ : 0,72-0,94) (74,86,87).

La identificación de un correlato de protección (CoP) para enfermedades prevenibles por vacunación es de gran importancia tanto para el paciente individual como para la salud pública. A nivel individual, los médicos pueden utilizar esta información para evaluar el estado inmunológico de una persona y decidir si es necesaria la vacunación o una dosis de refuerzo, especialmente en aquellos que tienen mayor riesgo de contraer la enfermedad. Desde la perspectiva de salud pública, contar con un CoP y un umbral de protección definido permite medir de manera más precisa la inmunidad en la población, lo que facilita la planificación y evaluación de las estrategias de vacunación (86). Aunque los NtAb pueden servir como CoP, aun no se ha establecido un umbral estandarizado que proteja frente a la infección por el SARS-CoV-2. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que niveles elevados de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, inducidos por la infección o la vacunación, se correlacionan con un menor riesgo de enfermedad sintomática posterior y, por consiguiente, con un menor riesgo de COVID-19 grave (82,87–89).

La respuesta y la cinética de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 generados únicamente por la infección previa pueden variar drásticamente como resultado de múltiples factores, entre ellos la gravedad de la enfermedad, la edad, el estado inmunológico y la metodología del ensayo (90–92). Sin embargo, varios estudios demuestran que la inmunidad híbrida, es decir, aquella que resulta de la combinación entre infección y vacunación, es más robusta y eficaz, generando mayores niveles de NtAb y perdurando más a lo largo del tiempo (86,93). No obstante, se desconoce el tiempo que puede durar la protección contra la infección o la enfermedad, suponiéndose variable según la variante del virus implicada.

8. Vacunas frente a la COVID-19

La necesidad urgente de desarrollar vacunas contra la COVID-19 durante el transcurso de la pandemia ha sido esencial para prevenir infecciones, controlar la propagación de la enfermedad y limitar su recurrencia. Además, la vacunación contra el SARS-CoV-2 ha demostrado ser muy eficaz en la prevención de las complicaciones

derivadas de la COVID-19 causadas por las variantes que suceden a Wuhan-Hu-1 y las subvariantes emergentes de interés (94,95). La vacunación genera respuestas fuertes en el centro germinal, lo que da lugar a la producción de células B maduras, como las células plasmáticas de larga duración y las células B de memoria. Estas células producen anticuerpos específicos y de alta afinidad contra el antígeno del virus (96,97).

El desarrollo de vacunas contra la COVID-19 se basa principalmente en siete plataformas, que pueden clasificarse en tres tipos diferentes según la clase de antígeno empleado (98). El primer tipo se basa en la proteína producida *in vitro*, e incluye las vacunas VLP, que contienen partículas virales sin ácido nucleico; y las vacunas de subunidades proteicas, que contienen la proteína S o el RBD expresados *in vitro*. Las vacunas pertenecientes al segundo tipo se basan en el gen del antígeno expresado *in vivo*, y estas son las vacunas de vector viral, que utilizan virus (normalmente adenovirus) modificados con defectos de replicación que llevan el ARNm de la proteína S o el RBD; y las vacunas de ARNm o ADN con secuencias de ARNm/ADN de la proteína S o el RBD. El tercer tipo se basa en el virus al completo, e incluye las vacunas de virus inactivados y las de virus atenuados (99). Estas vacunas pueden inducir anticuerpos neutralizantes para proteger a los receptores de la invasión viral. Además, varias de ellas también producen respuestas de células Th1, generándose células T y B de memoria específicas de antígeno, lo que es importante para la protección a largo plazo (100,101). En la actualidad, las principales vacunas comercializadas se basan en el ARN mensajero, vectores adenovirales, virus inactivados y subunidades proteicas, cuyo mecanismo de acción viene representado de forma gráfica en la figura I.4.

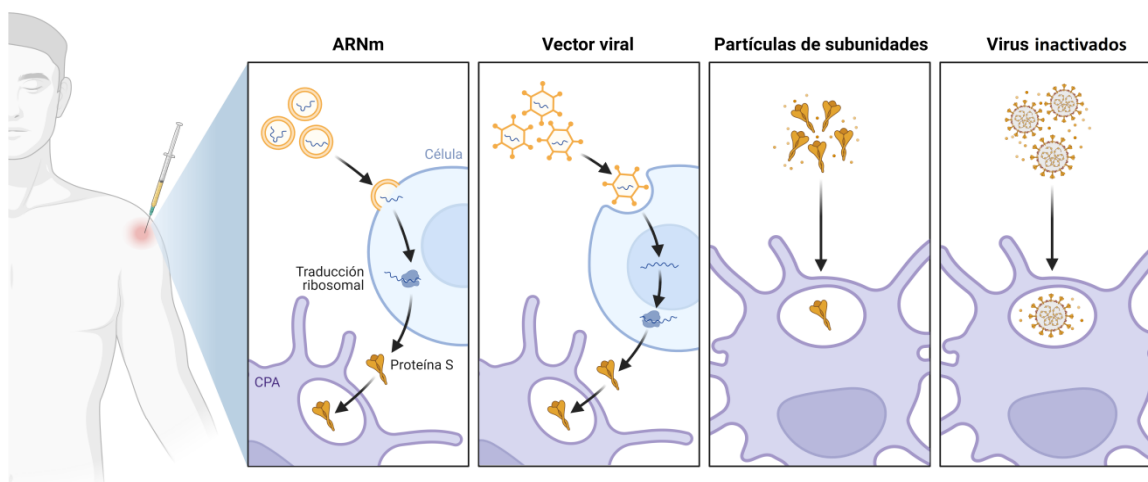


Figura I.4. Representación gráfica de los mecanismos de acción de las principales vacunas comercializadas contra la COVID-19.

8.1 Vacunas de ARNm

Las vacunas de ARNm se basan en ARNm encapsulado por vectores (generalmente nanopartículas lipídicas) que lo protegen y facilitan su entrada en las células una vez que la vacuna es inyectada. Una vez dentro de la célula, el ARNm es traducido en los ribosomas de la célula huésped, dando lugar a la formación y posterior exposición de la proteína S del SARS-CoV-2. La OMS ha aprobado dos tipos de vacuna de ARNm: la vacuna BNT162b2 (Comirnaty) de Pfizer/BioNTech y la vacuna mRNA-1273 (Spikevax) de Moderna/NIAID. Las dos presentan una eficacia mayor al 90% frente a la COVID-19 sintomática, aunque esta puede disminuir con las subvariantes emergentes. Se ha demostrado que las vacunas de ARNm pueden inducir fuertes respuestas de células Th1 y de células B en el centro germinal, lo que da lugar a células plasmáticas de larga duración y células B de memoria con la consecuente producción de anticuerpos neutralizantes (102,103). La miocarditis ha sido descrita por varios estudios como el efecto adverso más importante de este tipo de vacunas, aunque suele cursar de forma leve y a resolverse sin complicaciones graves (104,105).

8.2 Vacunas basadas en vectores virales

Las vacunas de vectores virales se basan en virus modificados con replicación atenuada que transportan el material genético correspondiente a proteínas o polipéptidos virales (106). Los vectores más utilizados son los adenovirus, seguidos del virus de la estomatitis vesicular, que al ingresar a la célula huésped liberan la información genética para producir la proteína S completa. En la actualidad, las principales vacunas comercializadas de este tipo son: la vacuna AZD1222 (Vaxzevria) de la Universidad de Oxford/AstraZeneca, la vacuna Ad26.COV2.S (Jcovden) de Janssen/Johnson & Johnson y la vacuna Sputnik V de Gamaleya. Al igual que en el caso de las vacunas de ARNm, las vacunas basadas en vectores virales también pueden inducir respuestas de células Th1. Entre las complicaciones que pueden mostrar se destaca la trombocitopenia, por lo que es probable que en ciertos pacientes sea necesario medir niveles de plaquetas en sangre (107). La vacuna de Janssen es la única cuya pauta vacunal completa comprende una única dosis, presentando un 66% de eficacia frente a la enfermedad sintomática, algo menor que el 81% de AstraZeneca o el 92% de la vacuna Sputnik V (108).

8.3 Vacunas de subunidades proteicas

Las vacunas de subunidades proteicas se basan en proteínas o péptidos virales formados utilizando diversos sistemas de expresión celular, como bacterias, levaduras, insectos o células de mamíferos (98,106). Este tipo de vacunas se pueden clasificar en vacunas recombinantes de proteína S completa o de RBD. NVX-CoV-2373 (Nuvaxovid) de Novavax/CEPI presenta la proteína S de longitud completa con una conformación de prefusión, expresada en células de insecto (99). Esta vacuna, puede inducir un mayor título de NtAb que las vacunas de vector viral o virus atenuados y presenta una eficacia de más del 90%. Debido al alto peso molecular de la proteína S su capacidad de expresión es baja en comparación con el RBD, aunque este último carece de otros epítomos inmunes presentes en la proteína de la espícula (108,109).

8.4 Vacunas de virus inactivados

Las vacunas de virus inactivados se producen tras la inactivación de virus cultivados *in vitro* con reactivos químicos. Al utilizar el virus completo como inmunógeno, se genera una gama más amplia de anticuerpos dirigidos frente a una mayor variedad de epítomos (98). Sin embargo, la necesidad de este tipo de vacunas de realizarse en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 o superior, limita su producción. Actualmente, están comercializadas 3 tipos de vacunas de virus atenuados: la vacuna BBIBP-CorV de Sinopharm, la vacuna CoronaVac de Sinovac Biotech y la vacuna BBV152 (Covaxin) de Bharat Biotech; con un 78%, 51% y 78% de eficacia respectivamente frente a la COVID-19 sintomática (108,110).

Actualmente, las recomendaciones de vacunación contra la COVID-19 del Ministerio de Sanidad de España comprenden a: personas mayores de 60 años y aquellas que viven en residencias o centros de atención de larga estancia; embarazadas en cualquier trimestre y mujeres en el puerperio; niños de 6 meses a 12 años con condiciones de alto riesgo, como inmunodeficiencias, trasplantes, enfermedades cardíacas o respiratorias graves, y otras patologías crónicas; adultos y adolescentes mayores de 12 años con comorbilidades; y trabajadores de la salud o aquellos que convivan con personas de alto riesgo (111).

9. Tratamiento frente a la COVID-19

Existen dos grandes categorías en el tratamiento contra la COVID-19, cuyo potencial terapéutico depende en gran medida de la fase de la enfermedad: los agentes antivirales y las terapias dirigidas al huésped.

Entre los agentes antivirales destacan los inhibidores de la polimerasa, los inhibidores de la proteasa, los inhibidores de nucleósidos y nucleótidos de la transcriptasa inversa, los inhibidores de la entrada y otros antivirales. Uno de los antivirales más utilizados durante la pandemia ha sido el remdesivir, un profármaco de nucleótidos que actúa inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa. Sin embargo, su eficacia clínica sigue siendo controvertida (112). Paxlovid, una combinación de nirmatrelovir y ritonavir, actúa inhibiendo la proteasa del virus. Este fármaco está indicado en la fase inicial de la enfermedad (con un máximo de 5 días desde el inicio de los síntomas) para aquellos pacientes con un riesgo alto de desarrollar una COVID-19 grave.

En el caso de que la enfermedad progrese a la fase pulmonar o moderada, el tratamiento se enfoca en reducir la inflamación del paciente mediante el uso de corticosteroides y en mejorar la oxigenación. Puede ser necesario el empleo de anticuerpos monoclonales, como el tocilizumab (anti-IL6R), o de inhibidores de la JAK, como el baricitinib, para disminuir la respuesta inflamatoria en forma de “tormenta de citoquinas” (113).

El 25 de marzo de 2022, la Comisión Europea autorizó la comercialización de Evusheld (AZD7442), una combinación de los anticuerpos monoclonales cilgavimab y tixagevimab, para la profilaxis pre-exposición de la COVID-19. Este tratamiento está indicado para personas con alto grado de inmunosupresión que no responden adecuadamente a la vacunación y para alérgicos a los componentes de la vacuna, que no han sido infectados previamente por el SARS-CoV-2, cuya infección por el virus podría resultar en una COVID-19 grave. Hasta ahora, se ha establecido un umbral de anticuerpos frente a la proteína S de 260 BAU/ml para diferenciar entre una respuesta adecuada o inadecuada a la vacunación. Sin embargo, este valor se estableció a partir de un estudio realizado en el contexto de la cepa original de Wuhan, por lo que podría no ser plenamente aplicable a las variantes actuales. Por todo ello, además de valorar la

cuantificación de los títulos de anticuerpos frente a la proteína S, se propone tener en cuenta el grado de inmunosupresión y el riesgo individual de infección del paciente. Según estudios iniciales, Evusheld podría reducir el riesgo de sufrir una enfermedad sintomática por SARS-CoV-2 hasta en un 77% (114,115).

Hipótesis

II. HIPÓTESIS

La respuesta de anticuerpos funcionales resultante de la vacunación o infección por SARS-CoV-2 podría ser mayor frente a la cepa de Wuhan que contra las nuevas variantes de Ómicron. Además, los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos frente a la proteína S podrían mostrar discrepancias en los resultados analíticos según la variante del virus estudiada y del estado de vacunación e infección de los individuos.

Objetivos

III. OBJETIVOS

Los estudios de seroprevalencia realizados previamente a la aparición de la variante Ómicron en España aportaron información valiosa sobre la magnitud de la transmisión del virus en el pasado y fueron clave para comprender la evolución de la pandemia y orientar la toma de decisiones en salud pública (116–118). En el contexto actual, con la mayoría de la población vacunada, resulta relevante evaluar la respuesta inmune, tanto humoral como celular, frente a la subvariante Ómicron BA.1 en la Comunidad Valenciana, con el objetivo de obtener resultados aplicables al conjunto del territorio español. Además, la inmunidad humoral resultante de la combinación de vacunación e infección por el SARS-CoV-2 (inmunidad híbrida) se presupone más fuerte y robusta que la generada mediante vacunación o infección por sí solas (86,119–121). Sin embargo, la aparición de subvariantes con mayor capacidad de escape a los anticuerpos neutralizantes (NtAb) hace necesario validar esta afirmación. Son numerosos los estudios que respaldan el papel crucial de los anticuerpos que se unen a la proteína S del SARS-CoV-2, especialmente los NtAb, en la protección contra la infección y el desarrollo de la COVID-19 (82–84,87,122). La detección y cuantificación de estos anticuerpos son, por lo tanto, esenciales para evaluar el estado inmunitario frente al SARS-CoV-2 y pueden ayudar a determinar la necesidad de una dosis de vacuna de refuerzo o anticuerpos monoclonales en poblaciones vulnerables (114). Se han comercializado numerosos inmunoensayos que detectan y cuantifican anticuerpos dirigidos frente a la espícula del SARS-CoV-2 y que difieren en diseño analítico, clase de inmunoglobulina medida y naturaleza del antígeno; lo que puede generar una diferencia notable a nivel de rendimiento analítico. Además, la correlación con los NtAb del virus también puede diferir dependiendo del inmunoensayo utilizado (123,124). Estas diferencias, sumadas al estado variable de vacunación e infección por el virus en la población, pueden generar resultados discordantes tanto cualitativos como cuantitativos. Por ello, es fundamental evaluar el rendimiento de estas plataformas serológicas. Por otro lado, La medición de los NtAb utilizando virus o pseudotipos de SARS-CoV-2 puede resultar muy laboriosa y poco factible para la gran mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. La razonable correlación entre los anti-RBD y los NtAb hace posible la elaboración de un modelo que pueda predecir niveles de anti-RBD asociados con la presencia de actividad neutralizante.

En el contexto anterior, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la respuesta inmune de la población general de la Comunidad Valenciana tras la aparición de la subvariante Ómicron BA.1

- a) Determinar la incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2.
- b) Analizar el impacto de la vacunación contra la COVID-19 y de la infección natural en el estado inmunitario humoral y celular de los participantes.

2. Comparar el rendimiento analítico de dos inmunoensayos utilizados para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos frente a la proteína S del SARS-CoV-2.

- a) Evaluar la concordancia cualitativa y cuantitativa entre ambos inmunoensayos según el estado de vacunación e infección de los participantes.
- b) Analizar la correlación entre los anticuerpos cuantificados por ambos inmunoensayos y los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a distintas (sub)variantes del virus.

3. Analizar la actividad neutralizante de los sueros de individuos vacunados frente a nuevas subvariantes del SARS-CoV-2.

- a) Comparar las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra las subvariantes Ómicron BA.4/5 y la variante original Wuhan-Hu-1 en individuos vacunados con y sin infección previa por SARS-CoV-2.
- b) Analizar si la inmunidad híbrida genera una respuesta inmune más robusta frente a Ómicron BA.4/5 que la generada por la vacunación por sí sola.

4. Elaborar un modelo para predecir la actividad neutralizante sérica frente a distintas subvariantes del virus en la población general a partir de parámetros simples.

- a) Establecer un umbral de anticuerpos totales anti-RBD capaz de discriminar eficazmente entre individuos con actividad neutralizante detectable contra las subvariantes BA.2 y BA.4/5.
- b) Desarrollar un modelo de aprendizaje automático y evaluar su precisión y aplicabilidad en cohortes externas.

Metodología

IV. METODOLOGÍA

1. Población y diseño del estudio

Los diferentes estudios presentes en esta tesis doctoral incluyeron a sujetos de la población general pertenecientes a las distintas zonas de atención primaria (ZAP) del Sistema Valenciano de Salud (SVS), exceptuando al segundo trabajo en el que también se incluyeron pacientes ingresados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). Tanto el primer trabajo como la cohorte de entrenamiento del último, comparten la misma población de estudio. Así mismo ocurre con la tercera publicación y la cohorte de validación del cuarto artículo, cuyos integrantes se seleccionaron de un mismo estudio de seroprevalencia.

El primero de ellos (Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022) corresponde a un estudio transversal prospectivo de ámbito regional llevado a cabo en abril de 2022, después de que la variante Ómicron BA.1 se hubiera extendido ampliamente dentro de la Comunidad Valenciana (CV). Se calculó un tamaño muestral de 998 participantes para alcanzar una precisión de $\pm 1\%$ suponiendo una prevalencia de anticuerpos anti-RBD en la población general del 95% y un nivel de confianza del 90%. De los 1043 participantes elegibles, se incluyeron finalmente 931 en el estudio, excluyéndose a los restantes por falta de asistencia o por una cantidad insuficiente de suero para el análisis. De las 241 ZAP que conforman el Sistema Valenciano de Salud, se excluyeron 46 con una población menor a los 8.000 habitantes (principalmente áreas remotas donde la extracción de sangre no se realiza a diario) y de las 195 restantes se seleccionaron 100 centros al azar para simplificar la logística de transporte de las muestras. A cada ZAP se le asignó una fecha concreta en la que recoger entre 8 y 17 muestras en función del tamaño de la población atendida estratificada por edad y sexo.

Un total de 797 individuos pertenecientes al Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa se incluyeron en el segundo trabajo (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022), de carácter retrospectivo, entre enero de 2021 y abril de 2022. Para el tercer y cuarto artículo (Camacho J, Zulaica J. J. Infect. 2023; Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023) se seleccionaron 130 y 787 participantes de un estudio de seroprevalencia

(análogo al primer artículo) que tuvo lugar en octubre de 2022. Además, la base de datos de la cohorte de entrenamiento del *Machine Learning* (ML) de este último estudio se construyó en el marco del primer trabajo ya mencionado.

El número concreto de sujetos incluidos en cada trabajo y las fechas en las que se recibieron las muestras en el laboratorio del Servicio de Microbiología del HCUV se resumen en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Características metodológicas: tipo de estudio, número de sujetos incluidos, número de muestras de suero y fecha de recepción de muestras.

Estudio	Tipo	Nº de sujetos	Nº de muestras de suero	Fecha recepción de muestras	de
Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022	Prospectivo	931	931	Abril 2022	
Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022	Retrospectivo	797	1176	Enero 2021 – Abril 2022	–
Camacho J, Zulaica J. J Infect. 2023	Retrospectivo	130	130	Octubre 2022	
Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023	Retrospectivo	931 y 787	931 y 787	Abril 2022 y Octubre 2022	y

La totalidad de las características clínicas y demográficas de los integrantes que conforman los trabajos se encuentran detalladas en las tablas correspondientes a cada una de las publicaciones.

2. Muestras

2.1 Muestras de suero

Se recogió una muestra de sangre por paciente en tubos con gel separador (BD Vacutainer SST II Advance) que fueron posteriormente centrifugados a 3.500 rpm durante 10 minutos para la obtención del suero y su procesamiento en las primeras 24 horas. Los sueros se conservaron a 4°C hasta la realización de las pruebas. A diferencia de los demás artículos, en el segundo (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022) se utilizaron muestras de pacientes ingresados en el HCUV (algunos con varias muestras

analizadas) en los que las determinaciones serológicas se realizaron a petición del médico o de las autoridades de salud pública.

2.2 Muestras de sangre total

Para el estudio de seroprevalencia que tuvo lugar en abril de 2022 (Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022) se recogió un tubo adicional de 5 cc con heparina sódica (BD Vacutainer) de aquellos pacientes a quienes se les extrajo sangre por prescripción médica, independientemente del motivo, y que cumplían con los criterios de selección de edad y sexo asignados a cada centro.

3. Definiciones

Los participantes se agruparon en las siguientes categorías en función de si habían presentado una infección previa por SARS-CoV-2 y el estado de vacunación frente a la COVID-19:

1. Vacunados con infección previa (Vac-Ex): individuos vacunados con un resultado positivo en una prueba diagnóstica de infección activa (PDIA), ya sea mediante un test de detección de antígenos dirigidos a la proteína N o RT-PCR, y/o con evidencia serológica de infección previa (presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 IgG de nucleocápside). También se incluyó como criterio de infección previa la presencia de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 S RBD en personas no vacunadas.

2. Vacunados/naïve (Vac-N): sujetos vacunados sin registro o evidencia serológica de infección previa por SARS-CoV-2.

3. No vacunados con infección previa (Unvac-Ex): población no vacunada con antecedentes o pruebas serológicas de infección previa por SARS-CoV-2.

4. No vacunados/naïve (Unvac-N): población no vacunada sin antecedentes o pruebas serológicas de infección por SARS-CoV-2.

Para determinar los antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2 se consultó el registro de la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA) mientras que el estado de vacunación de los participantes se obtuvo del registro de vacunación de la CV. Para el cuarto artículo (Camacho J, Albert

E. J Med Virol. 2023) se hizo una subclasificación de los sujetos en función de la pauta de vacunación que habían recibido, para ello se estratificaron en: 1) no vacunados, 2) vacunados sin dosis de refuerzo (incluyendo a los participantes con calendarios de vacunación completos e incompletos), 3) vacunados completamente con dosis de refuerzo homóloga, 4) vacunados completamente con dosis de refuerzo heteróloga. Se entiende como vacunación completa aquella en la que se han administrado dos dosis de las vacunas Comirnaty (Pfizer/BioNTech), Spikevax (Moderna), Vaxzevria (AstraZeneca), CoronaVac (Sinovac) o Sputnik V (Gamaleya); o una de Jcovden (Janssen) (125).

4. Ensayos inmunológicos

4.1 Inmunoanálisis para la determinación cuantitativa de anticuerpos contra la proteína S de SARS-CoV-2

4.1.1 Los anticuerpos totales contra el RBD del SARS-CoV-2 en suero se cuantificaron con el ensayo de Elecsys[®] Anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) en el inmunoanalizador Cobas e801. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia en sándwich (ECLIA) detecta anticuerpos totales (IgG, IgM, IgA) dirigidos contra el RBD de la proteína S de SARS-CoV-2. Según el fabricante, el rango de cuantificación es de 0,4 a 25.000 BAU/ml (dilución 1/100) y se utiliza 0,8 BAU/ml como punto de corte de positividad del ensayo. El ensayo muestra linealidad hasta 50.000 BAU/ml con una dilución 1/200.

4.1.2 Para el segundo artículo (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022) se empleó, además, un inmunoensayo de quimioluminiscencia indirecto, el LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG (DiaSorin S.p.A), que detecta anticuerpos IgG contra la proteína S en su conformación trimérica. Este test se realiza a partir de una fase sólida constituida por partículas magnéticas recubiertas con una proteína S recombinante de SARS-CoV-2 y un reactivo conjugado que contiene un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humano unido a un derivado de isoluminol. La prueba se realiza en el inmunoanalizador automatizado LIAISON[®] XL y el rango de cuantificación de esta técnica es de 4,81 a 2.080 BAU/ml, mientras que el punto de corte de positividad se

establece en 33,8 BAU/ml. Según el fabricante, el ensayo mantiene linealidad hasta 41.600 BAU/ml con una dilución 1/20.

Cabe destacar que en el momento del estudio ambas técnicas estaban calibradas según el estándar internacional de la OMS (IS; NIBSC 20/136). Los sueros que arrojaron valores de BAU/ml por encima del límite de cuantificación de ambas técnicas se diluyeron apropiadamente y se volvieron a analizar. Ambos análisis se realizaron en el Servicio de Microbiología del HCUV en las 24 horas siguientes a la recogida de las muestras.

4.2 Inmunoanálisis para la determinación cualitativa de anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2

Los anticuerpos IgG reactivos contra la nucleocápside (N) se midieron utilizando el ensayo Elecsys[®] Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) en el inmunoanalizador Cobas e801. Este, al igual que los anteriores ya comentados, también se trata de un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia que utiliza una proteína recombinante que representa el antígeno N de SARS-CoV-2 en un formato de ensayo en sándwich de doble antígeno, que favorece la detección de anticuerpos de alta afinidad contra el virus. El principio del test viene representado en la Figura IV.1. Un índice de corte (COI) mayor o igual de 1.0 se consideró reactivo.

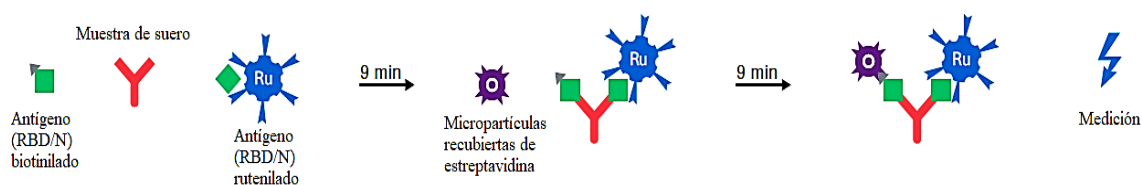


Figura IV.1. Principio del ensayo de quimioluminiscencia de Roche para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra la proteína S y N de SARS-CoV-2.

4.3 Ensayo de neutralización del virus

Los anticuerpos neutralizantes (NtAb), dirigidos contra la proteína S, se analizaron utilizando un virus de la estomatitis vesicular (VSV) pseudotipado con la espícula de la variante o subvariante de estudio, el cual expresaba la proteína

fluorescente verde (GFP). El análisis siguió un protocolo previamente publicado, adaptado con varias modificaciones (126,127).

En primer lugar, para mejorar la eficiencia de la pseudotipificación, se eliminaron 19 aminoácidos de la región C-terminal mediante PCR en un plásmido que codifica el gen de la espícula del virus de Wuhan, con codones optimizados (pCG1-Wuhan-S). De manera similar, se modificaron plásmidos disponibles comercialmente que codifican genes de la espícula BA.1 (Genscript) y BA.2 (InvivoGen) con codones optimizados para eliminar los 19 y 18 aminoácidos terminales, respectivamente. El marco de lectura abierto (ORF) se transfirió al plásmido pCG1 usando el kit de ensamblaje de ADN NEBuilder HiFi (NEBRASKA). Para el tercer y cuarto artículo (Camacho J, Zulaica J. J. Infect. 2023, Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023) la espiga BA.4/5 se clonó en un vector pCG1 utilizando como plantilla un plásmido de expresión Ómicron BA.4/5 S, con codones optimizados, obtenido de Addgene. Todas las inserciones fueron verificadas mediante secuenciación de Sanger.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de neutralización de los anticuerpos circulantes (NtAb) contra las diferentes variantes del SARS-CoV-2, utilizando el VSV pseudotipado con capacidad de expresar GFP en células A549-ACE2 TMPRSS2 (InvivoGen). Todas las pruebas se realizaron por duplicado utilizando diluciones quintuples comenzando con una dilución de 1:10 (o de 1:20 en el segundo estudio), con 300-500 unidades formadoras de focos por pocillo. Después de 16 horas de infección, la señal de GFP en cada pocillo se cuantificó utilizando un microscopio de células vivas (Incucyte SX5, Sartorius). Para obtener resultados precisos, se restó la fluorescencia de los pocillos no infectados a los valores obtenidos en los pocillos infectados, y la fluorescencia de GFP en cada dilución tratada con anticuerpos se estandarizó a la fluorescencia promedio observada en los pocillos tratados sin anticuerpos. A cualquier valor que diera como resultado una señal relativa de GFP de $<0,001$ frente al virus no tratado, se le asignó un valor de 0,001 para eliminar los valores negativos. Finalmente, la dilución recíproca de anticuerpos que resultó en una neutralización del virus del 50 % se calculó utilizando el paquete drc (versión 3.0-1) en R, mediante un modelo de regresión logística de tres parámetros (modelo LL.3). A los sueros que dieron como resultado menos del 50% de neutralización en la dilución más baja analizada se les atribuyó arbitrariamente un título de anticuerpos recíproco de 10. Para el tercer y cuarto

artículo, el ensayo de neutralización se realizó de la forma previamente descrita, salvo que se utilizaron células VeroE6/TMPRSS2 y a los sueros que resultaron negativos (indetectables) se les atribuyó arbitrariamente un título de 1/20.

Los ensayos de neutralización del virus se llevaron a cabo en el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio), Universidad de Valencia-CSIC tras la recolección de los sueros previamente crioconservados (-70°C) .

Tabla IV.2. Variantes de SARS-CoV-2 y número de sueros analizados en los ensayos de neutralización de cada estudio

Estudio	Variante SARS-CoV-2	Nº de sueros
Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022	Wuhan-Hu-1	100
	Ómicron BA.1	
	Ómicron BA.2	
Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022	Wuhan-Hu-1	127
	Ómicron BA.1	127
	Ómicron BA.2	83
Camacho J, Zulaica J. J Infect. 2023	Wuhan-Hu-1	130
	Ómicron BA.4/5	130
Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023	Ómicron BA.2	100
	Ómicron BA.4/5	100

4.4 Análisis de la inmunidad celular específica de SARS-CoV-2

En el primer estudio (Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022) se analizó, además, la inmunidad T específica a partir de las muestras de sangre completa (137 muestras). Estas se recogieron en tubos con heparina sódica y se enviaron a temperatura ambiente, el mismo día, mediante mensajería, al Servicio de Microbiología del HCUV. El recuento de las células T CD4+ y CD8+ productoras de interferón- γ (IFN- γ) reactivas al SARS-CoV-2 se realizó en sangre total por citometría de flujo, siguiendo un protocolo de tinción intracelular de citoquinas (ICS) (BD Fastimmune, BD-BecktonDickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA, USA) publicado previamente (127).

Para ello, se estimuló simultáneamente sangre entera heparinizada (0,5 ml) durante 6 h con dos conjuntos de péptidos superpuestos de 15 aminoácidos

(superposición de 11-mer) que abarcan la glicoproteína S del SARS-CoV-2. Estos péptidos, que cubren las regiones S1 (158 péptidos) y S2 (157 péptidos), se utilizaron a una concentración de 1 µg/ml por péptido. Además, se añadieron anticuerpos monoclonales coestimuladores (mAb) contra CD28 y CD49d a una concentración de 1 µg/ml para activar las células T. Las mezclas de péptidos se obtuvieron de JPT peptid Technologies GmbH (Berlín, Alemania).

Al mismo tiempo, se procesaron en paralelo muestras de control usando una solución sin péptidos (PBS/dimetilsulfóxido) y con anticuerpos coestimuladores. En las últimas 4 horas de la incubación, se añadió Brefeldina A (10 µg/ml), para evitar la liberación de proteínas producidas por las células y permitiendo medir la producción de IFN-γ. Posteriormente, se procedió a la lisis de la sangre (solución de lisis BD FACS) y se congeló a -80 °C hasta que se analizó. El día de la prueba, la sangre estimulada se descongeló a 37 °C, se lavó, se permeabilizó (solución permeabilizante BD) y se tiñó con una combinación de mAb marcados (anti-IFNγ-FITC, anti-CD4-APC-H7, anti-CD8-PerCP-Cy5.5 y anti-CD3-APC) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para asegurar la precisión de los resultados, se utilizaron controles positivos (fitohemaglutinina) y de isotipo apropiados. Posteriormente, las células se lavaron, se resuspendieron en 200 µl de paraformaldehído al 1 % en PBS y se analizaron en 2 horas en un citómetro de flujo FACSCanto utilizando el software DIVA v8 (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San José, CA).

La selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN-γ se realizó mediante la técnica de *gating* (Figura IV.2). Los eventos CD3⁺/CD8⁺ o CD3⁺/CD4⁺ se seleccionaron y luego se analizaron para determinar la producción de IFN-γ. Todos los datos se corrigieron para la producción de IFN-γ de fondo (anticuerpo de control de isotipo marcado con FITC). Los datos se expresan como el número de células T CD4⁺ o CD8⁺ productoras de IFN-γ reactivas al SARS-CoV-2 en relación con el número absoluto de células T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente, x 100 (%). Cualquier valor de frecuencia de células T CD4⁺ o CD8⁺ productoras de IFN-γ reactivas al SARS-CoV-2 tras restar la fluorescencia de fondo, se consideró como un resultado positivo (detectable) y se utilizó con fines de análisis.

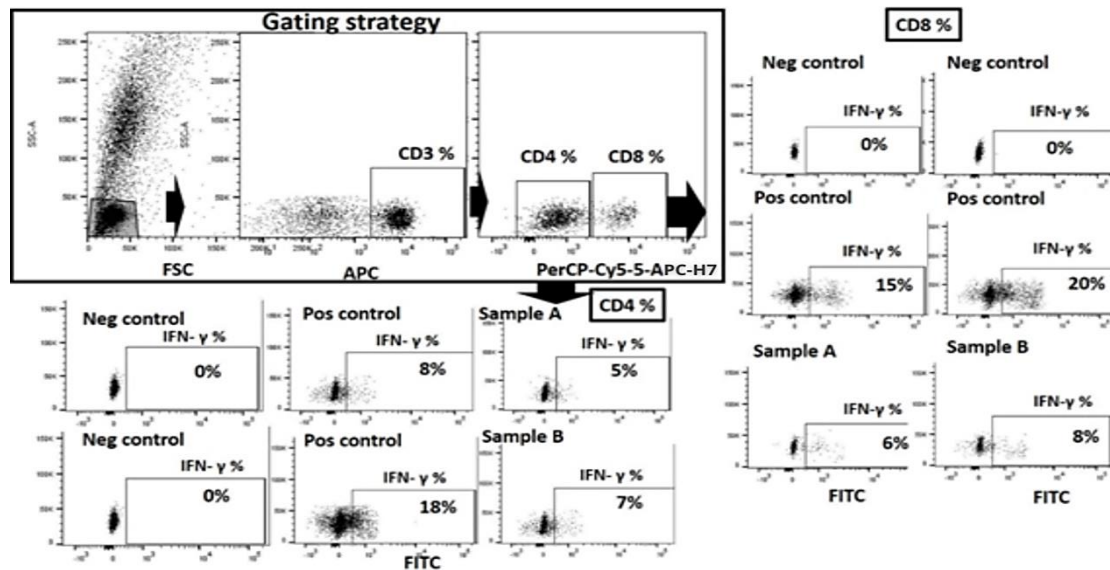


Figura IV.2. Técnica del *gating* para el recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN- γ tras la estimulación antigénica con péptidos específicos de la proteína S del SARS-CoV-2.

5. Método ML: CART

En el cuarto artículo (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023) se elaboró un modelo de aprendizaje automático, conocido comúnmente como *Machine Learning* (ML), de tipo supervisado, cuyo objetivo principal fue el de predecir la actividad neutralizante sérica frente a diferentes subvariantes Ómicron del SARS-CoV-2, a partir de una serie de variables explicativas, fáciles de recopilar. Entre los diferentes tipos de ML supervisado, se utilizó el modelo de árboles de clasificación y regresión (CART) debido a su fácil interpretabilidad y visualización, entre otras ventajas. Para la construcción del ML, se utilizaron las siguientes variables:

- Edad
- Sexo
- Número de dosis de vacuna recibidas
- Calendario de vacunación
- Tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna
- Antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2

Tanto la edad como el tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna se trataron como variables continuas, mientras que el sexo y los antecedentes

de infección se clasificaron como variables cualitativas dicotómicas. El número de dosis de vacunas recibidas osciló entre 0 y 4. Respecto al calendario de vacunación, se clasificaron a los sujetos del estudio en: aquellos que no habían recibido ninguna dosis; aquellos que habían sido vacunados, ya sea de forma completa o incompleta, sin dosis de refuerzo; los vacunados completamente con un refuerzo homólogo; y aquellos que recibieron una pauta completa con una dosis de refuerzo heteróloga. Para los participantes no vacunados, se asignó arbitrariamente un valor de 5.000 a la variable “días transcurridos desde la vacunación” a efectos de análisis.

Se construyó un diagrama de árbol de decisión utilizando el algoritmo CHAID (*Chi-squared Automatic Interaction Detection*) exhaustivo, con una profundidad máxima del árbol de 10, un nivel de significación del 5% y la corrección de Bonferroni. Las variables que mostraron multicolinealidad fueron descartadas automáticamente. El modelo CART se entrenó primero con toda la cohorte de entrenamiento (TC) y después utilizando participantes seleccionados al azar ($n = 30$), con fines de verificación. Posteriormente, se aplicó el modelo CART en la cohorte de validación (VC) para evaluar su capacidad predictiva.

6. Análisis estadísticos

La gran mayoría de pruebas estadísticas que se realizaron quedan englobadas dentro de las pruebas no paramétricas, por estudiarse una población distribuida sin seguir la normalidad. Las variables continuas se presentan en medianas y rangos intercuartílicos (IQR). Las comparaciones de frecuencias para variables categóricas entre grupos se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher. Las diferencias entre medianas se compararon mediante la prueba de U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis, para dos o más muestras no apareadas, y la prueba de rangos de Wilcoxon para datos apareados, según procediera.

Para evaluar la concordancia entre ensayos en el segundo artículo se aplicaron las correlaciones kappa de Cohen y de rangos de Spearman. Se realizó una transformación Z de Fisher de los valores p para comparar estadísticamente. El porcentaje de concordancia positiva (PPA) se definió como $[a/a+b] \times 100$ y el porcentaje de concordancia negativa (PPN) como $[d/c+d] \times 100$ siendo a el número de

muestras con resultados positivos por ambas pruebas de comparación, b y c el número de muestras con resultados discordantes (positivos/negativos) en cualquiera de los métodos y d, el número de muestras con resultados negativos en ambas pruebas. Cuando se consideró apropiado, se utilizó el término sensibilidad para referirse a la tasa de detección de anticuerpos en Vac-Ex, Vac-N y Unvac-Ex. La especificidad del ensayo respectivo fue calculada teniendo en cuenta los sueros de individuos Unvac-N. Se utilizó la prueba de Bland-Altman para evaluar las diferencias medias de los valores medidos por los dos inmunoensayos. Se construyeron curvas ROC para evaluar la sensibilidad y especificidad para cada posible punto de corte de un inmunoensayo dado (BAU/ml) que predice la detección de NtAb (IC_{50} recíproco ≥ 10).

También se generaron curvas ROC en el último trabajo con el fin de investigar el punto de corte más apropiado (en términos de sensibilidad y especificidad) para discriminar entre los sueros que mostraban una actividad neutralizante detectable o indetectable frente a cada sublinaje Ómicron del SARS-CoV-2. Se comunicaron valores p exactos de dos caras; un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis y gráficos se realizaron con SPSS versión 20.0 (SPSS Chicago, IL, EE. UU.) y GraphPad Software Inc. V6.0, respectivamente. El software XLSTAT (Addinsoft) se utilizó para generar el modelo de aprendizaje automático mediante árboles de clasificación y regresión.

Resultados y discusión

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2 en la población general de la Comunidad Valenciana

Los resultados presentados en este primer apartado se corresponden con los expuestos en el primer trabajo (Camacho J, Giménez E. J Med Virol. 2022). Un estudio de seroprevalencia que forma parte del Programa Valenciano de Investigación de la Vacuna frente a la COVID-19 (ProVaVac) realizado en abril del 2022, tras la propagación de la variante Ómicron BA.1 en la comunidad. Es importante destacar que un 93,9% de la población de la CV estaba completamente vacunada y que un 57,3% tenía, además, una dosis de refuerzo en el momento del estudio según el informe de actividad diario de la Gestión Integral de Vacunación frente al COVID en España (GIV) (128).

1.1 Características de los participantes

De los 1043 participantes elegibles, 935 (89,6%) fueron finalmente incluidos en el estudio debido a la no asistencia de aquellos que cumplían los requisitos de edad y sexo. Las características demográficas de los participantes se muestran en la Tabla V.1

Tabla V.1. Características demográficas de los participantes del estudio				
Variable	Provincias de la Comunidad Valenciana			
	Total (n=935)	Valencia (n=547)	Alicante (n=323)	Castellón (n=65)
Sexo (%)				
Masculino	411 (44)	241 (44,1)	145 (44,9)	25 (38,5)
Femenino	524 (56)	306 (55,9)	178 (55,1)	40 (61,5)
Grupos de edad en años (%)				
0-9	40 (4)	22 (4)	15 (4,6)	3 (4,6)
10-19	88 (9)	57 (10,4)	24 (7,4)	7 (10,8)
20-34	150 (16)	89 (16,3)	51 (15,8)	10 (15,4)
35-49	181 (19)	106 (19,4)	63 (19,5)	12 (18,5)
50-64	174 (19)	99 (18,1)	66 (20,4)	9 (13,8)
65-79	160 (17)	88 (16,1)	60 (18,6)	12 (18,5)
>80	142 (15)	86 (15,7)	44 (13,6)	12 (18,5)

El número de participantes de cada provincia de la CV se equilibró con el tamaño de la población respectiva. Las principales plataformas de vacunas utilizadas fueron Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) y Spikevax® (Moderna/Lonza), ambas basadas en ARNm, seguidas de otras de tipo vector viral no replicativo como Vaxzevria® (Oxford/AstraZeneca) y Jcovden® (JandJ/Janssen). El estado de vacunación frente a la COVID-19 de los integrantes del estudio clasificados según grupos de edad se muestra en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Estado de vacunación frente a la COVID-19 de los participantes según su edad						
Grupos de edad (n)	Estado de vacunación					Nº de participantes no vacunados (%)
	Nº de participantes (%) con una pauta incompleta de vacunación	Nº de participantes (%) con una pauta completa de vacunación	Nº de participantes que recibieron dosis de refuerzo de la vacuna COVID-19 (%)			
			Ambas combinadas	Heteróloga	Homóloga	
Todas las edades (935)	39 (4)	812 (87)	582 (69)	306 (52,5)	276 (47,5)	84 (9)
0-9 (40)	13 (33)	8 (20)	0	-	-	19 (48)
10-19 (88)	10 (11)	68 (77)	9 (12)	7 (78)	2 (22)	10 (11)
20-34 (150)	10 (7)	126 (84)	63 (46)	50 (79)	13 (21)	14 (9)
35-49 (181)	4 (2)	158 (87)	103 (64)	79 (77)	24 (23)	19 (10)
50-64 (174)	1 (1)	169 (97)	135 (79)	114 (84)	21 (16)	4 (2)
65-79 (160)	1 (1)	152 (95)	145 (95)	48 (33)	97 (67)	7 (4)
>80 (142)	0 (0)	131 (92)	127 (97)	8 (6)	119 (94)	11 (8)

De los 935 participantes, 812 (86,8%) habían recibido un esquema de vacunación completo (en la mayoría de los casos, Comirnaty o Spikevax), 39 (4,1%) no recibieron una pauta completa de vacunación y 84 (8,9%) no estaban vacunados, siendo el 48% de ellos niños menores de 9 años. El porcentaje de participantes totalmente vacunados aumentó con la edad. Se administraron dosis de refuerzo de la vacuna a 582 participantes (69%), de las cuales 276 fueron homólogas y 306 heterólogas a la vacuna previamente utilizada. La mediana del tiempo transcurrido entre la última dosis de vacuna y el reclutamiento de las muestras fue de 118 días (rango, 2-428).

1.2 Incidencia acumulada de la infección por SARS-CoV-2

El volumen de sangre fue insuficiente para el estudio serológico en cuatro integrantes, que en consecuencia fueron excluidos, quedando 931 sujetos para los análisis que se detallan a continuación. Se documentó una infección previa por SARS-CoV-2 en un total de 442 (47,4%) participantes que vino definida por:

- Presencia de IgG anti-N del SARS-CoV-2 (n = 404).
- Resultado positivo en una PDIA (n = 237).
- Detección aislada de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 en individuos no vacunados ni con registro de infección previa (n = 16).

La incidencia acumulada bruta de infección previa por SARS-CoV-2 en la CV fue del 47,4% (IC 95%, 44,1-50,6), mientras que la incidencia acumulada ponderada por edad/sexo fue del 51,9% (IC 95%, 48,7-55,1), como se muestra en la tabla V.3. Observamos que la tasa de infección previa por SARS-CoV-2 estaba inversamente correlacionada con la edad; más de dos tercios de los individuos menores de 34 años presentaron evidencia de infección previa por SARS-CoV-2, mientras que esta cifra fue de aproximadamente el 25% en el grupo de mayores de 65 años.

Es importante señalar que, entre los participantes con un resultado positivo documentado en una PDIA (n = 237), el 11% fueron diagnosticados de infección por SARS-CoV-2 en 2020 (n = 25), el 22% en el primer semestre 2021 (n = 52), el 17% en el segundo semestre de 2021 (n = 40) y el 51% en el primer trimestre de 2022 (n = 120), periodos en los que las variantes ancestrales Wuhan-Hu-1 (incluida G614), Alfa, Delta y Ómicron BA.1 eran dominantes en la CV. En general, la mediana del tiempo transcurrido entre el diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2 y el reclutamiento de las muestras fue de 111 días (rango, 8-591). Los participantes se agruparon como Vac-Ex (n = 379), Vac-N (n = 472), Unvac-Ex (n = 63) y Unvac-N (n = 21), a efectos analíticos.

Tabla V.3. Incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2, determinada por PDIA y/o ensayos serológicos, de los participantes según su edad

Grupo de edad (años) (nº de participantes)	Registro de resultado de PDIA positivo (%; IC 95%)	Anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 N detectables (%; IC 95 %)	Anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD detectables (%; IC 95 %)	Infección previa por SARS-CoV-2 (%; IC 95%) ^a
0-9 (40)	35,0 (20,6-51,7)	62,4 (46,7-78,1)	80,0 (67,0-93,0)	65,0 (48,3-79,4)
10-19 (87)	29,9 (20,5-40,6)	65,6 (55,4-75,8)	98,8 (96,6-100)	69,0 (58,1-78,4)
20-34 (150)	39,3 (31,5-47,6)	61,2 (53,3-69,1)	97,3 (94,7-99,9)	64,0 (55,8-71,7)
35-49 (181)	32,0 (25,3-39,4)	51,2 (43,8-58,5)	98,3 (96,5-100)	56,9 (49,3-64,2)
50-64 (173)	27,2 (20,7-34,4)	44,5 (37,0-52,0)	98,3 (96,3-100)	47,4 (39,8-55,1)
65-79 (159)	11,9 (7,3-18,0)	22,0 (15,5-28,6)	98,7 (97,0-100)	26,4 (19,7-34,0)
≥80 (141)	9,2 (5,0-15,2)	18,4 (11,9-24,8)	97,2 (94,3-99,9)	22,7 (16,1-30,5)
Total (931)	25,3 (22,6-28,3)	43,4 (40,2-46,6)	97,3 (96,3-98,4)	47,4 (44,1-50,6)
Total _w (931) ^b	28,2 (25,3-31,1)	47,9 (44,7-51,1)	96,7 (95,5-97,8)	51,9 (48,7-55,1)

PDIA, prueba de diagnóstico de infección activa (prueba rápida de detección de antígenos o RT-PCR); IC: intervalo de confianza; N, proteína de la nucleocápside de SARS-CoV-2; RBD, dominio de unión al receptor.

^aUno o más de los siguientes: resultado positivo de PDIA, Anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 N detectables o anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD detectables en participantes no vacunados (en ausencia de IgG anti-N y antecedentes de una prueba PDIA positiva).

^bPoblación total de la Comunidad Valenciana ponderada por edad y sexo.

1.3 Determinación de anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2

Observamos que 906 de los 931 participantes (97,3%) tenían anticuerpos totales anti-RBD detectables, siendo niños Unvac-N (23/25), la mayoría de los individuos con niveles de anticuerpos indetectables. Como se muestra en la Figura V.1.A, la mediana de los niveles totales de anticuerpos anti-RBD fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en los participantes Vac-Ex que en los Vac-N (mediana, 23.120 BAU/ml; IQR, 10.186-46.196 vs. mediana, 9.023 BAU/ml; IQR, 3.844-20.329); esta diferencia se observó en la mayoría de los rangos de edad. A su vez, los individuos Vac-Ex y Vac-N mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos ($p < 0,001$) que los participantes Unvac-Ex (mediana, 622 BAU/ml; IQR, 82-6.913).

En comparación con Vac-N, los individuos del subgrupo Vac-Ex eran más jóvenes (mediana, 41 años; rango, 5-94 años; vs. 62 años; rango, 5-95 años; $p < 0,001$) y más frecuentemente hombres (49% vs. 40%; $p < 0,02$). Es importante destacar que el tiempo transcurrido entre la última dosis de vacuna y la prueba fue más corto en los sujetos Vac-N que en los Vac-Ex (mediana, 116 días; rango, 0-428 vs. 150 días; rango, 0-343; $p < 0,001$), ya que los primeros tenían más probabilidades ($p < 0,001$) de haber recibido una dosis de vacuna de refuerzo que los segundos (83,5% vs. 44,3%). A su vez, los participantes Vac-Ex y Unvac-Ex se emparejaron por sexo ($p = 0,62$) y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 (mediana, 92 días; rango, 8-718; vs. mediana, 82 días; rango, 51-516; $p = 0,25$). No obstante, el subgrupo Unvac-Ex incluía más participantes menores de 9 años que el grupo Vac-Ex, que incluía más sujetos de 50-64 años ($p < 0,001$).

En general, el número de dosis de vacuna recibidas tuvo un impacto directo en el nivel de anticuerpos totales anti-RBD, independientemente del estado de infección por SARS-CoV-2 (Figura V.1.B). Curiosamente, entre los participantes que recibieron una tercera dosis de vacuna, las vacunas de refuerzo heterólogas dieron lugar a un aumento de los niveles de anticuerpos anti-RBD en comparación con los esquemas homólogos en los participantes naïve, independientemente de la edad y el sexo, como así refleja la Figura V.1.C. Sin embargo, no se encontró correlación entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna y los niveles totales de anticuerpos anti-RBD (rho de Spearman: -0,02; IC 95%: -0,13 a 0,07; $p = 0,57$) en los individuos Vac-Ex, mientras que se observó una correlación inversa moderada (rho de Spearman: -0,52; IC 95%: -0,59 a -0,45; $p < 0,001$) en los Vac-N (Figura V.2). Es importante destacar que, en los participantes del grupo Vac-Ex con un resultado positivo en una PDIA ($n = 220$), el tiempo transcurrido desde la documentación de la infección por SARS-CoV-2 mostró una correlación inversa débil con los niveles de anticuerpos anti-RBD (rho de Spearman: -0,30; IC 95%: -0,42 a -0,17; $p < 0,001$) como aparece en la Figura V.3.

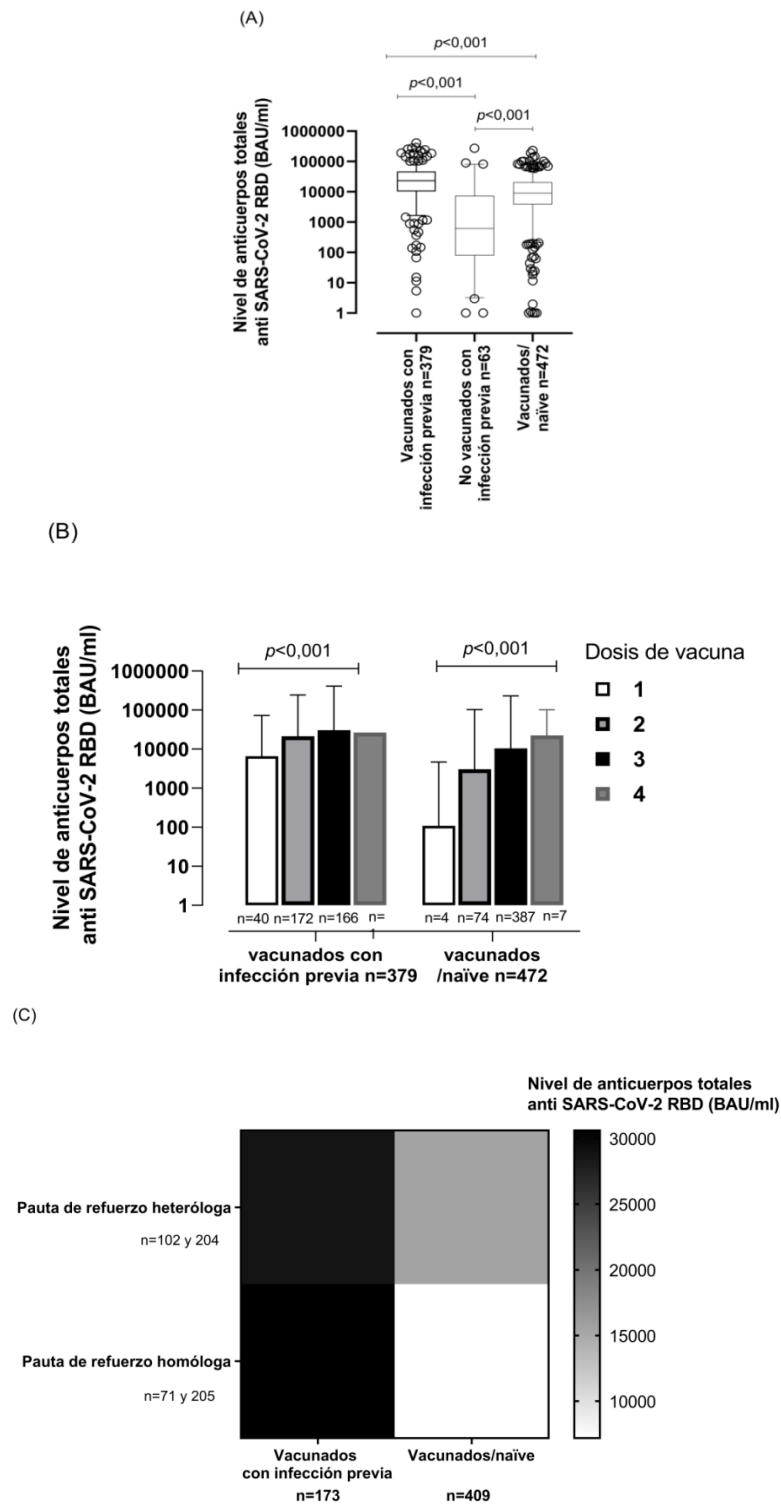


Figura V.1. Anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2 (en BAU/ml) en los participantes. (A) Diagrama de caja y bigotes que representan los niveles de anticuerpos séricos según el estado de vacunación e infección por SARS-CoV-2 en el momento del reclutamiento. (B) Diagrama de caja y bigotes que representa los niveles de anticuerpos séricos en los participantes vacunados con infección previa de SARS-CoV-2 y vacunados/naïve según el número de dosis de vacuna recibidas. (C) Niveles de anticuerpos séricos en vacunado con infección previa por SARS-CoV-2 y vacunados/naïve que recibieron una o más dosis de refuerzo por tipo de pauta (homóloga vs. heteróloga).

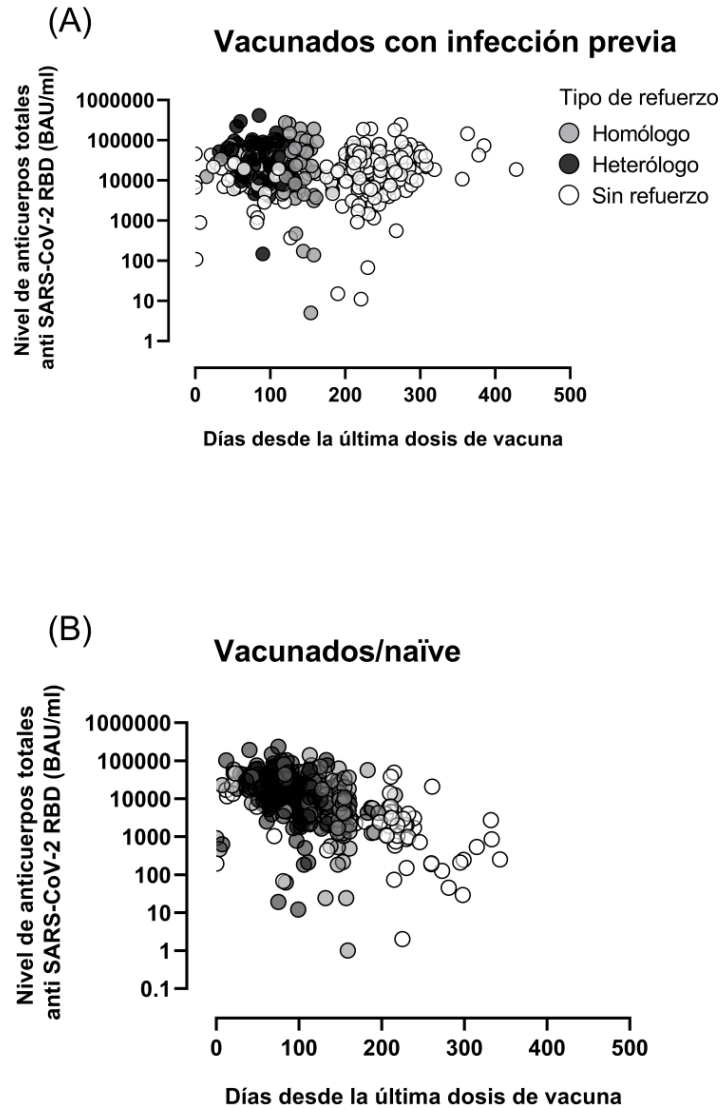


Figura V.2. Anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2 (en BAU/ml) en vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (A) y vacunados/naïve (B) según el calendario de vacunación (vacunación completa sin dosis de refuerzo, dosis de refuerzo homóloga y dosis de refuerzo heteróloga) y el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna.

Por último, se observaron sutiles diferencias relacionadas con la edad en los niveles de anticuerpos totales anti-RBD en los subgrupos Vac-Ex y Vac-N que probablemente estaban relacionadas con las diferencias en cuanto al número de vacunas recibidas y el tiempo transcurrido desde la administración de la última dosis de vacuna.

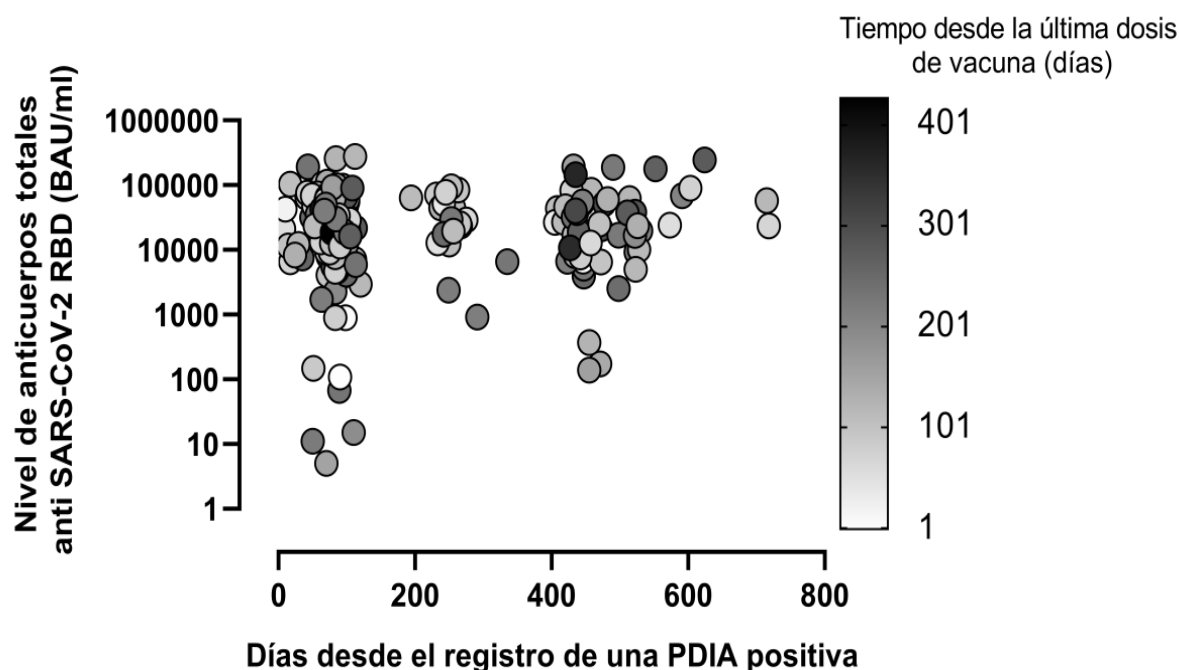


Figura V.3. Anticuerpos totales frente al RBD de SARS-CoV-2 (en BAU/ml) en participantes vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 con antecedentes de una prueba diagnóstica de infección activa (PDIA) positiva según el tiempo transcurrido desde la documentación del resultado positivo y el tiempo desde la última dosis de vacuna.

1.4 Análisis de anticuerpos neutralizantes contra las subvariantes Wuhan-Hu-1 y Ómicron

Se examinó a un total de 100 participantes seleccionados al azar de todos los grupos de edad para detectar la presencia de NtAb contra las (sub)variantes de SARS-CoV-2. Las proporciones de participantes que presentaron NtAb contra las distintas (sub)variantes se muestran en la Tabla V.4. Para la variante Wuhan-Hu-1 fueron del 100%, 93% y 40% en los grupos Vac-Ex, Vac-N, Unvac-Ex, respectivamente; para Ómicron BA.1, los porcentajes fueron del 94%, 75% y 50%, respectivamente; y para Ómicron BA.2, del 97%, 84% y 40%, respectivamente.

Tabla V.4. Porcentaje de sueros con NtAb detectables según el estado de vacunación e infección por SARS-CoV-2 y la (sub)variante del virus

(Sub)variante de SARS-CoV-2	Nº de sueros con NtAb detectables (%)		
	Vacunados con infección previa	Vacunados/naïve	No vacunados con infección previa
Wuhan-Hu-1	100	93	40
Ómicron BA.1	94	75	50
Ómicron BA.2	97	84	40
NtAb, anticuerpos neutralizantes			

En general, los títulos de NtAb fueron inferiores frente a Ómicron BA.1 y BA.2 que frente a Wuhan-Hu-1 en todos los grupos de comparación; a su vez, los niveles medios de NtAb de unión a Ómicron BA.1 y BA.2 fueron comparables en todos los grupos de estudio (Figura V.4). Cabe destacar que los NtAb dirigidos a todas las subvariantes analizadas fueron mayores en los individuos Vac-Ex que en los Vac-N, aunque se alcanzó significación estadística para los dirigidos contra Wuhan-Hu-1 ($p = 0,05$) y BA.1 ($p = 0,008$), pero no contra BA.2 ($p = 0,74$) (Figura V.4). Además, tanto Vac-Ex como Vac-N mostraron títulos de NtAb más altos que los participantes Unvac-Ex ($p = 0,001$ para Wuhan-Hu-1; $p = 0,052$ para BA.1 y $p = 0,003$ para BA.2).

En general, observamos títulos comparables de NtAb frente a todas las (sub)variantes analizadas entre los participantes Vac-Ex, tanto si habían recibido una dosis adicional de vacuna como si no, como se puede apreciar en la Tabla V.5. No obstante, se observó una significativa, aunque débil, correlación inversa entre los títulos de NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 y el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna en los individuos Vac-N (Rho: -0,34 y -0,39; $p = 0,02$ y $0,004$), pero no en los Vac-Ex (Rho: -0,26 y 0,06; $p = 0,13$ y $0,74$).

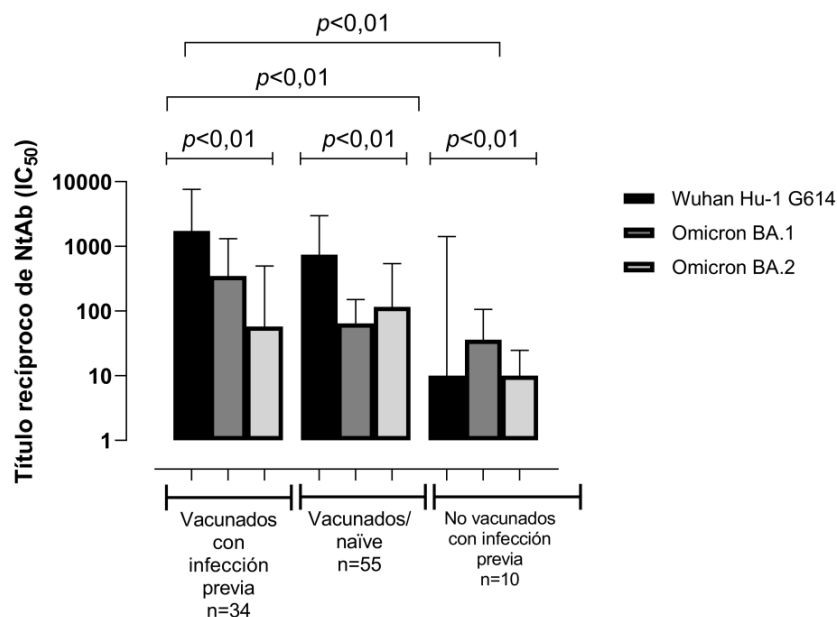


Figura V.4. Título de anticuerpos neutralizantes en suero (IC_{50} recíproco) frente a las (sub)variantes Wuhan-Hu-1, Ómicron BA.1 y BA.2 de SARS-CoV-2 en participantes vacunados con infección previa de SARS-CoV-2, vacunados/naïve y no vacunados con infección previa. Todos ellos se emparejaron por sexo y edad y los participantes vacunados por tipo de dosis de refuerzo. No obstante, el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna fue significativamente más corto ($p < 0,001$) en los participantes vacunados/naïve que en vacunados con infección previa (mediana, 116 días; rango, 29-298; vs. 162 días; rango, 0-308).

Tabla V.5. Anticuerpos neutralizantes y células T productoras de IFN- γ específicas frente a SARS-CoV-2 en participantes vacunados con infección previa por SARS-CoV-2, reforzados o no con una dosis de vacuna adicional

Parámetro inmunológico	Vacunados con infección previa con dosis de refuerzo/nº de participantes evaluados	Vacunados con infección previa sin dosis de refuerzo/nº de participantes evaluados	P valor
NtAb frente a Wuhan-Hu-1; IC_{50} (rango)	2.610 (585-19.477)/12	1.446 (85-13.145)/22	0,10
NtAb frente a Ómicron BA.1; IC_{50} (rango)	583 (19-36.637)/12	254 (10-16.974)/22	0,21
NtAb frente a Ómicron BA.2; IC_{50} (rango)	42 (10-689)/12	149 (23-963)/22	0,56
Células T CD8 ⁺ (IFN- γ) frente a SARS-CoV-2-S; mediana (rango)	0,52 (0-30)/21	0,19 (0-10)/30	1,0
Células T CD4 ⁺ (IFN- γ) frente a SARS-CoV-2-S; mediana (rango)	0,08 (0-0,20)/21	0,07 (0-4)/30	0,32
NtAb, anticuerpos neutralizantes; IC_{50} , título IC_{50} recíproco medio.			

1.5 Evaluación de la respuesta de las células T productoras de IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2

Enumeramos las células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2 en 137 participantes. En general, 101 participantes (73,7%) tenían células T IFN- γ detectables para el SARS-CoV-2-S: CD4⁺ (n = 15; 14,9%), CD8⁺ (n = 41; 40,6%) o ambas (n = 45; 44,6%). Concretamente, las cifras fueron del 73%, 75% y 64% para Vac-Ex, Vac-N y Unvac-Ex, respectivamente. Las medianas de ambos subconjuntos de células T fueron comparables en todos los subgrupos ($p = 0,92$ para las células T CD8⁺ y $p = 0,80$ para las células T CD4⁺) como así aparece reflejado en la Figura V.5. Asimismo, ni la edad ($p = 0,86$) ni el sexo ($p = 0,57$) influyeron en las medianas de los dos subconjuntos de células T. Las frecuencias de subconjuntos de células T del SARS-CoV-2 fueron comparables independientemente de haber recibido dosis adicional de vacuna (Tabla V.5) o del tiempo transcurrido desde la última dosis de esta, tanto en individuos Vac-Ex como Vac-N (rho: -0,16 y -0,14; $p = 0,37$ y 0,31 para CD8⁺ y rho: -0,20 y 0,08; $p = 0,26$ y 0,57 para CD4⁺).

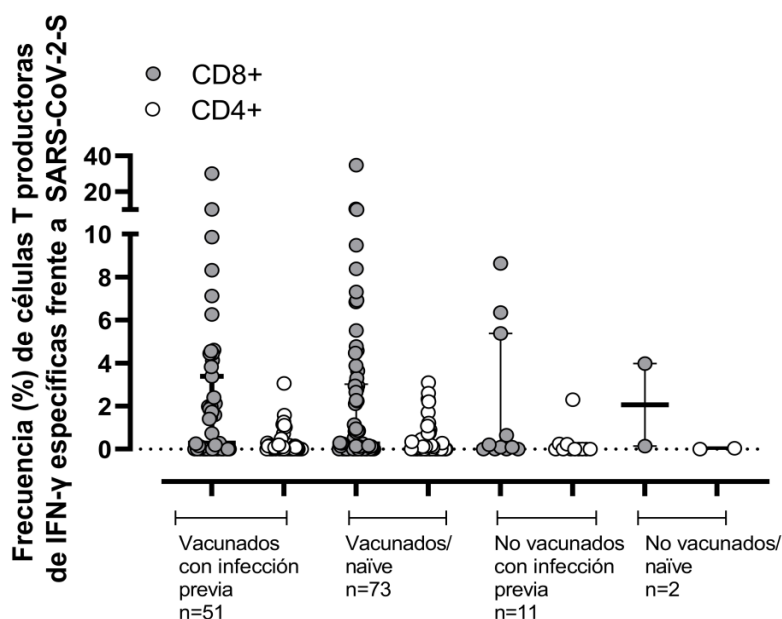


Figura V.5. Frecuencia de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ reactivas a la proteína espicular del SARS-CoV-2 en participantes vacunados con infección previa por SARS-CoV-2, vacunados/naïve, no vacunados con infección previa y no vacunados/naïve. Los tres primeros subgrupos estaban equilibrados en cuanto al sexo y la edad, y los vacunados en cuanto al tipo de refuerzo; sin embargo, el tiempo transcurrido entre la última dosis de vacuna fue significativamente inferior ($p < 0,001$) en los participantes vacunados/naïve que en los vacunados con infección previa (mediana, 113 días; rango, 0-298; vs. 175 días; rango, 0-308).

Hasta la fecha, solo se han documentado escasos estudios seroepidemiológicos que aborden la propagación de la oleada Ómicron en la población general (116–118). En este trabajo, realizamos una encuesta serológica transversal para estimar la prevalencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en la población general de la CV tras la oleada de la subvariante Ómicron BA.1 y recuperamos datos de infección por SARS-CoV-2 documentados previamente para la población reclutada a partir del registro de la CV, RedMiVa. Nuestros resultados son probablemente extrapolables a otras comunidades autónomas en España, como se ha sugerido previamente (129). Estimamos una incidencia acumulada ponderada por edad/sexo de infección previa por SARS-CoV-2 del 51,9% (IC 95%: 48,7-55,1). Aunque esta cifra fue comparable entre hombres y mujeres, se observaron diferencias relacionadas con la edad, dándose la tasa más alta en los individuos menores de 34 años y la más baja en los mayores de 65 años. Estas diferencias podrían explicarse por disparidades en la tasa de vacunación completa o de refuerzo y en el comportamiento social de los distintos grupos de edad. Curiosamente, alrededor del 9% de los participantes carecieron de anticuerpos anti-SARS-CoV-2-N a pesar de la documentación previa de infección por SARS-CoV-2, lo que sugiere, en línea con hallazgos anteriores (130), que la evaluación de los anticuerpos anti-N por sí sola podría subestimar la incidencia de la infección por SARS-CoV-2.

La evaluación del estado inmunitario frente a SARS-CoV-2 en función del calendario de vacunación, el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna y la exposición previa al virus también proporciona información valiosa para modelar el curso de la pandemia. En este estudio, medimos los niveles séricos de anticuerpos totales anti-RBD, como marcado sustituto de la actividad neutralizante sérica (85,118), en todos los participantes. Además, evaluamos los títulos de NtAb y la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ reactivos a la proteína S del SARS-CoV-2 en sangre periférica, en un subconjunto seleccionado aleatoriamente que representaba a toda la población del estudio. Consideramos que los siguientes factores fueron relevantes para la interpretación de los datos: en primer lugar, la mediana de tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna hasta la prueba fue de aproximadamente cuatro meses; en segundo lugar, entre los participantes con un resultado positivo documentado en una PDIA, la mediana de tiempo transcurrido entre el diagnóstico de SARS-CoV-2 y la recolección de muestras fue, en general, de 111

días; en tercer lugar, como se ha indicado anteriormente, aproximadamente el 50% de las infecciones por SARS-CoV-2 en los sujetos reclutados con un resultado positivo en una PDIA fueron causadas aparentemente por la subvariante Ómicron BA.1.

En este contexto, el 97% de los participantes tuvieron anticuerpos totales anti-RBD detectables, cuyos niveles aumentaron en los individuos Vac-Ex en comparación con los participantes Vac-N y, especialmente, con los individuos Unvac-Ex emparejados por el momento del diagnóstico de infección por SARS-CoV-2, lo que sugiere que la disminución de anticuerpos puede ocurrir más rápidamente en estos últimos individuos. Los individuos Vac-Ex mostraron niveles más altos de anticuerpos totales anti-RBD que los Vac-N en prácticamente todos los grupos de edad. Este resultado se observó independientemente del número de dosis de vacuna recibidas y a pesar de que los Vac-N habían recibido la última dosis de vacuna (dosis de refuerzo, en la mayoría de los casos) más recientemente que los sujetos Vac-Ex. Es importante destacar que el aumento de anticuerpos totales anti-RBD tras una dosis de refuerzo de la vacuna fue mayor en los participantes Vac-N que en los Vac-Ex, especialmente tras una pauta de refuerzo heteróloga, en línea con hallazgos anteriores (131,132). Nuestros datos sugieren que las respuestas de anticuerpos totales anti-RBD pueden ser más duraderas en Vac-Ex, como lo demuestra una correlación inversa entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna y los niveles de anticuerpos totales anti-RBD en los participantes Vac-N, pero no así en los Vac-Ex. Además, el tiempo transcurrido desde la documentación de la infección por SARS-CoV-2 se correlacionó débilmente (de forma inversa) con los niveles de anticuerpos anti-RBD en los participantes Vac-Ex. En conjunto, estos datos sugieren que la inmunidad híbrida proporcionó respuestas de anticuerpos anti-RBD más fuertes y duraderas que la vacunación por sí sola, lo que coincide con observaciones anteriores (120,121,130,133–137).

Nuestros datos sobre los ensayos de neutralización del virus condujeron a varias conclusiones potencialmente relevantes. En primer lugar, la proporción de participantes que mostraron NtAb detectables frente a Ómicron BA.2, la subvariante dominante en la CV en mayo de 2022, antes de la finalización del estudio actual, fue tan alta como frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1; además, los niveles medios de NtAb contra Ómicron BA.1 y BA.2 fueron comparables en los participantes de todos los subgrupos del

estudio, lo que sugiere un grado sustancial de reactividad cruzada de epítomos de células B entre estas subvariantes, como se había observado anteriormente (138). Nuestro hallazgo de que un alto porcentaje de participantes vacunados con o sin infección previa por SARS-CoV-2 tuviera NtAb detectables contra Ómicron BA.1 (94% y 75%, respectivamente) era compatible con la idea de que tanto las plataformas de vacunas basadas en Wuhan como las infecciones post-vacunación provocan anticuerpos de reactividad cruzada contra las variantes de preocupación de SARS-CoV-2 (132,139) y que la infección por Ómicron BA.1 en personas vacunadas puede inducir NtAb específicos de sublinaje (es decir, BA.2), además de la recuperación de células B de memoria establecidas por la vacunación previa (140–142).

En segundo lugar, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la inmunidad híbrida proporciona una respuesta NtAb más robusta y, quizás, más duradera contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 que la provocada por la vacunación o la infección natural por sí solas. Sin embargo, aparentemente este no fue el caso de BA.2; esto podría tener implicaciones importantes en el diseño de políticas de vacunación en un futuro próximo, ya que los sublinajes actualmente dominantes en el mundo, como BA.4, BA.5, BA.2.12.1 y BA.2.75 guardan más similitudes con BA.2 que con BA.1 en términos de su capacidad para escapar a las respuestas de anticuerpos provocadas por las vacunas basadas en Wuhan-Hu-1 (131). En tercer lugar, nuestros datos no revelaron diferencias en los títulos de NtAb frente a todas las (sub)variantes analizadas entre los participantes Vac-Ex, recibieran o no una dosis adicional de vacuna; no obstante, el bajo número de participantes incluidos en el análisis limitó la solidez de esta conclusión. Se sabe que las respuestas detectables de las células T frente al SARS-CoV-2 persisten hasta 8 meses después de la infección natural o de la vacunación (143–145). Nuestros datos apoyan esta afirmación en el sentido de que las células T $CD4^+$, $CD8^+$ o ambas, pueden detectarse en el 75% de los participantes con una mediana de 4 meses después de la última dosis de vacuna. En efecto, las respuestas de células T IFN- γ reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2 pueden permanecer relativamente estables a lo largo del tiempo, ya que las frecuencias de ambos subconjuntos de células T no se correlacionaron con el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna. Además, la administración de una dosis de refuerzo tuvo un impacto mínimo en la magnitud de las respuestas de las células T. Curiosamente, en contraste con nuestras observaciones

sobre los anticuerpos funcionales, no encontramos diferencias entre Vac-Ex y Vac-N con respecto a las frecuencias de cualquiera de los subconjuntos de células T.

Una limitación de nuestro estudio es que va por detrás del panorama epidemiológico emergente de SARS-CoV-2 en la CV y a nivel global; sin embargo, los datos sobre la incidencia acumulada de infección por SARS-CoV-2 en los distintos grupos de edad revelaron un patrón de transmisión del virus en nuestra comunidad, que probablemente se ha mantenido tras las oleadas de BA.5 y BA.2.12.1 (en España, la presencia de BA.2.75 fue anecdótica). Esto podría permitir a los responsables de salud pública y a los responsables políticos identificar puntos calientes y zonas en las que la transmisión se ha reducido para poder responder en consecuencia (administración selectiva de refuerzos vacunales o uso selectivo de anticuerpos monoclonales, cuando esté indicado). Además, nuestros datos podrían ayudar a establecer tácticas selectivas de mitigación ante la aparición y propagación de nuevos sublinajes altamente transmisibles. Nuestro estudio tuvo otras limitaciones: en primer lugar, es posible que se haya introducido un sesgo al excluir algunas ZAP y al incluir únicamente a individuos programados para análisis de sangre; en segundo lugar, no se preguntó a los participantes si habían experimentado recientemente síntomas relacionados con el COVID-19; en tercer lugar, no se realizó la secuenciación de la variante SARS-CoV-2; en cuarto lugar, se utilizó un ensayo de citometría de flujo ICS no estandarizado para enumerar las células T reactivas a la proteína S del SARS-CoV-2; por último, no se exploraron funcionalidades de las células T distintas de la producción de IFN- γ y se utilizaron bibliotecas de péptidos superpuestos basadas en Wuhan-Hu-1, en lugar de adaptadas a las variantes de preocupación.

En resumen, nuestro estudio indicó que, en abril de 2022, alrededor de la mitad de la población de la CV se había infectado con el SARS-CoV-2 y, debido a la vacunación extensiva, presentaba inmunidad híbrida. Actualmente, el sublinaje BA.5 de Ómicron predomina en la CV. El gran porcentaje de participantes con respuestas detectables de anticuerpos funcionales y células T contra el SARS-CoV-2, que pueden presentar, en cierta medida, reacciones cruzadas con esta subvariante, sugirió una gravedad anticipada menor en comparación con oleadas previas. Aunque queda pendiente de confirmación en estudios más amplios, este aspecto es relevante para la toma de decisiones en materia de salud pública.

2. Comparación del rendimiento de dos inmunoensayos de quimioluminiscencia para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos a la espícula del SARS-CoV-2 en suero

Los resultados expuestos en este segundo apartado corresponden al segundo trabajo (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2022) en el que se comparó el rendimiento del inmunoensayo de Roche (Elecsys[®] anti-SARS-CoV-2 S) frente al mostrado por el de DiaSorin (LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG) a la hora de detectar y cuantificar anticuerpos dirigidos frente a la espícula del SARS-CoV-2. El primero de ellos detecta anticuerpos totales (IgG/IgM/IgA) frente al dominio RBD de la proteína S, mientras que el inmunoensayo de DiaSorin mide IgG frente a la proteína S de SARS-CoV-2 en su conformación trimérica. Estas determinaciones se realizaron en sueros de participantes clasificados según su estado de vacunación e infección por SARS-CoV-2.

2.1 Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 1176 sueros de 797 sujetos pertenecientes al Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, de los cuales 286 sueros se recogieron de 204 Vac-Ex, 581 de 316 Vac-N, 147 de 134 Unvac-Ex, y 162 de 143 Unvac-N. Como dato relevante, se dispuso del registro de una PDIA positiva en 232 pacientes. Según la prevalencia de las variantes de SARS-CoV-2 en la CV en el momento del diagnóstico, la variante ancestral de Wuhan-Hu-1, Alfa, Delta y Ómicron fueron presuntamente responsables de 13, 114, 100 y 6 casos, respectivamente. Para los sujetos con un registro positivo para una PDIA, la mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la determinación serológica fue de 120 días (IQR, 30-320 días) en general, y de 172,5 (IQR, 18,3-281,8) y 29 días (IQR, 6,3-110,5) en vacunados y no vacunados, respectivamente. Se observó, además, que en participantes vacunados, la mediana del tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna recibida y la recogida de los sueros, fue de 51 días (IQR, 19,3-103,8) para los pacientes naïve, y de 98 días (IQR, 30,3-180,3) para aquellos con una infección previa por SARS-CoV-2.

2.2 Concordancia cualitativa entre inmunoensayos

En general, un número mayor de sueros dio resultados positivos con el ensayo de Roche en comparación con el ensayo de DiaSorin (907 vs. 790; $p = 0,45$; $\kappa: 0,69$; IC

95%: 0,71-0,84), lo que se traduce en que el ensayo de Roche mostró una mayor sensibilidad para la detección de la exposición o vacunación previas (89,3% vs. 77,6%). Esto concordaba en todos los grupos de estudio, excepto en Unvac-N, pero sólo alcanzó significación estadística en el caso de los sueros de individuos Unvac-Ex ($p \leq 0,001$) (Tabla V.6). No obstante, la concordancia entre los resultados proporcionados por los dos inmunoensayos difirió entre los grupos, siendo mayor para los sueros de Vac-N (κ : 0,58; IQR: 0,50-0,65) que para los sueros de Vac-Ex (κ : 0,19; IQR: -0,14 a 0,52) o Unvac-Ex (κ : 0,18; IQR: 0,06-0,30).

La tasa de resultados discordantes, en la mayoría de los casos anti-RBD positivo/anti-S-trimérico negativo, fueron mayores entre los sueros de Unvac-Ex (34,7%), seguidos de Vac-N (14,6%) y Vac-Ex (2,7%) como así sugiere la Tabla V.6 y la Figura V.6. La especificidad de ambos ensayos se calculó teniendo en cuenta únicamente los sueros de individuos Unvac-N, y resultó ser del 98,8% para el ensayo de Roche y del 98,1% para el ensayo de DiaSorin. Curiosamente, la sensibilidad global del ensayo de DiaSorin puede incrementar en un 11% (88,9%), si se reduce el umbral de anticuerpos como punto de corte para la positividad de la prueba de 33,8 (como recomienda el fabricante) a 4,9 BAU/ml sin conllevar ello una disminución importante de la especificidad (de 98,1% a 95,1%).

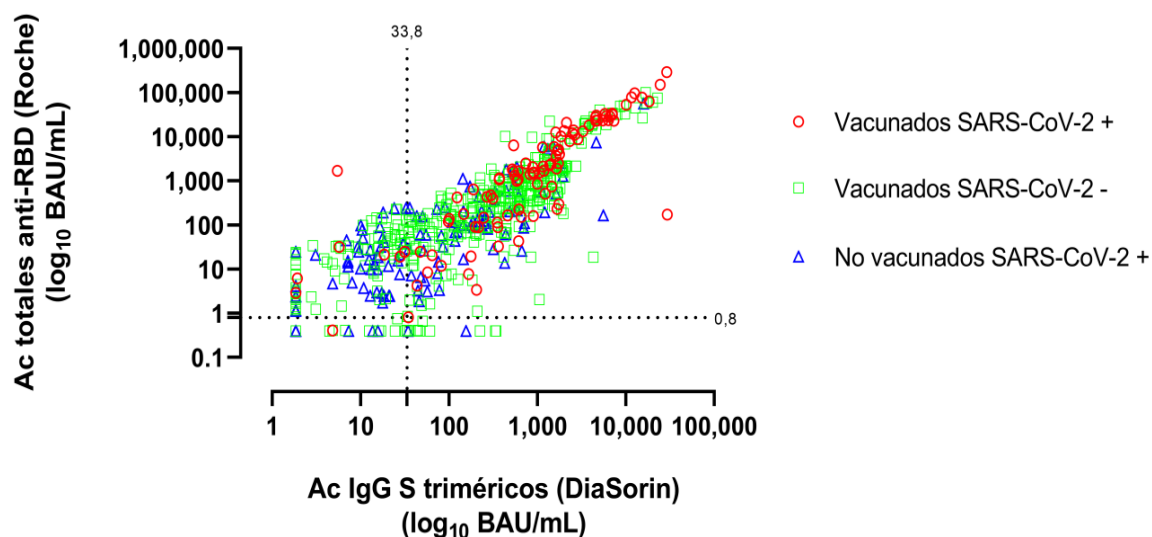


Figura V.6. Niveles de anticuerpos (en BAU/ml) medidos por los ensayos de Roche Elecsys[®] anti-SARS-CoV-2 S y LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG en sueros de individuos que presentaban diferentes estados de vacunación e infección por SARS-CoV-2. Se muestran los umbrales de positividad de ambos ensayos.

Tabla V.6. Resultados cualitativos arrojados por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin según el estado de vacunación y de infección por SARS-CoV-2 de los participantes.

Parámetro	Grupo de estudio			
	Vacunados con infección previa (n=286)	Vacunados/naïve (n=581)	No vacunados con infección previa (n=147)	No vacunados/ naïve (n=162)
Anticuerpos totales anti-RBD detectables (%)	284 (99,3)	487 (83,8)	134 (91,2)	2 (1,2)
Anticuerpos IgG anti-S-triméricos detectables (%)	278 (97,2)	422 (72,6)	87 (59,2)	3 (1,9)
P valor ^a	0,62	0,058	<0,001	1,00
Índice kappa (95% IC)	0,19 (-0,14–0,52)	0,58 (0,50–0,65)	0,18 (0,06–0,30)	-
Porcentaje de concordancia positiva (PPA)	97.0	83.0	63.0	-
Porcentaje de concordancia negativa (NPA)	11.0	50.0	18.0	97.0
Resultados discordantes				
Anticuerpos totales anti-RBD positivos/ Anticuerpos IgG anti-S-triméricos negativos (%)	7 (2,4)	75 (12,9)	49 (33,3)	2 (1,2)
Anticuerpos totales anti- RBD negativos/ Anticuerpos IgG anti-S- triméricos positivos (%)	1 (0,3)	10 (1,7)	2 (1,4)	3 (1,9)
S, proteína de la espícula de SARS-CoV-2; RBD, dominio de unión al receptor; ^a La comparación de frecuencias entre grupos (anticuerpos totales anti-RBD vs. anticuerpos IgG anti-S-triméricos) se realizó mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de χ^2 , según proceda.				

2.3 Concordancia cuantitativa entre inmunoensayos

De los 774 sueros que arrojaron resultados positivos en ambas pruebas serológicas, 469 mostraron niveles de anticuerpos que se situaban en el intervalo cuantitativo de ambos inmunoensayos y se incluyeron en el análisis que se detalla a continuación. Los 305 sueros restantes arrojaron niveles de anticuerpos que no pudieron cuantificarse completamente mediante el inmunoensayo de DiaSorin ($n = 262$) o el inmunoensayo de Roche ($n = 208$), y que se excluyeron de los análisis. En general, los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos no difirieron significativamente (Tabla V.7); sin embargo, se observó una tendencia hacia valores BAU/ml más altos medidos por el ensayo de Roche para sueros de Vac-Ex; por el contrario, se observó una tendencia hacia valores BAU/ml más altos medidos por el ensayo de DiaSorin para sueros de Vac-N y Unvac-Ex. En general la correlación entre los niveles de anticuerpos cuantificados por ambos inmunoensayos fue fuerte ($\rho = 0,82$; IC 95%: 0,78-0,84; $p < 0,001$), y continuó siendo fuerte para los sueros de Vac-Ex ($\rho = 0,84$; IC 95%: 0,82-0,92; $p < 0,001$) y Vac-N ($\rho = 0,80$; IC 95%: 0,78-0,84; $p < 0,001$), pero solo fue moderada para los sueros Unvac-Ex ($\rho = 0,66$; IC 95%: 0,49-0,78; $p < 0,001$), siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p = 0,0048$).

Tabla V.7. Resultados cuantitativos arrojados por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin según el estado de vacunación e infección por SARS-CoV-2 de los participantes

Parámetro	Vac-Ex (n=94)	Vac-N (n=305)	Unvac-Ex (n=70)
Niveles de anticuerpos totales anti-RBD (BAU/ml)	1.868 (213,8–13.313)	429,6 (122,6–1.441)	135,4 (53,7–530,2)
Niveles de anticuerpos IgG anti-S-triméricos (BAU/ml)	1.170 (366,4–2.690)	495 (180–1.241)	226,5 (80,63–586,3)
P valor para la comparación de medianas ^a	0,09	0,55	0,09
Correlación entre los niveles de anti-RBD y anti-S-triméricos (valor rho/P valor) ^b	0,88/<0,001	0,80/<0,001	0,66/<0,001

S, proteína de la espícula del SARS-CoV-2; RBD, dominio de unión al receptor.

^aPrueba U de Mann-Whitney .

^bPrueba de correlación de Spearman.

Para comparar los resultados cuantitativos arrojados por los dos inmunoensayos a través de diferentes rangos de concentración de anticuerpos, agrupamos arbitrariamente los sueros en cuatro categorías basadas en los resultados del inmunoensayo de DiaSorin: <250, 250-1.000, 1.001-2.080 y >2.080 BAU/ml. Como se muestra en la Tabla V.8, los niveles de anticuerpos cuantificados por ambos inmunoensayos no fueron significativamente diferentes cuando correspondieron a <1.000 BAU/ml; en cambio, para los sueros ≥ 1.000 BAU/ml, el ensayo de Roche arrojó resultados significativamente más altos independientemente del estado de vacunación y de infección por SARS-CoV-2 de los participantes. El diagrama de Bland-Altman representado en la Figura V.7 muestra el impacto de la concentración de anticuerpos en el nivel de discordancia entre los valores cuantitativos medidos por los dos inmunoensayos (A, todos los sueros; B, sueros con <1.000 BAU/ml; C, sueros con ≥ 1.000 BAU/ml, cuantificados mediante el ensayo DiaSorin).

Tabla V.8. Resultados cuantitativos arrojados por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin según la concentración de anticuerpos

Parámetro	Resultados cuantitativos de anticuerpos IgG anti-S-triméricos			
	<250 BAU/ml (n= 153)	250-1.000 BAU/ml (n= 159)	1.001-2.080 BAU/ml (n= 94)	>2.080 BAU/ml (n= 63)
Niveles de anticuerpos totales anti-RBD en BAU/ml. Mediana (IQR)	88,45 (25,09–172,7)	467,9 (206,4–1.090)	1.756 (719–3.775)	23.476 (13.940–39.904)
Niveles de anticuerpos IgG anti-S-triméricos en BAU/ml. Mediana (IQR)	97,10 (51,25–170,5)	534 (368–686)	1.405 (1.208–1.733)	5.490 (3.520–9.790)
P valor para la comparación de medianas ^a	0,87	0,13	0,007	<0,001
Correlación entre los niveles de anti-RBD y anti-S-triméricos (valor rho/P valor) ^b	0,42/ <0,001	0,34/ <0,001	0,18/0,07	0,78/<0,001
IQR, rango intercuartílico; RBD, dominio de unión al receptor.				
^a Prueba de rangos con signos de Wilcoxon.				
^b Prueba de correlación de Spearman.				

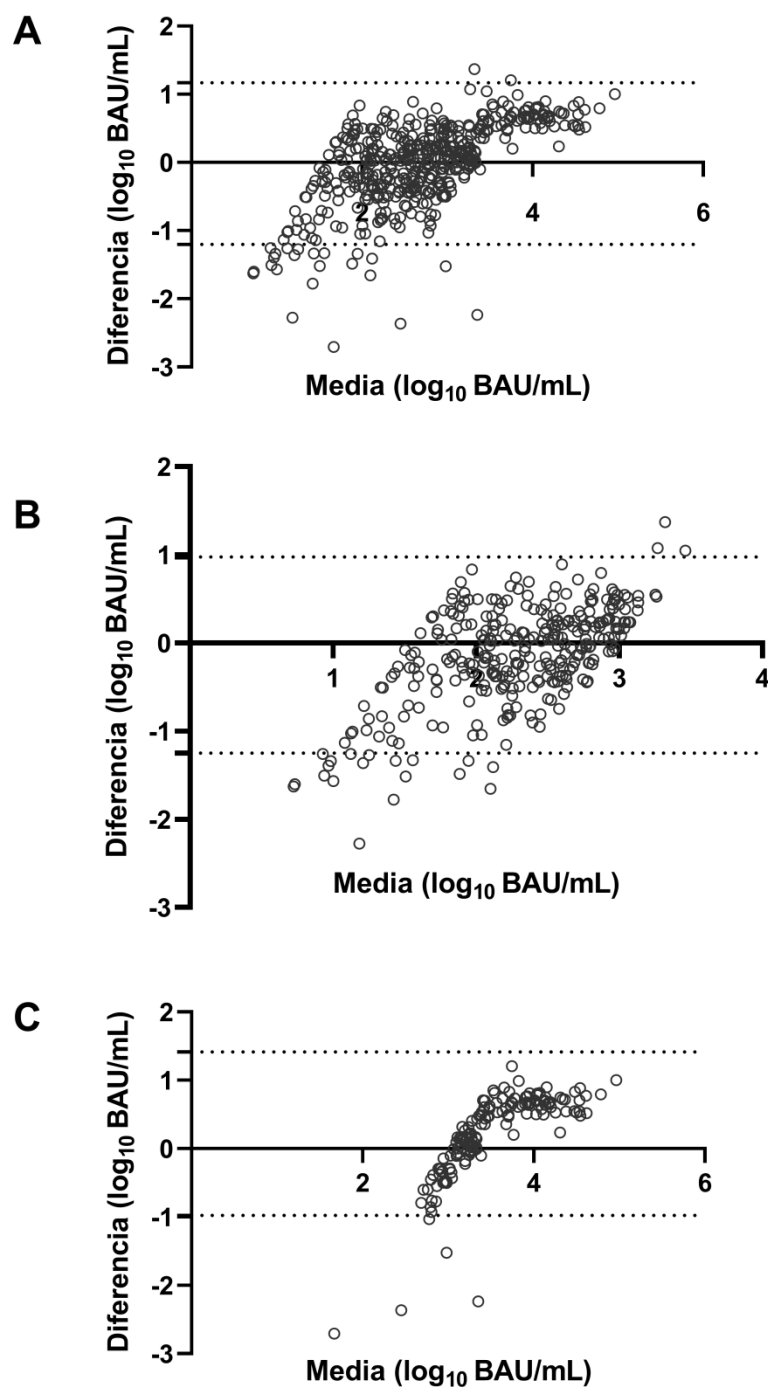


Figura V.7. Diagrama Bland-Altman para los ensayos Roche Elecsys[®] anti-SARS-CoV-2 S y LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG para todos los sueros incluidos en el análisis (A) y sueros que presentaron <1.000 BAU/ml (B) o ≥1.000 BAU/ml (C), medidos por el inmunoensayo LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG. Los gráficos muestran la tendencia en log₁₀ BAU/ml.

2.4 Correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos y los anticuerpos neutralizantes

Se evaluó la capacidad de neutralización del virus de la estomatitis vesicular (VSV) pseudotipado con diferentes genotipos de la proteína S (Wuhan-Hu-1/Ómicron BA.1 y BA.2) de un total de 127 sueros elegidos al azar de entre los que arrojaron resultados positivos en los ensayos de Roche y DiaSorin. Estos sueros fueron recogidos de personas totalmente vacunadas (mediana de edad: 62 años; IQR: 44-82; 62 hombres/65 mujeres) que en el momento de la prueba eran naïve ($n = 88$) o con infección previa por SARS-CoV-2 ($n = 39$). La tasa de sueros con NtAb detectables fue mayor frente a Wuhan-Hu-1 (89%) que frente a Ómicron BA.1 (56%) o BA.2 (70%; Tabla V.9). En general, los títulos de NtAb fueron más altos para Wuhan-Hu-1 seguido de Ómicron BA.1 y BA.2. Se encontraron diferencias importantes entre Vac-Ex y Vac-N; En Vac-Ex se observó una mayor tasa de sueros con NtAb detectables y mayores títulos de NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 en comparación con Vac-N ($p < 0,001$ para ambas comparaciones); por el contrario, la tasa de NtAb detectables contra BA.2 fue mayor en Vac-N en comparación con Vac-Ex ($p = 0,015$) aunque los niveles de anticuerpos fueron comparables en ambos grupos ($p = 0,92$) (Tabla V.9).

Tabla V.9. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra las (sub)variantes de SARS-CoV-2 en sueros que fueron positivos en los inmunoensayos de Roche y DiaSorin recogidos de personas vacunadas

(Sub)variante de SARS-CoV-2	Nº de sueros que fueron positivos (%) ^a /Mediana del título de NtAb (IQR)	
	Sin infección previa por SARS-CoV-2	Con infección previa por SARS-CoV-2
Wuhan-Hu-1	74 (84)/445 (124–1.724)	39 (100)/2.122 (585–7.578)
Ómicron BA.1	39 (44)/20 (20–92)	32 (82)/276 (20–798)
Ómicron BA.2	38 (76)/107 (25–566)	20 (60)/60 (25–505)

NtAb, anticuerpos neutralizantes,

^aSe analizaron un total de 127 sueros para determinar la cuantificación de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1. Para detectar NtAb frente a Ómicron BA.2, se analizaron un total de 83 sueros.

En general, la correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin con los títulos de NtAb fue moderada para los dirigidos contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1. Sin embargo, fue débil o inexistente para los dirigidos contra BA.2 cómo se puede observar en la Tabla V.10. La correlación entre los NtAb de todas las (sub)variantes fue siempre mayor en los sueros de Vac-N que en los Vac-Ex, independientemente del inmunoensayo utilizado. Sin embargo, las diferencias alcanzaron significación estadística en el caso de los NtAb frente a Wuhan-Hu-1 ($p = 0,015$ y $0,003$, para Roche y Diasorin, respectivamente) y Ómicron BA.2 ($p = 0,007$ y $0,003$, respectivamente) pero no en aquellos frente a BA.1 ($p = 0,5$ y $0,89$).

Tabla V.10. Correlación entre los valores cuantitativos arrojados por los inmunoensayos (electro)quimioluminiscentes de Roche y DiaSorin y los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes (sub)variantes del SARS-CoV-2 en individuos vacunados según su estado de infección por SARS-CoV-2

(Sub)variante de SARS-CoV-2 ^a	Valor Rho [IC 95%] (P valor) para la correlación entre los inmunoensayos de Roche/DiaSorin y los títulos de NtAb		
	Todos los participantes	Sin infección previa por SARS-CoV-2	Con infección previa por SARS-CoV-2
Wuhan-Hu-1	0,69 [0,58-0,77]	0,71 [0,60-0,81]	0,40 [0,09-0,64]
	(<0,001)/	(<0,001)/	(<0,001)/
	0,71 [0,61-0,79]	0,75 [0,64-0,83]	0,37 [0,06-0,62]
	(<0,001)	(<0,001)	(<0,001)
Ómicron BA.1	0,64 [0,52-0,73]	0,61 [0,46-0,73]	0,52 [0,24-0,72]
	(<0,001)/	(<0,001)/	(<0,001)/
	0,67 [0,55-0,75]	0,60 [0,45-0,73]	0,59 [0,33-0,77]
	(<0,001)	(<0,001)	(<0,001)
Ómicron BA.2	0,30 [0,08-0,49]	0,52 [0,27-0,70]	-0,05 [-0,34 a 0,31]
	(<0,001)/	(<0,001)/	(0,78)/
	0,24 [0,02-0,44]	0,49 [0,02-0,68]	-0,15 [-0,48 a 0,21]
	(<0,001)	(<0,001)	(0,4)

NtAb, anticuerpos neutralizantes.

^aSe analizaron 127 sueros para cuantificar NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1. Para detectar NtAb frente a Ómicron BA.2, se analizaron un total de 83 sueros.

A continuación, mediante la construcción de curvas ROC, determinamos los umbrales de nivel de anticuerpos medidos por los inmunoensayos que predecirían de forma óptima (máxima sensibilidad y especificidad combinadas) la detección de NtAb frente a las diferentes (sub)variantes. Como se muestra en la Tabla V.11, independientemente de si los sueros se analizaron en la plataforma de Roche o DiaSorin, los puntos de corte de los anticuerpos asociados con la detección de NtAb fueron los más bajos para Wuhan-Hu-1 y los más altos (y menos precisos) para Ómicron BA.2. Sin embargo, los niveles de anticuerpos medidos con el inmunoensayo de Roche asociados con la detección de NtAb contra la variante Wuhan-Hu-1, fueron 1,9 veces más bajos que los obtenidos con el inmunoensayo de DiaSorin. Por el contrario, fueron necesarios niveles más altos (2,8 veces más) de anticuerpos medidos por el inmunoensayo de Roche en comparación con el de DiaSorin para predecir la detección de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Omicron BA.1 y BA.2. Un análisis similar utilizando solo sueros de Vac-N arrojó resultados similares (Tabla V.12).

Tabla V.11. Umbrales de nivel de anticuerpos medidos por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin que predicen la detección de anticuerpos neutralizantes de unión a la espícula según la (sub)variante del SARS-CoV-2

Inmunoensayo	(Sub)variante de SARS-CoV-2 ^a	Umbral de anticuerpos (BAU/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC (P valor)
Roche	Wuhan-Hu-1	> 300	92,04	92,86	0,96 (<0,001)
	Ómicron BA.1	> 5.257	88,73	92,86	0,95 (<0,001)
	Ómicron BA.2	> 8.816	74,32	77,78	0,74 (0,016)
DiaSorin	Wuhan-Hu-1	> 586	83,19	92,86	0,96 (<0,001)
	Ómicron BA.1	> 1.810	81,69	92,86	0,94 (<0,001)
	Ómicron BA.2	> 3.055	63,51	77,78	0,71 (0,039)

AUC, área bajo la curva ROC. BAU, unidades de anticuerpos de unión.

^aSe analizaron 127 sueros para cuantificar NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1. Para detectar NtAb frente a Ómicron BA.2, se analizaron un total de 83 sueros.

Tabla V.12. Umbrales de nivel de anticuerpos medidos por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin que predicen la detección de los anticuerpos neutralizantes de unión a la espícula en participantes vacunados/naïve según la (sub)variante de SARS-CoV-2

Inmunoensayo	(Sub)variante de SARS-CoV-2 ^a	Umbral de anticuerpos (BAU/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC (P valor)
Roche	Wuhan-Hu-1	> 300	90,54	92,86	0,96 (<0,001)
	Ómicron BA.1	> 4.123	92,31	91,84	0,95 (<0,001)
	Ómicron BA.2	> 8.851	69,05	87,50	0,77 (0,012)
DiaSorin	Wuhan-Hu-1	> 586	77,03	92,86	0,95 (<0,001)
	Ómicron BA.1	> 1.505	79,49	91,84	0,94 (<0,001)
	Ómicron BA.2	> 3.055	61,90	87,50	0,72 (0,05)

AUC, área bajo la curva ROC. BAU, unidades de anticuerpos de unión.

^aSe analizaron 88 sueros para cuantificar NtAb contra Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1.

Para detectar NtAb frente a Ómicron BA.2, se analizaron un total de 50 sueros.

Hasta la fecha, la aprobación por parte de organismos internacionales (FDA o ECDC) de inmunoensayos cuantitativos dirigidos frente a la proteína S del SARS-CoV-2 se limita a su uso con fines investigadores, evaluación de la inmunogenicidad de vacunas en ensayos clínicos y estudios de seroprevalencia. Más allá de su uso para estos fines, los inmunoensayos pueden ser fundamentales para la toma de decisiones clínicas a nivel individual en un futuro próximo. Por ejemplo, la Conferencia Europea sobre Infecciones en Leucemia (ECIL) recomienda que los pacientes oncohematológicos que hayan sido vacunados antes o durante el tratamiento hematológico sean evaluados 6 meses después del final del tratamiento y revacunados si presentan títulos bajos de anticuerpos, aunque no se especifica una definición concreta para los títulos bajos de anticuerpos. A este respecto, se ha sugerido un umbral de alrededor de 250 BAU/ml para discriminar entre los que presentan (por encima) o no (por debajo) una protección razonable contra la enfermedad sintomática (al menos la enfermedad causada por la variante ancestral), tanto en pacientes con trastornos hematológicos (146) como en la población general (87,147). Asimismo, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) recomienda en la actualidad la infusión de Evusheld para individuos altamente vulnerables, preferentemente cuando se documenta seronegatividad frente al SARS-CoV-2 o niveles bajos de anticuerpos anti-S (<260 BAU/ml) (114).

En este contexto, la comparación directa del rendimiento analítico y clínico de los inmunoensayos cuantitativos específicos anti-S disponibles en el mercado es de vital importancia, incluso cuando estas pruebas detectan diferentes isotipos de anticuerpos o incorporan diferentes dianas antigénicas. En este caso, se compararon dos ensayos ampliamente utilizados, el inmunoensayo de Roche que cuantifica anticuerpos totales anti-RBD y el de DiaSorin que mide los anticuerpos dirigidos frente a la proteína S en su conformación trimérica. Esto se hizo mediante la realización de pruebas paralelas de un gran número de sueros de individuos que presentaban diferentes estados de vacunación e infección por SARS-CoV-2. También se investigó la correlación entre los niveles de anticuerpos cuantificados por los dos inmunoensayos con los títulos de NtAb; estos se midieron mediante un ensayo de neutralización de virus pseudotipado con tres genotipos diferentes de la espícula: la variante ancestral, presente en las vacunas aprobadas, y Ómicron BA.1 y BA.2, pertenecientes a subvariantes dominantes o en

rápida expansión, respectivamente, en nuestro entorno en el momento del diseño del estudio.

Desde un punto de vista cualitativo, ambos ensayos se correlacionaron razonablemente bien (índice Kappa: 0,68); no obstante, el ensayo de Roche arrojó un mayor número de resultados positivos que el ensayo de DiaSorin, mostrando así una mayor sensibilidad general para la detección de la exposición previa al virus, la vacunación o ambos. Curiosamente, el PPA fue mayor para sueros de Vac-Ex (0,97) o Vac-N (0,83) que para sueros de Unvac-Ex (0,63). Las diferencias en el arsenal de epítomos presentes en la proteína S, que inducen respuestas de anticuerpos más fuertes tras la vacunación o la infección natural, junto con la variabilidad de la respuesta inmune generada podrían explicar esta observación (148,149). Además, el hecho de que los sujetos Unvac-Ex y Vac-Ex presenten una cinética potencialmente variable de la disminución de anticuerpos con el tiempo, también puede haber influido en los resultados. En particular, la concordancia cualitativa entre inmunoensayos fue mayor en sueros de Vac-N (índice Kappa: 0,58). Al considerar únicamente los sueros de individuos Unvac-N, encontramos que la especificidad de ambos ensayos era comparable (98,8% para el ensayo de Roche y 98,1% para el ensayo de DiaSorin).

Es importante destacar que la diferencia de sensibilidad global entre los dos inmunoensayos puede reducirse sustancialmente disminuyendo el punto de corte de positividad del ensayo de DiaSorin de 33,8 a 4,9 BAU/ml, sin que ello suponga una disminución significativa de la especificidad, ya que alrededor del 80% de los sueros que arrojaron un valor positivo por el inmunoensayo de Roche y negativo por el de DiaSorin se situaron dentro del intervalo 4,9 – 33,8 BAU/ml. También es importante señalar que, si bien la sensibilidad global calculada de ambos ensayos fue sustancialmente inferior a la indicada por el fabricante respectivo (98,8% y 98,7% para el ensayo de Roche y de DiaSorin, respectivamente), la especificidad solo disminuyó ligeramente (99,8% y 99,5% para el ensayo de Roche y de DiaSorin, respectivamente, según el fabricante correspondiente). Para estimar la relevancia de esta aparente discrepancia hay que tener en cuenta que ambos ensayos fueron evaluados originalmente por los fabricantes utilizando sueros extraídos de individuos no vacunados y poco después de haber sido infectados por la variante ancestral Wuhan-Hu-1 del SARS-CoV-2.

Desde una perspectiva cuantitativa, no se observaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos medidos por los dos inmunoensayos para sueros pertenecientes a cualquiera de los grupos de estudio. No obstante, estos se correlacionaron en menor medida para los sueros de Unvac-Ex ($\rho = 0,66$) que para los de Vac-Ex ($\rho = 0,88$) y Vac-N ($\rho = 0,80$), probablemente debido a diferencias en la especificidad antigénica de los anticuerpos generados tras la vacunación o infección natural. En concordancia con nuestros hallazgos, estudios previos informaron de niveles de correlación entre los inmunoensayos de Roche y DiaSorin que oscilaban entre 0,80 y 0,93 en paneles compuestos principalmente por sueros de individuos Vac-N (74,150–154). La considerable diferencia entre los niveles de correlación entre Vac-Ex y Unvac-Ex observada en nuestro estudio también es congruente con los hallazgos de Lukaszuk et al. (153). Una observación relativamente novedosa de este estudio está relacionada con el impacto que tiene la concentración de anticuerpos en la magnitud de las discordancias cuantitativas entre los dos inmunoensayos; en efecto, para sueros con <1.000 BAU/ml, el ensayo de DiaSorin arrojó valores más altos que el de Roche, mientras que sucedió lo contrario para sueros >1.000 BAU/ml, en los que el ensayo de Roche dio valores más altos respecto a los devueltos por el ensayo de DiaSorin. Aunque no explícitamente, la existencia de tales diferencias en las estimaciones cuantitativas de los niveles de anticuerpos proporcionadas por los inmunoensayos de Roche y DiaSorin puede deducirse de los datos obtenidos en estudios anteriores (74,150,153,154).

Posteriormente, evaluamos la correlación entre los niveles de anticuerpos devueltos por los dos inmunoensayos y los títulos de NtAb frente a Wuhan-Hu-1, Ómicron BA.1 y BA.2 medidos mediante un ensayo de neutralización del virus S-pseudotipado. Para ello, seleccionamos al azar 127 sueros recogidos de Vac-Ex y Vac-N. Dado el momento en el que se recogieron los sueros, tanto la tasa de sueros que mostraron actividad neutralizante (cualquier título) como los títulos de NtAb, fueron mayores frente a la variante ancestral que frente a Ómicron BA.1 y BA.2. Se realizaron varias observaciones importantes sobre el grado de correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por ambos inmunoensayos y los títulos de NtAb:

En primer lugar, el nivel de correlación fue sustancialmente inferior para los sueros del grupo Vac-Ex en comparación con los del grupo Vac-N, independientemente de la variante SARS-CoV-2 considerada; esta diferencia fue claramente evidente en el

caso de los NtAb contra Ómicron BA.2 (ρ : 0,52 en Vac-N frente a ρ : -0,05 en Vac-Ex). En segundo lugar, los puntos de corte del nivel de anticuerpos que predicen la detección de cualquier título positivo de NtAb variaba ampliamente en función de la (sub)variante del SARS-CoV-2 considerada y del inmunoensayo empleado. Lo mismo ocurrió cuando los sueros de los individuos Vac-N se analizaron por separado. Cabe destacar que optamos por un resultado binario para la categorización de los resultados de NtAb (detectable frente a indetectable), ya que no se ha definido claramente ningún umbral de NtAb para la protección frente a la infección por cualquier variante del SARS-CoV-2. En efecto, la detección de NtAb de Wuhan-Hu-1 se asoció a niveles de anticuerpos más bajos medidos por ambos inmunoensayos de unión que en el caso de las subvariantes Ómicron; este hecho no fue inesperado, ya que ambos inmunoensayos contienen la proteína S o RBD como antígenos diana derivados de la variante ancestral, y la variante Wuhan-Hu-1 diverge sustancialmente de los sublinajes Ómicron (155). En tercer lugar, los niveles de anticuerpos de unión a RBD y S-triméricos que predecían NtAb contra Ómicron BA.2 fueron sustancialmente superiores a los de Ómicron BA.1, independientemente del inmunoensayo utilizado, lo que probablemente refleje el mayor grado de variación de la secuencia dentro de los sitios críticos de unión de anticuerpos en la proteína S de BA.2 (155); además, la predicción de la detectabilidad de NtAb frente a Ómicron BA.2 fue algo imprecisa (AUC: 0,71). En cuarto lugar, los umbrales de nivel de anticuerpos que predicen la detección de NtAb frente a todas las variantes del SARS-CoV-2 analizadas fueron sustancialmente diferentes para los ensayos de Roche y DiaSorin.

El presente estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, como ya se ha indicado, los sueros que arrojaron resultados cualitativos contradictorios en los distintos inmunoensayos no se analizaron más a fondo para tener en cuenta las discrepancias, lo que impidió realizar un análisis de especificidad óptimo. En segundo lugar, no se analizaron sueros de individuos Unvac-Ex en el ensayo de NtAb. Por otra parte, el estudio presenta algunos puntos fuertes como el gran número de sueros analizados, la heterogeneidad de los participantes en términos de vacunación y estado de infección por el SARS-CoV-2, y el uso de ensayos de neutralización del virus S-pseudotipado en lugar de un método de neutralización subrogado.

En resumen, nuestros datos revelaron que ni los resultados cualitativos ni los cuantitativos de los inmunoensayos de Roche y DiaSorin (este último a pesar de la calibración con el primer estándar de anticuerpos SARS-CoV-2 de la OMS) son necesariamente intercambiables. En ambos ensayos, además, se observó que el rendimiento analítico estaba muy influido por la vacunación de los individuos y el estado de infección por SARS-CoV-2. Es importante señalar que se observó un impacto de la concentración de anticuerpos en la magnitud de las discordancias cuantitativas entre los dos inmunoensayos. Nuestros datos también ponen de relieve la necesidad de evaluar continuamente el rendimiento de los inmunoensayos basados en S en entornos epidemiológicos dominados por (sub)variantes emergentes; en particular, es importante evaluar la correlación entre las BAU proporcionadas y los títulos de NtAb. El uso generalizado en el futuro de indicadores como la ausencia de anticuerpos dirigidos contra S o un determinado umbral de nivel de anticuerpos para determinar la necesidad de una dosis adicional de vacuna (basada en Wuhan-Hu-1 o adaptada) o terapias de anticuerpos monoclonales dirigidos contra S, puede aumentar el impacto clínico de las diferencias entre ensayos en cuanto a sensibilidad y rendimiento cuantitativo. En este contexto, nuestros datos pueden contribuir a una selección óptima del inmunoensayo.

3. Análisis comparativo de los anticuerpos neutralizantes contra Ómicron BA.4/5 tras la vacunación frente a la COVID-19 en personas con infección previa por SARS-CoV-2 frente a personas naïve en la población general

El tercer trabajo (Camacho J, Zulaica J. J. Infect. 2023) queda englobado en un estudio transversal de seroprevalencia del SARS-CoV-2 (análogo al primer artículo), de ámbito regional y de base poblacional que se llevó a cabo en las zonas de atención primaria de la CV en España durante octubre de 2022. Para su realización, se analizaron los sueros de 130 individuos (62 hombres/68 mujeres; mediana de edad, 56 años; IQR, 34-72) de un total de 787 participantes.

El estudio se basa en lo publicado por Dimeglio et al. en el *Journal of Infection*, donde se demuestra que la infección irruptiva causada por la subvariante Ómicron BA.1 del SARS-CoV-2, tras la administración de dos o tres dosis de la vacuna contra la COVID-19, genera en la población general una respuesta de anticuerpos neutralizantes (NtAb) homotípicos (BA.1) más potente que la vacunación por sí sola (119). En este estudio, la mayoría de los individuos reclutados eran jóvenes (edad media, 39 años) y las mediciones de NtAb (utilizando un aislado vivo de la subvariante Ómicron BA.1 del SARS-CoV-2) se realizaron poco después de recibir la última dosis de vacuna (entre 3 y 6 semanas).

Quisimos ampliar los estudios de Dimeglio et al. para demostrar que mucho tiempo después de la vacunación completa o de refuerzo (mediana, 287 días; IQR, 260-332), los individuos con una infección previa por SARS-CoV-2 muestran respuestas NtAb más robustas contra Ómicron BA.4/5 que sus homólogos vacunados naïve, independientemente de si la infección debió a las variantes Wuhan-Hu-1, Ómicron BA.1 u Ómicron BA.2.

3.1 Características de los pacientes

De los 130 participantes, 91 se clasificaron como individuos con infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex) tras la detección de anticuerpos IgG contra la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 N; Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Veintidós de los 91 tuvieron un registro positivo de

un ensayo de RT-PCR en muestras nasofaríngeas (RedMiVa). Los 39 participantes restantes se consideraron naïve (Vac-N), ya que carecieron de IgG anti-N y no tuvieron registro de infección previa. Como se muestra en la Tabla V.13, los participantes Vac-Ex y Vac-N se emparejaron por sexo, plataforma vacunal empleada, recepción de una dosis de refuerzo, tipo de refuerzo (homólogo frente a heterólogo) y tiempo transcurrido desde la última dosis vacunal. No obstante, los participantes Vac-N fueron significativamente más jóvenes ($p < 0,007$).

3.2 Análisis de la respuesta de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 en pacientes vacunados con y sin infección previa por SARS-CoV-2

La mayoría de los participantes Vac-Ex (100%) y Vac-N (94,7%) mostraron respuestas NtAb detectables contra la variante Wuhan-Hu-1 ($p = 0,30$). Por el contrario, el porcentaje de individuos Vac-N que mostraron NtAb detectables frente a Ómicron BA.4/5 fue significativamente inferior al de Vac-Ex (52,6% frente a 98,9%; $p < 0,001$). En general, como se muestra en la Figura V.8A, los títulos de NtAb frente a Ómicron BA.4/5 fueron significativamente más bajos que frente a Wuhan-Hu-1 tanto en Vac-Ex (mediana del título recíproco para BA.4/5 y Wuhan-Hu-1, respectivamente de 1.462; IQR, 536-4.803 frente a 11.398; IQR 4.652-62.500; $p < 0,001$) y Vac-N (mediana, 24; IQR, 10-204, frente a 1.504; IQR, 586-6.883; $p < 0,001$). No obstante, en comparación con Vac-N, Vac-Ex mostró títulos de NtAb significativamente más altos frente a Wuhan-Hu-1 (hasta 7 veces más; $p < 0,001$) y Ómicron BA.4/5 (hasta 61 veces más; $p < 0,001$), independientemente de si los participantes recibieron una pauta de vacunación normal o reforzada con una dosis de vacuna adicional.

De los 22 individuos Vac-Ex con un registro positivo de RT-PCR de SARS-CoV-2, en 13 la infección se documentó durante 2022 dentro de oleadas dominadas ($\geq 95\%$ de los casos) por BA.1 ($n = 6$) y BA.2 ($n = 7$), y antes de la aparición de BA.4/5 en la CV; los 9 individuos restantes contrajeron la infección por SARS-CoV-2 durante 2020/2021, antes de la aparición de la variante Ómicron en la CV. Tras el emparejamiento de los individuos de ambos grupos de comparación según el tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna, los títulos de NtAb frente a Ómicron BA.4/5, pero no frente a Wuhan-Hu-1 (Figura V.8B), fueron significativamente inferiores ($p < 0,001$) en los individuos que contrajeron la infección

antes de 2022. Es importante destacar que los individuos Vac-N mostraron títulos de NtAb más bajos frente a Wuhan-Hu-1 ($p < 0,001$) y Ómicron BA.4/5 ($p < 0,001$) que los Vac-Ex, independientemente del momento en que se documentó la infección por SARS-CoV-2.

Tabla V.13. Características de los participantes

Parámetro	Vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (n=91)	Vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (n=39)	P valor^a
Sexo: n° masculino/femenino, (%)	42/49 (46/54)	20/19 (51/49)	0,99
Edad (mediana años, IQR)	70 (31-67)	51 (48-82)	0,007
0-9	3 (3,3%)	2 (5,1%)	
10-19	8 (8,8%)	1 (2,6%)	
20-34	19 (20,9%)	2 (5,1%)	
35-49	14 (15,4%)	7 (18%)	
50-64	21 (23%)	5 (12,8%)	
65-79	20 (22%)	9 (23%)	
>80	6 (6,6%)	13 (33,3%)	
Plataforma vacunal: n° (%)			0,91
ARNm Comirnaty® (BioNTech /Pfizer)	54 (59)	29 (74)	
ARNm Spikevax® (Moderna / Lonza)	16 (17,6%)	5 (12,8)	
Vector viral Vaxzevria® (Oxford / AstraZeneca)	15 (16,5)	2 (5)	
Vector viral Jcovden® (JandJ / Janssen)	5 (5)	3 (7,7)	
Inactivada CoronaVac® (Sinovac Biotech)	1 (1)	0	
N° de dosis: n° (%)			0,99
Una	2 (2,20)	1 (2,6)	
Dos	25 (27,5)	10 (25,6)	
Tres	62 (68)	28 (71,8)	
Cuatro	2 (2,20)	0	
Dosis de refuerzo (Sí, %/No, %)	68 (75)/23 (25)	30 (77)/9 (23)	0,99
Tipo de refuerzo: n° (%)			0,96
Homólogo	28 (41)	15 (50)	
Heterólogo	40 (59)	14 (50)	
Días desde la última dosis de vacuna (mediana, IQR)	283 (260-322)	307 (267-336)	0,09

^a Se utilizó la prueba exacta de Fisher o U de Mann-Whitney, según procediese. Se indican los valores p exactos de dos caras. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

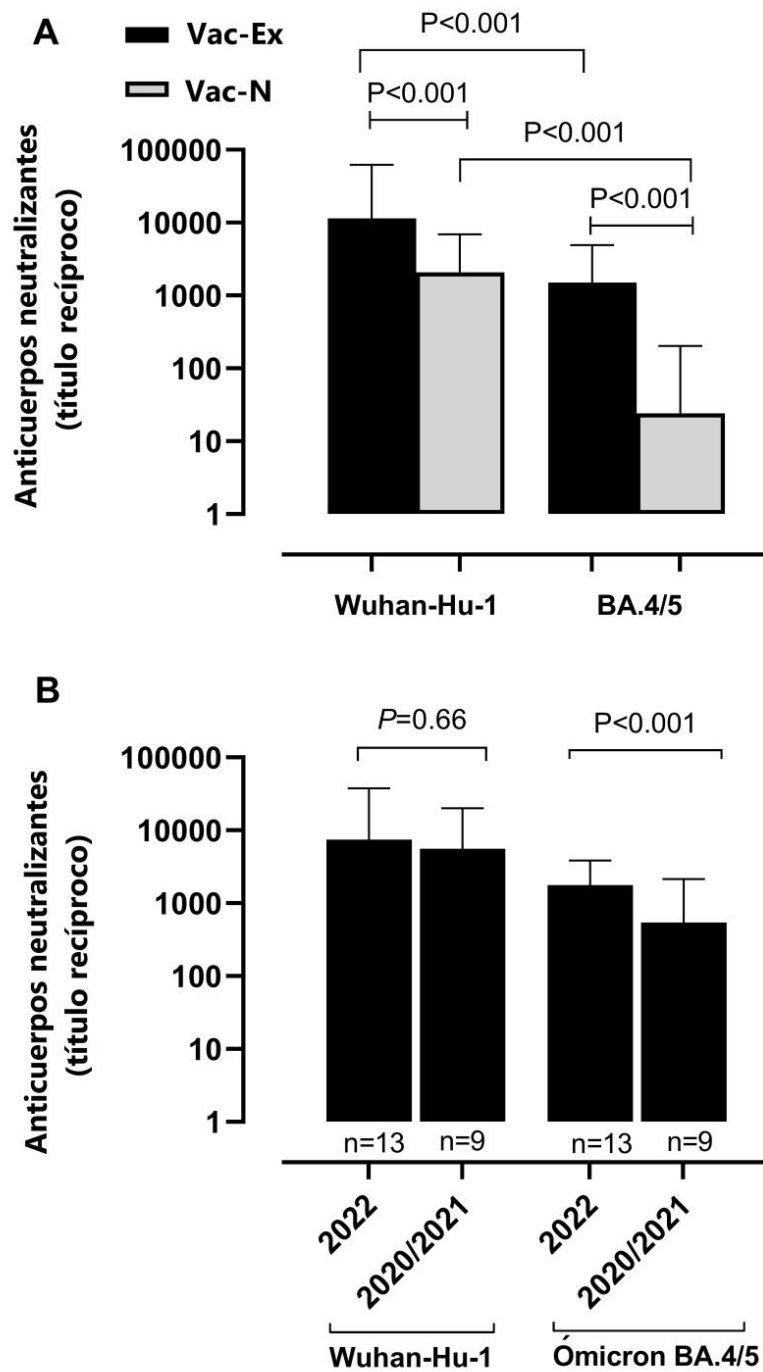


Figura V.8. Respuestas de anticuerpos neutralizantes (NtAb) frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 medidas mediante una técnica de virus de la estomatitis vesicular pseudotipado. (A) Títulos recíprocos de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 en vacunados con y sin infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex y Vac-N, respectivamente). (B) Títulos recíprocos de NtAb frente a Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.4/5 en participantes Vac-Ex con infección por SARS-CoV-2 documentada por RT-PCR. Se muestran valores de p para las comparaciones entre grupos (Prueba U de Mann-Whitney). Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

El estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, sólo se pudo documentar la fecha de infección por SARS-CoV-2 en un pequeño porcentaje de los participantes Vac-Ex. En segundo lugar, los linajes de SARS-CoV-2 no pudieron confirmarse mediante secuenciación en los casos confirmados mediante RT-PCR. En tercer lugar, no se pudo determinar con certeza si los participantes que sufrieron COVID-19 debido a Wuhan-Hu-1 se reinfectaron por Ómicron BA.1 y BA.2. En cuarto lugar, debido a la posibilidad de seroreversión de los anticuerpos contra la proteína N del virus, algunos participantes pudieron haber sido clasificados erróneamente como SARS-CoV-2 naïve.

En resumen, nuestro estudio concluye que, mucho tiempo después de la vacunación contra la COVID-19 con pautas completas o dosis de refuerzo (mediana de 287 días), los individuos del grupo Vac-Ex muestran una respuesta de anticuerpos neutralizantes (NtAb) significativamente más robusta contra la variante Ómicron BA.4/5 en comparación con el grupo Vac-N. Curiosamente, aunque la diferencia entre los grupos fue más marcada cuando los participantes que contrajeron la infección por Ómicron BA.1 o BA.2 se consideraron por separado, también se mantuvo para los que se infectaron por la variante ancestral Wuhan Hu-1 o las variantes pre-Ómicron de interés. Nuestra observación concuerda con los datos reportados en varias series de individuos vacunados frente a la COVID-19 (con o sin dosis de refuerzo) con plataformas basadas en ARNm o inactivadas contra el SARS-CoV-2 (156–160) y puede ayudar a la toma de decisiones en materia de salud pública con respecto a las políticas de vacunación frente a la COVID-19 en un futuro próximo.

4. Evaluación de la capacidad predictiva de un modelo de aprendizaje automático (*machine learning*) en la detección de actividad neutralizante de sueros frente a las subvariantes Ómicron BA.2 y BA.4/5

Los resultados que se exponen en este estudio se corresponden con el último artículo publicado (Camacho J, Albert E. J Med Virol. 2023) en el que se exploró la fiabilidad de un método de *machine learning* basado en árboles de clasificación y regresión (CART) para predecir los niveles de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2, que están fuertemente asociados con la presencia de respuestas detectables de NtAb frente a los sublinajes Ómicron BA.2 y BA.4/5 en la población general.

4.1 Características de los participantes incluidos en las cohortes de entrenamiento y validación

Se incluyeron un total de 931 participantes en la cohorte de entrenamiento (TC) y 781 en la cohorte de validación (VC). Las principales características de los participantes (edad, sexo y estado de vacunación e infección) se muestran en la Tabla V.14. Cabe destacar que el porcentaje de participantes vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex) fue significativamente mayor en la VC que en la TC (63% frente a 41%; $p < 0,01$).

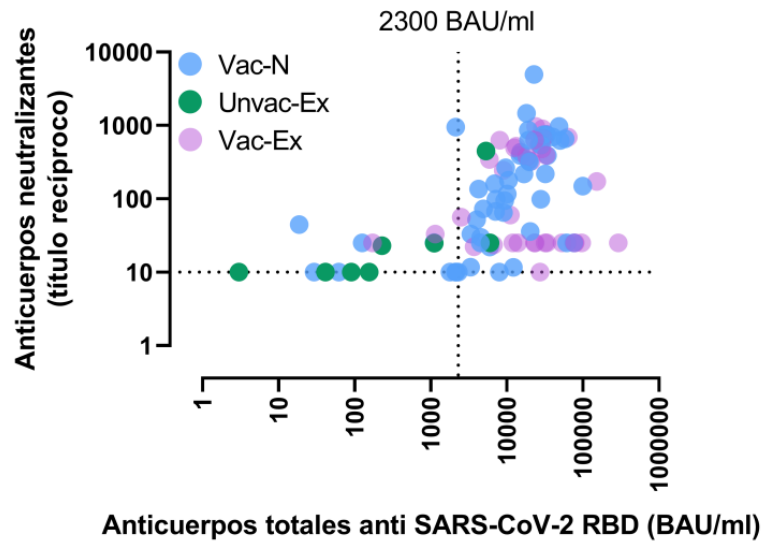
4.2 Niveles de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 en suero que predicen la detección de anticuerpos neutralizantes frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5

Un total de 100 sueros seleccionados al azar de 100 participantes diferentes fueron examinados para hallar niveles detectables de NtAb frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 (encontrados en 88 y 84 participantes, de forma respectiva), con una mediana de título recíproco IC_{50} de 148 (rango, 12-1.458) y 1.031 (rango, 24-62.500), respectivamente. El análisis ROC indicó que un umbral de anticuerpos totales anti-RBD de 2.300 BAU/ml discrimina eficazmente entre participantes con respuestas detectables de NtAb y aquellos con niveles indetectables. Este umbral mostró una sensibilidad del 90%, especificidad del 71% y precisión del 87% (AUC: 0,83; $p < 0,001$) para BA.2, y una sensibilidad del 88%, especificidad del 67% y precisión del 84% (AUC: 0,90; $p < 0,001$) para BA.4/5 (Figura V.9).

Tabla V.14. Características demográficas de los participantes incluidos en las cohortes de entrenamiento y validación.

Parámetro	Nº (%)	Unvac-N	Unvac-Ex	Vac-N	Vac-Ex
<i>Cohorte de entrenamiento</i>					
Edad (años)					
Todos	931 (100)	21 (2,3)	63 (6,8)	469 (50,4)	378 (40,6)
0-9	40 (4,3)	7 (33,3)	12 (19)	7 (1,5)	14 (3,7)
10-19	87 (9,3)	1 (4,8)	9 (14,3)	26 (5,5)	51 (13,5)
20-34	150 (16)	3 (14,3)	11 (17,5)	51 (10,9)	85 (22,5)
35-49	181 (19)	3 (14,3)	16 (25)	75 (16)	87 (23)
50-64	173 (18,6)	2 (9,5)	2 (3,2)	89 (19)	80 (21)
65-79	159 (17)	2 (9,5)	5 (7,9)	115 (24,5)	37 (9,8)
>80	141 (15)	3 (14,3)	8 (12,7)	106 (22,6)	24 (6,4)
Sexo					
Masculino	411 (44)	8 (38)	29 (46)	190 (41)	184 (49)
Femenino	520 (56)	13 (62)	34 (54)	279 (59)	194 (51)
<i>Cohorte de validación</i>					
Edad (años)					
Todos	787 (100)	8 (1)	61 (7,8)	218 (27,7)	500 (63,5)
0-9	56 (7,1)	5 (62,5)	25 (41)	5 (2,3)	21 (4,2)
10-19	59 (7,5)	-	4 (6,6)	5 (2,3)	50 (10)
20-34	119 (15,1)	1 (12,5)	10 (16,4)	14 (6,4)	94 (18,8)
35-49	146 (18,6)	-	8 (13,1)	40 (18,4)	98 (19,6)
50-64	156 (19,8)	-	7 (11,5)	40 (18,4)	109 (21,8)
65-79	140 (17,8)	1 (12,5)	2 (3,3)	57 (26,2)	80 (16)
>80	111 (14,1)	1 (12,5)	5 (8,2)	57 (26,2)	48 (9,6)
Sexo					
Masculino	352 (44,7)	4 (50)	25 (41)	104 (48)	219 (44)
Femenino	435 (55,3)	4 (50)	36 (59)	114 (52)	281 (56)

Omicron BA.2



Omicron BA.4/5

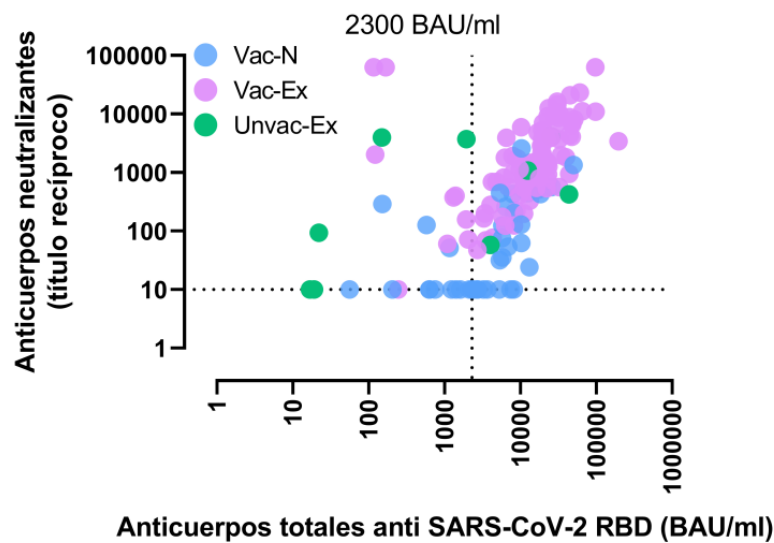


Figura V.9. Correlación entre los anticuerpos totales contra el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 (en BAU/ml) y los títulos recíprocos de anticuerpos neutralizantes IC_{50} (NtAb) frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 en participantes vacunados/naïve (Vac-N), vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex) y no vacunados con infección previa por SARS-CoV-2 (Unvac-Ex). Se muestra el umbral de anticuerpos totales anti-RBD que mejor discriminó entre los participantes que mostraban o no respuestas detectables de NtAb contra Ómicron BA.2 y BA.4/5.

4.3 Modelo CART para predecir la actividad neutralizante detectable en suero frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 basado en mediciones del nivel de anticuerpos totales anti-RBD.

Se construyó un modelo CART para predecir la presencia de anticuerpos totales anti-RBD del SARS-CoV-2 por encima de 2.300 BAU/ml, como sustituto de respuestas NtAb detectables. El modelo incluyó finalmente las siguientes variables: edad, calendario de vacunación, días transcurridos desde la recepción de la última dosis de vacuna y antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2. Nótese que como el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna mostró multicolinealidad con el número de dosis de vacuna recibidas, optamos por mantener sólo este último parámetro en el modelo final. Como se muestra en las figuras V.10 y V.11, el modelo comprendía un total de 25 nodos.

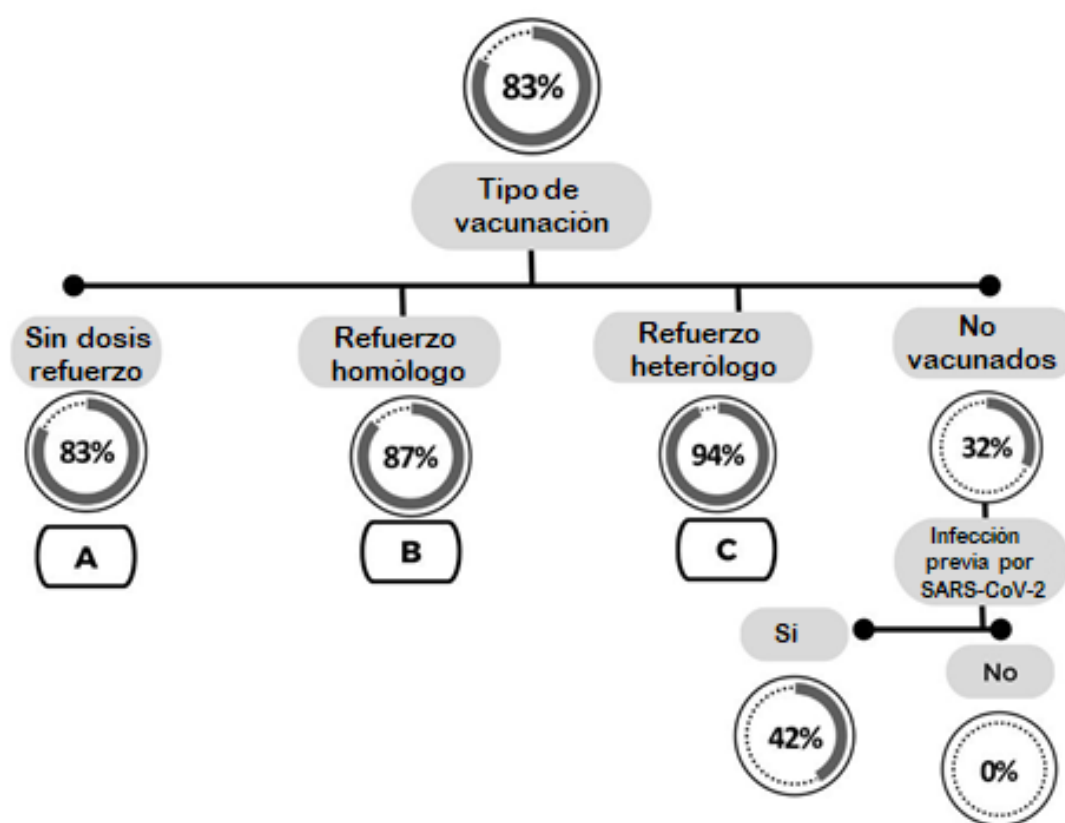


Figura V.10. Modelo de aprendizaje automático supervisado (árbol de clasificación y regresión) para la predicción de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD ≥ 2.300 BAU/ml. Cada nodo clasifica la población anterior en función de una variable separadora. Se representa la pureza de cada nodo (porcentaje de elementos del grupo que pertenece a la misma clase, es decir, ≥ 2.300 BAU/ml).

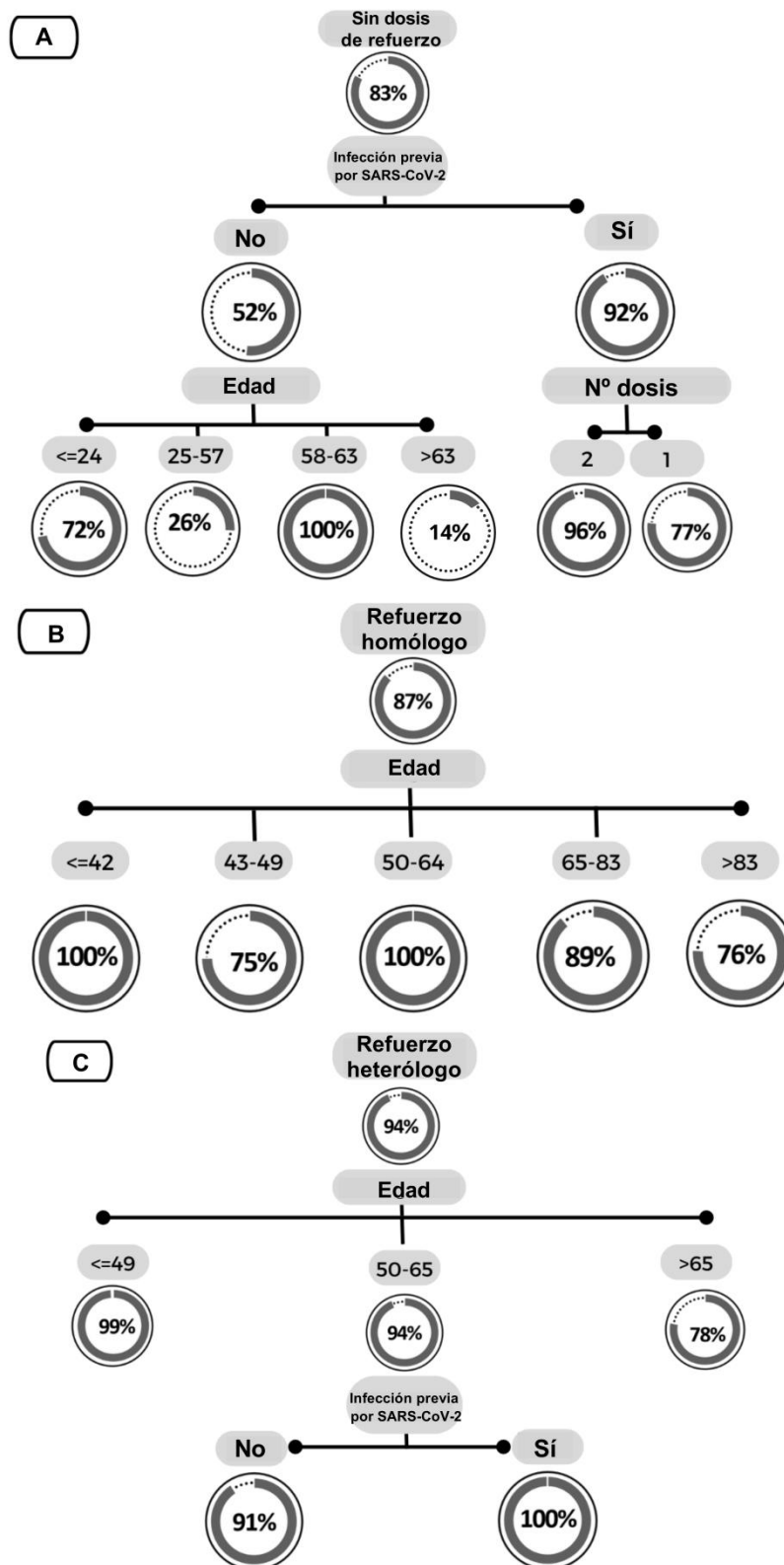


Figura V.11. Continuación del modelo CART para predecir un nivel de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD por encima de 2.300 BAU/ml: A) sin dosis de refuerzo, (B) refuerzo homólogo, y (C) refuerzo heterólogo.

La primera segmentación del árbol de clasificación se basó en el calendario de vacunación; la probabilidad de mostrar anticuerpos totales anti-RBD ≥ 2.300 BAU/ml osciló entre el 94% para los vacunados completamente con dosis de refuerzo heteróloga, al 42% para los no vacunados con infección previa por SARS-CoV-2. Como se muestra en la Figura V.11, en el caso de los participantes vacunados sin dosis de refuerzo (Figura V.11A) la infección previa por SARS-CoV-2, la edad (en el caso de los participantes naïve) y el número de dosis de vacuna recibidas (en el caso de los participantes con infección previa) modularon la probabilidad de presentar niveles de anticuerpos por encima de 2.300 BAU/ml. Entre los participantes vacunados que recibieron una dosis de refuerzo homóloga (Figura V.11B) la probabilidad osciló entre el 75% y el 100% en función de la edad; mientras que en los vacunados con una dosis de refuerzo heteróloga (Figura V.11C) la probabilidad osciló entre el 78% y el 100% en función de la edad, llegando a un intervalo del 91% al 100% para los que tenían entre 50 y 65 años en función de si habían presentado o no una infección previa por SARS-CoV-2.

Como se muestra en la Tabla V.15, en general, el modelo fue capaz de clasificar correctamente el 88% (793/901) de los participantes en la TC: 717/749 (95,7%) de los que mostraban ≥ 2.300 BAU/ml y 76/152 (50%) de aquellos con < 2.300 BAU/ml. El modelo funcionó mejor en los participantes Vac-N (1% de falsos negativos, 12% de falsos positivos) y Vac-Ex (0% de falsos negativos, 6% de falsos positivos) que en los individuos Unvac-Ex (41% de falsos negativos). El modelo se utilizó en una subcohorte, perteneciente a la TC, compuesta por 30 sujetos seleccionados aleatoriamente, clasificando correctamente a 29 de los 30 participantes: 26/27 (96%) de aquellos con niveles de anticuerpos > 2.300 BAU/ml y 3/3 (100%) con < 2.300 BAU/ml.

4.4 Validación del modelo CART

A continuación, validamos el modelo CART en una nueva cohorte compuesta por 787 participantes que se incluyeron en un estudio de seroprevalencia realizado en octubre de 2022. El modelo CART clasificó correctamente al 95% (596/627) y al 33% (53/160) de los participantes con anticuerpos totales por encima y por debajo de 2.300 BAU/ml, respectivamente, con una precisión global del 82%. El rendimiento del modelo se describe en detalle para cada grupo de población en la Tabla V.16.

Tabla V.15. Rendimiento del modelo de aprendizaje automático para predecir los niveles de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD asociados con la presencia de actividad neutralizante frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 en la cohorte de entrenamiento

Grupo (n° de participantes)	Niveles medidos de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD ≥ 2.300 BAU/ml		Niveles medidos de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD < 2.300 BAU/ml	
	Predicción ≥ 2.300 . n (%) (VP)	Predicción < 2.300 . n (%) (FN)	Predicción ≥ 2.300 . n (%) (FP)	Predicción < 2.300 . n (%) (VN)
Unvac-N (n=21)	0	0	0	21 (100)
Unvac-Ex (n=63)	1 (2)	26 (41)	0	36 (57)
Vac-N (n=469)	386 (82)	6 (1)	55 (12)	22 (5)
Vac-Ex (n=378)	357 (94)	0	21 (6)	0

FN, Falso Negativo; FP, Falso Positivo; VN, Verdadero Negativo; VP, Verdadero Positivo; Unvac-Ex, no vacunados con infección previa por SARS-CoV-2; Unvac-N, no vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve); Vac-Ex, vacunados con infección previa por SARS-CoV-2; Vac-N, vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve).

Tabla V.16. Rendimiento del modelo de aprendizaje automático para predecir los niveles de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD asociados con la presencia de actividad neutralizante frente a Ómicron BA.2 y BA.4/5 en la cohorte de validación.

Grupo (n° de participantes)	Niveles medidos de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD ≥ 2.300 BAU/ml		Niveles medidos de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 RBD < 2.300 BAU/ml	
	Predicción ≥ 2.300 . n (%) (VP)	Predicción < 2.300 . n (%) (FN)	Predicción ≥ 2.300 . n (%) (FP)	Predicción < 2.300 . n (%) (VN)
Unvac-N (n=8)	NA	NA	NA	8 (100)
Unvac-Ex (n=61)	0	23 (38)	0	38 (62)
Vac-N (n=218)	140 (64)	7 (3)	61 (31)	8 (4)
Vac-Ex (n=500)	455 (91)	0	45 (9)	0

FN, Falso Negativo; FP, Falso Positivo; NA, No aplicable; VN, Verdadero Negativo; VP, Verdadero Positivo; Unvac-Ex, no vacunados con infección previa por SARS-CoV-2; Unvac-N, no vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve); Vac-Ex, vacunados con infección previa por SARS-CoV-2; Vac-N, vacunados sin infección previa por SARS-CoV-2 (naïve).

En concreto, en Unvac-Ex, un total de 23 participantes (38%) presentaban ≥ 2.300 BAU/ml, pero fueron clasificados como < 2.300 BAU/ml (FN) por el modelo. Lamentablemente, faltaron datos sobre la fecha de infección en la mayoría de ellos. En el grupo de Vac-N, 63 participantes (31%) tenían anticuerpos < 2.300 BAU/ml, pero fueron clasificados como ≥ 2.300 BAU/ml (FP). Esto puede explicarse, en parte, porque el modelo se desarrolló utilizando una cohorte que fue analizada con una mediana de 166 días (IQR 82-149) después de recibir la última dosis de la vacuna. En cambio, el grupo utilizado para validar el modelo fue analizado con una mediana de 316 días (IQR 282-335) tras la última dosis de vacuna recibida. En el grupo de Vac-Ex, el 91% de los participantes fueron correctamente clasificados con anticuerpos totales ≥ 2.300 BAU/ml. Los 45 restantes (9%), se consideraron falsos positivos del modelo, de los cuales en 29 de ellos fue posible obtener el registro de infección por SARS-CoV-2, siendo la mediana de 452 días (IQR 263-613) desde el episodio de infección hasta la prueba serológica. Esto podría explicar, en parte, la discrepancia observada. Al igual que en la TC, en la VC el modelo funcionó mejor para identificar a los participantes Vac-N y Vac-Ex con niveles de anticuerpos totales ≥ 2.300 BAU/ml.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que genera un modelo ML supervisado capaz de predecir la presencia de NtAb detectables frente a SARS-CoV-2 en individuos de la población general. El modelo utilizó un pequeño número de variables fáciles de recopilar, entre ellas la edad, el calendario de vacunación y los antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2. Estudios similares al nuestro han informado sobre modelos ML diseñados para predecir la seroconversión al SARS-CoV-2 o niveles subóptimos (definidos arbitrariamente) de anticuerpos anti-RBD tras la vacunación en receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos o de órgano sólido, que mostraron una precisión variable (161–164). Por ejemplo, mediante un modelo de ML, Papadopoulos et al. (161) demostraron que la edad, el índice de masa corporal y la presencia de enfermedades autoinmunes influían en el nivel de NtAbs contra el SARS-CoV-2 tras la vacunación. Osmanodja et al. (162) aplicaron algoritmos de ML para predecir una respuesta serológica positiva tras la tercera y cuarta dosis en receptores de trasplante renal, pero sólo se construyó y aplicó en pacientes seronegativos sin infección previa por SARS-CoV-2. Alejo et al. (163) también elaboraron un modelo ML para la predicción de los niveles de anticuerpos tras la vacunación en receptores de trasplantes de órganos sólidos. Sin embargo, se construyó utilizando una cohorte de pacientes naïve, y la capacidad predictiva fue moderada. Piñana et al. (164) también realizaron un modelo para la predicción de una respuesta positiva de anticuerpos tras la vacunación en pacientes hematológicos que permitió identificar perfiles clínicos asociados a respuestas humorales deficientes.

Nuestro modelo de aprendizaje automático puede estimar la probabilidad de que individuos de cualquier edad en la población general presenten niveles de anticuerpos totales anti-RBD contra el SARS-CoV-2 iguales o superiores a 2.300 BAU/ml, lo que se asocia con la detección de NtAb contra los sublinajes de Ómicron BA.2 (precisión, 87%), y BA.4/5 (precisión, 84%) del SARS-CoV-2, medidos mediante un ensayo de neutralización con la proteína S pseudotipada. El modelo clasificó correctamente al 95,7% de los participantes incluidos en la TC que presentaban niveles de anticuerpos $\geq$ 2.300 BAU/ml, obteniendo mejores resultados en los participantes Vac-N y Vac-Ex que en los participantes Unvac-Ex y Unvac-N. Cuando se utilizó en la VC, el modelo identificó correctamente al 95% de los participantes con niveles de anticuerpos $\geq$ 2.300 BAU/ml; significativamente, independientemente del tiempo transcurrido entre los

momentos de recogida de las muestras. Téngase en cuenta que la VC se reclutó después de la oleada de Ómicron BA.4/5, que aumentó sustancialmente la exposición al SARS-CoV-2 en la población general. El modelo funcionó mejor en los participantes Vac-Ex, mientras que su capacidad predictiva en los participantes Vac-N dependía en gran medida del tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna, probablemente debido a la disminución de anticuerpos.

Este cuarto trabajo también presenta varias limitaciones, entre las que se incluyen las siguientes: en primer lugar, el punto de corte del nivel de anticuerpos totales anti-RBD seleccionado para discriminar entre los participantes que mostraban respuestas detectables de NtAb contra Ómicron BA.2 y BA.4/5 no fue preciso al 100% (87% para BA.2 y 84% en el caso de BA.4/5). En segundo lugar, los ensayos de NtAb se realizaron en un porcentaje limitado de sueros de los participantes en la TC y VC. En tercer lugar, la mayoría de los sueros de ambas cohortes presentaban niveles de anticuerpos totales anti-RBD iguales o por encima de 2.300 BAU/ml. En cuarto lugar, solo se pudo conocer la fecha precisa de infección por SARS-CoV-2 en unos pocos individuos, lo que impidió la realización de subanálisis adicionales que tuvieran en cuenta la subvariante del virus implicada. En quinto lugar, probar otros enfoques de aprendizaje automático, como los algoritmos k-Nearest Neighbors, Naïve-Bayes o Random Forests, quedó fuera del alcance del estudio. En sexto lugar, el modelo ML se construyó para predecir la detección de NtAb, que puede no correlacionarse con la protección en todos los individuos; no obstante, en nuestro conocimiento, aún no se ha definido un umbral de NtAb que ofrezca protección contra Ómicron BA.2 y BA.4/5. En séptimo lugar, no se comprobó la capacidad del modelo para predecir respuestas detectables de NtAb frente a sublinajes del SARS-CoV-2 en expansión, como BQ.1.1, BA.2.75 o XBB.1, que puedan tener una mayor capacidad para escapar de las respuestas de NtAb inducidas por las vacunas o la infección natural (30,165). Por último, pero no menos importante, no se incluyó en el modelo el tipo específico de estrategia de inmunización (basada en ARNm, vector viral no replicativo, vector viral inactivado o recombinante) utilizado para cada dosis de vacuna, lo que podría haber mejorado la precisión predictiva en individuos vacunados.

En conclusión, nuestro modelo de aprendizaje automático supervisado de tipo CART basado en unos pocos parámetros fáciles de recopilar para la predicción de la

actividad neutralizante sérica frente a las subvariantes BA.2 y BA.4/5 de Ómicron evita la necesidad de realizar ensayos serológicos no solo de NtAb, sino también de anti-S, especialmente en individuos vacunados con antecedentes de infección por SARS-CoV-2, lo que podría resultar costoso en el marco de grandes estudios de seroprevalencia. Este modelo podría resultar útil para la toma de decisiones en materia de salud pública.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. En abril de 2022, alrededor de la mitad de la población de la Comunidad Valenciana se había infectado con el SARS-CoV-2 y, debido a la vacunación extensiva, presentaba inmunidad híbrida (Vac-Ex).
2. Los resultados cualitativos y cuantitativos proporcionados por los inmunoensayos de Roche (Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S) y DiaSorin (LIAISON SARS-CoV-2 TrimericS IgG) no son intercambiables, y su rendimiento analítico se ve influenciado por el estado de vacunación y de infección por SARS-CoV-2 de los individuos.
3. Los sujetos vacunados con una infección previa por SARS-CoV-2 (Vac-Ex) muestran una respuesta de anticuerpos neutralizantes más robusta en el tiempo contra la variante Ómicron BA.4/5, en comparación con los individuos vacunados que nunca se han infectado (Vac-N), independientemente de la variante causante de la infección.
4. Un modelo de aprendizaje automático (ML) puede predecir con alta precisión la presencia de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Ómicron BA.2 y BA.4/5, a partir de variables fáciles de recopilar.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382(8):727–33. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nat*. 2020; 579(7798):265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
3. Deng SQ, Peng HJ. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J Clin Med*. 2020; 9(2):575. DOI: 10.3390/jcm9020575.
4. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020; 395(10223):514–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
5. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507–13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
6. Wang R, Zhang X, Irwin DM, Shen Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J Infect*. 2020; 80(3):350–71. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.01.017.
7. Eurosurveillance Editorial Team. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro Surveill*. 2020; 25(5):200131e. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e.
8. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*; 2020; 5(4):536-544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.

9. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015; 1282:1–23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
10. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nat* 2020; 579(7798):270–3. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
11. Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(7):1227–30. DOI: 10.3201/eid2007.140296.
12. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17(3):181–92. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
13. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016; 24(6):490–502. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
14. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(11):685–700. DOI: 10.1038/s41579-021-00630-8.
15. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2):281-292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
16. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020; 26(4):450–2. DOI: 10.1038/s41591-020-0820-9.
17. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.

18. Wrobel AG, Benton DJ, Xu P, Roustan C, Martin SR, Rosenthal PB, et al. SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nat Struct Mol Biol.* 2020; 27(8):763–7. DOI: 10.1038/s41594-020-0468-7.
19. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483):1260–3. DOI: 10.1126/science.abb2507.
20. Tortorici MA, Veasler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res.* 2019; 105:93–116. DOI: 10.1016/bs.aivir.2019.08.002.
21. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020; 5(4):562–9. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y.
22. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(3):155–70. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.
23. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol.* 2016; 3(1):237–61. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
24. Qing E, Gallagher T. SARS Coronavirus Redux. *Trends Immunol.* 2020; 41(4):271–3. DOI: 10.1016/j.it.2020.02.007.
25. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses.* 2021; 13(2):1–25. DOI: 10.3390/v13020202.
26. Nieto-Torres JL, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virol J.* 2015; 485:330–9. DOI: 10.1016/j.virol.2015.08.010.
27. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci.* 2022; 65(2):280–94. DOI: 10.1007/s11427-021-1964-4.

28. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020; 92(4):418–23. DOI: 10.1002/jmv.25681.
29. Simmonds P. Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: Causes and Consequences for Their Short- and Long-Term Evolutionary Trajectories. *mSphere.* 2020; 5(3):e00408-20. DOI: 10.1128/mSphere.00408-20.
30. Chatterjee S, Bhattacharya M, Nag S, Dhama K, Chakraborty C. A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses.* 2023; 15(1):167. DOI: 10.3390/v15010167.
31. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J.* 2021; 62(11):961–8. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961.
32. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. World Health Organization. 2022. [citado el 17 oct. 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/overview/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
33. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science.* 2021; 372(6538):eabg3055. DOI: 10.1126/science.abg3055.
34. Meng B, Kemp SA, Papa G, Datir R, Ferreira IATM, Marelli S, et al. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep.* 2021; 35(13):109292. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109292.
35. Chen RE, Zhang X, Case JB, Winkler ES, Liu Y, VanBlargan LA, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat Med.* 2021; 27(4):717–26. DOI: 10.1038/s41591-021-01294-w.
36. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med.* 2021; 385(7):585–94. DOI: 10.1056/NEJMoa2108891.

37. Tang P, Hasan MR, Chemaitelly H, Yassine HM, Benslimane FM, Al Khatib HA, et al. BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 Delta variant in Qatar. *Nat Med.* 2021; 27(12):2136–43. DOI: 10.1038/s41591-021-01583-4.
38. Ramanathan M, Ferguson ID, Miao W, Khavari PA. SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21(8):1070. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00262-0.
39. Liu Y, Rocklöv J. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. *J Travel Med.* 2022; 29(3). DOI: 10.1093/jtm/taac037.
40. Callaway E, Ledford H. How bad is Omicron? What scientists know so far. *Nat.* 2021; 600(7888):197–9. DOI: 10.1038/d41586-021-03614-z.
41. Callaway E. What Omicron’s BA.4 and BA.5 variants mean for the pandemic. *Nat.* 2022; 606(7916):848–9. DOI: 10.1038/d41586-022-01730-y.
42. Brüssow H, Brüssow B. COVID-19: Omicron – the latest, the least virulent, but probably not the last variant of concern of SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol.* 2022; 15(7):1927–39. DOI: 10.1111/1751-7915.14064.
43. Dhama K, Nainu F, Frediansyah A, Yattoo MI, Mohapatra RK, Chakraborty S, et al. Global emerging Omicron variant of SARS-CoV-2: Impacts, challenges and strategies. *J Infect Public Health.* 2022; 16(1):4–14. DOI: 10.1016/j.jiph.2022.11.024.
44. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nat.* 2021; 600(7887):21. DOI: 10.1038/d41586-021-03552-w.
45. Chatterjee S, Bhattacharya M, Nag S, Dhama K, Chakraborty C. A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses.* 2023; 15(1):1–27. DOI: 10.3390/v15010167.

46. Mohapatra RK, Kandi V, Verma S, Dhama K. Challenges of the Omicron (B.1.1.529) Variant and Its Lineages: A Global Perspective. *Chembiochem*. 2022; 23(9):973-91. DOI: 10.1002/cbic.202200059.
47. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, Song W, Xiao T, Wang L, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nat*. 2022; 608(7923):593–602. DOI: 10.1038/s41586-022-04980-y.
48. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2020; 41(12):1100–15. DOI: 10.1016/j.it.2020.10.004.
49. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. Sars-Cov-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(3):1716. DOI: 10.3390/ijms23031716.
50. Gao Y, Yan L, Huang Y, Liu F, Zhao Y, Cao L, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020; 368(6492):779–82. DOI: 10.1126/science.abb7498.
51. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015; 2(1):265–88. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
52. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun*. 2020; 11(1):5885. DOI: 10.1038/s41467-020-19619-7.
53. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19(3):141–54. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.
54. Singh R, Kang A, Luo X, Jeyanathan M, Gillgrass A, Afkhami S, et al. COVID-19: Current knowledge in clinical features, immunological responses, and vaccine development. *FASEB J*. 2021; 35(3):e21409. DOI: 10.1096/fj.202002662R.

55. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507–13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
56. Lao WP, Imam SA, Nguyen SA. Anosmia, hyposmia, and dysgeusia as indicators for positive SARS-CoV-2 infection. *World J Otorhinolaryngol - head neck Surg*. 2020; 6(1):22–5. DOI: 10.1016/j.wjorl.2020.04.001.
57. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13):1239–42. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
58. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382(18):1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
59. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med*. 2020; 382(17):1663–5. DOI: 10.1056/NEJMc2005073.
60. Scholkmann F, May CA. COVID-19, post-acute COVID-19 syndrome (PACS, “long COVID”) and post-COVID-19 vaccination syndrome (PCVS, “post-COVIDvac-syndrome”): Similarities and differences. *Pathol Res Pract*. 2023; 246:154497. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154497.
61. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):e238–44. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30484-9.
62. Li H, Liu Z, Ge J. Scientific research progress of COVID-19/SARS-CoV-2 in the first five months. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(12):6558–70. DOI: 10.1111/jcmm.15364.
63. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med*. 2020; 382(10):929–36. DOI: 10.1056/NEJMoa2001191.

64. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020;12(4):372. DOI: 10.3390/v12040372.
65. Bordi L, Nicastri E, Scorzolini L, Di Caro A, Capobianchi MR, Castilletti C, et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(8):2000170. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000170.
66. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020; 25(3):2000045. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
67. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(5): e00310-20. DOI: 10.1128/JCM.00310-20.
68. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020; 382(12):1177–9. DOI: 10.1056/NEJMc2001737.
69. Lei J, Li J, Li X, Qi X. CT Imaging of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*. 2020; 295(1):18. DOI: 10.1148/radiol.2020200236.
70. Heald-Sargent T, Muller WJ, Zheng X, Rippe J, Patel AB, Kociolek LK. Age-Related Differences in Nasopharyngeal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Levels in Patients With Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Pediatr*. 2020; 174(9):902–3. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.3651.
71. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect*. 2021; 27(3):472.e7-472.e10. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.004.

72. Theel ES, Couturier MR, Filkins L, Palavecino E, Mitchell S, Campbell S, et al. Application, Verification, and Implementation of SARS-CoV-2 Serologic Assays with Emergency Use Authorization. *J Clin Microbiol.* 2020; 59(1):e02201-20. DOI: 10.1128/JCM.02148-20.
73. Zhang YV, Force on behalf of the AC 19 STT, Wiencek J, Force on behalf of the AC 19 STT, Meng QH, Force on behalf of the AC 19 STT, et al. AACC Practical Recommendations for Implementing and Interpreting SARS-CoV-2 Emergency Use Authorization and Laboratory-Developed Test Serologic Testing in Clinical Laboratories. *Clin Chem.* 2021; 67(9):1188–200. DOI: 10.1093/clinchem/hvab051.
74. Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Koller T, Mucher P, Radakovics A, Marculescu R, et al. Anti-Spike Protein Assays to Determine SARS-CoV-2 Antibody Levels: a Head-to-Head Comparison of Five Quantitative Assays. *Microbiol Spectr.* 2021; 9(1):e00247-21. DOI: 10.1128/Spectrum.00247-21.
75. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(6):e00461-20. DOI: 10.1128/JCM.00461-20.
76. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(5):565–74. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
77. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(16):2027–34. DOI: 10.1093/cid/ciaa344.
78. Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *J Infect.* 2020; 81(1):147–78. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.012.

79. Vanderheiden A, Ralfs P, Chirkova T, Upadhyay AA, Zimmerman MG, Bedoya S, et al. Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *J Virol.* 2020; 94(19):e00985-20. DOI: 10.1128/JVI.00985-20.
80. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 2020; 183(4):996-1012. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.038.
81. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell.* 2020; 183(5):1340-1353. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.001.
82. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021; 27(7):1205–11. DOI: 10.1038/s41591-021-01377-8.
83. Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med.* 2022; 291(1):32–50. DOI: 10.1111/joim.13372.
84. Cromer D, Steain M, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2022; 3(1):e52–61. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00267-6.
85. Liu H, Wilson IA. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunol Rev.* 2022; 310:76-92. DOI: 10.1111/imr.13084.
86. Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: What Do We Know and Should We Be Testing for It? *J Clin Microbiol.* 2022; 60(6):e00985-20. DOI: 10.1128/jcm.00482-21.
87. Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science.* 2022; 375(6576):43–50. DOI: 10.1126/science.abm3425.

88. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021; 384(5):403–16. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.
89. Harvey RA, Rassen JA, Kabelac CA, Turenne W, Leonard S, Klesh R, et al. Association of SARS-CoV-2 Seropositive Antibody Test With Risk of Future Infection. *JAMA Intern Med.* 2021; 181(5):672–9. DOI: 10.1001/jamainternmed.2021.0366.
90. Yang HS, Costa V, Racine-Brzostek SE, Acker KP, Yee J, Chen Z, et al. Association of Age With SARS-CoV-2 Antibody Response. *JAMA Netw Open.* 2021; 4(3):e214302. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.4302.
91. Vashisht R, Patel A, Crews BO, Garner OB, Dahm L, Wilson C, et al. Age- and Sex-Associated Variations in the Sensitivity of Serological Tests Among Individuals Infected With SARS-CoV-2. *JAMA Netw Open.* 2021; 4(2):e210337. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.0337.
92. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol.* 2020; 5(12):1598–607. DOI: 10.1038/s41564-020-00813-8.
93. Bobrovitz N, Ware H, Ma X, Li Z, Hosseini R, Cao C, et al. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet Infect Dis.* 2023; 23(5):556–67. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00801-5.
94. Fiolet T, Kherabi Y, Macdonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect.* 2022; 28(2):202-221. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.10.005.
95. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020; 383(27):2603–15. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577.

96. Kaku CI, Champney ER, Normark J, Garcia M, Johnson CE, Ahlm C, et al. Broad anti-SARS-CoV-2 antibody immunity induced by heterologous ChAdOx1/mRNA-1273 vaccination. *Science*. 2022; 375(6584):1041–7. DOI: 10.1126/science.abn2688.
97. Lederer K, Castaño D, Gómez Atria D, Oguin TH, Wang S, Manzoni TB, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity*. 2020; 53(6):1281-1295. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.11.009.
98. Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020; 21(2):73–82. DOI: 10.1038/s41577-020-00480-0.
99. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7(1):146. DOI: 10.1038/s41392-022-00996-y.
100. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nat*. 2020; 586(7830):594–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2814-7.
101. Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(10):581–2. DOI: 10.1038/s41577-020-00436-4.
102. Turner JS, O’Halloran JA, Kalaidina E, Kim W, Schmitz AJ, Zhou JQ, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nat*. 2021; 596(7870):109–13. DOI: 10.1038/s41586-021-03738-2.
103. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol*. 2021; 6(58):1–19. DOI: 10.1126/sciimmunol.abi6950.
104. Larson KF, Ammirati E, Adler ED, Cooper LT, Hong KN, Saponara G, et al. Myocarditis After BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccination. *Circulation*. 2021; 144(6):506–8. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055913.

105. Rosner CM, Genovese L, Tehrani BN, Atkins M, Bakhshi H, Chaudhri S, et al. Myocarditis Temporally Associated With COVID-19 Vaccination. *Circulation*. 2021; 144(6):502–5. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055891.
106. Creech CB, Walker SC, Samuels RJ. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA*. 2021; 325(13):1318–20. DOI: 10.1001/jama.2021.3199.
107. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020; 396(10249):467–78. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31604-4.
108. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol*. 2021; 21(10):626–36. DOI: 10.1038/s41577-021-00592-1.
109. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nat*. 2020; 586(7830):516–27. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3.
110. Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Rev Med Virol*. 2022; 32(4):e2313. DOI: 10.1002/rmv.2313.
111. Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones (Comisión de Salud Pública). Recomendaciones de vacunación frente a gripe y COVID-19 en la temporada 2023-2024 en España. Actualización [Internet]. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. 2023;8. [Consultado 2 nov. 2024]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/programa DeVacunacion/docs/Recomendaciones_vacunacion_gripe.pdf
112. Yuan Y, Jiao B, Qu L, Yang D, Liu R. The development of COVID-19 treatment. *Front Immunol*. 2023; 14:1125246. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1125246.
113. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z, et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clin Immunol*. 2020; 214:108393. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108393.

114. Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones (Comisión de Salud Pública). Recomendaciones de utilización de Evusheld para la prevención de COVID-19 [Internet]. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. 2022;1–11. [Consultado 8 nov. 2024]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Historico_COVID-19/docs/Recomendaciones_uso_Evusheld.pdf.
115. Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, Launay O, Avila M, Templeton A, et al. Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab–Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med*. 2022; 386(23):2188–200. DOI: 10.1056/NEJMoa2116620.
116. Zamani M, Poustchi H, Mohammadi Z, Dalvand S, Sharafkhah M, Motevalian SA, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibody among urban Iranian population: findings from the second large population-based cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2022; 22(1):1031. DOI: 10.1186/s12889-022-13464-7.
117. Clarke KEN, Jones JM, Deng Y, Nycz E, Lee A, Iachan R, et al. Seroprevalence of Infection-Induced SARS-CoV-2 Antibodies - United States, September 2021-February 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022; 71(17):606–8. DOI: 10.15585/mmwr.mm7117e3.
118. Bingham J, Cable R, Coleman C, Glatt TN, Grebe E, Mhlanga L, et al. Estimates of prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies among blood donors in South Africa in March [Internet]. *Res Sq [Preprint]* 2022 [Consultado 13 nov. 2024]. DOI: 10.21203/rs.3.rs-233375/v1.
119. Dimeglio C, Miguères M, Chapuy-Regaud S, Da-Silva I, Jougla I, Pradere C, et al. Comparative effects of mRNA vaccine booster and natural Omicron infection on the neutralizing antibody response. *J Infect*. 2022; 85(1):e4–6. DOI: 10.1016/j.jinf.2022.05.001.
120. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, Bodenheimer O, Freedman LS, Ash N, et al. Protection and Waning of Natural and Hybrid Immunity to SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2022; 386(23):2201–12. DOI: 10.1056/NEJMoa2118946.

121. Epsi NJ, Richard SA, Lindholm DA, Mende K, Ganesan A, Huprikar N, et al. Understanding “Hybrid Immunity”: Comparison and Predictors of Humoral Immune Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection (SARS-CoV-2) and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccines. *Clin Infect Dis*. 2023; 76(3):E439–49. DOI: 10.1093/cid/ciac392.
122. Liu H, Wilson IA. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunol Rev*. 2022; 310(1):76–92. DOI: 10.1111/imr.13084.
123. Valdivia A, Torres I, Latorre V, Francés-Gómez C, Albert E, Gozalbo-Rovira R, et al. Inference of SARS-CoV-2 spike-binding neutralizing antibody titers in sera from hospitalized COVID-19 patients by using commercial enzyme and chemiluminescent immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021; 40(3):485–94. DOI: 10.1007/s10096-020-04128-8.
124. Jung K, Shin S, Nam M, Hong YJ, Roh EY, Park KU, et al. Performance evaluation of three automated quantitative immunoassays and their correlation with a surrogate virus neutralization test in coronavirus disease 19 patients and pre-pandemic controls. *J Clin Lab Anal*. 2021; 35(9):e23921. DOI: 10.1002/jcla.23921.
125. Estrategia de vacunación COVID-19. ¿Cuántas dosis son necesarias para ser inmune? [Internet]. Gobierno de España. 2022. [Consultado 13 nov. 2024]. Disponible en: <https://www.vacunacovid.gob.es/preguntas-y-respuestas/cuantas-dosis-son-necesarias-para-ser-inmune>
126. Sánchez-Sendra B, Albert E, Zulaica J, Torres I, Giménez E, Botija P, et al. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern elicited by the comirnaty COVID-19 vaccine in nursing home residents. *Sci Rep*. 2022; 12(1): 3788. DOI: 10.1038/s41598-022-07849-2.
127. Giménez E, Albert E, Zulaica J, Torres I, Rusu L, Moreno AR, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Adaptive Immunity in Nursing Home Residents Following a Third Dose of the Comirnaty Coronavirus Disease 2019 Vaccine. *Clin Infect Dis*. 2022; 75(1):E865–8. DOI: 10.1093/cid/ciac223.

128. Gestión integral de la vacunación COVID-19. Informe de actividad diario 03.06.2022 [Internet]. Ministerio de Sanidad. 2022 [consultado 9 jun. 2022]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Informe_GIV_comunicacion_20220603.pdf
129. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020; 396(10250):535–44. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31483-5.
130. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, Bodenheimer O, Freedman L, Haas EJ, et al. Waning Immunity after the BNT162b2 Vaccine in Israel. *N Engl J Med*. 2021; 385(24):e85. DOI: 10.1056/NEJMoa2114228.
131. Cheng H, Peng Z, Si S, Alifu X, Zhou H, Chi P, et al. Immunogenicity and Safety of Homologous and Heterologous Prime–Boost Immunization with COVID-19 Vaccine: Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines*. 2022; 10(5). DOI: 10.3390/vaccines10050798.
132. Chiu NC, Chi H, Tu YK, Huang YN, Tai YL, Weng SL, et al. To mix or not to mix? A rapid systematic review of heterologous prime-boost covid-19 vaccination. *Expert Rev Vaccines*. 2021; 20(10):1211–20. DOI: 10.1080/14760584.2021.1971522.
133. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2021; 27(6):981–4. DOI: 10.1038/s41591-021-01325-6.
134. Stamatatos L, Czartoski J, Wan YH, Homad LJ, Rubin V, Glantz H, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*. 2021; 372(6549):1413–8. DOI: 10.1126/science.abg9175.

135. Guo Y, Han J, Zhang Y, He J, Yu W, Zhang X, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant: Epidemiological Features, Biological Characteristics, and Clinical Significance. *Front Immunol.* 2022; 13:877101. DOI: 10.3389/fimmu.2022.877101.
136. Choudhary HR, Parai D, Dash GC, Peter A, Sahoo SK, Pattnaik M, et al. IgG antibody response against nucleocapsid and spike protein post-SARS-CoV-2 infection. *Infection.* 2021; 49(5):1045–8. DOI: 10.1007/s15010-021-01651-4.
137. Wratil PR, Stern M, Priller A, Willmann A, Almanzar G, Vogel E, et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat Med.* 2022; 28(3):496–503. DOI: 10.1038/s41591-022-01715-4.
138. Yu J, Collier A, Ris Y, Rowe M, Mardas F, Ventura JD, Wan H, et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 Variants. *N Engl J Med.* 2022; 386(16):1579–80. DOI: 10.1056/NEJMc2201849.
139. Tan CW, Chia WN, Young BE, Zhu F, Lim BL, Sia WR, et al. Pan-Sarbecovirus Neutralizing Antibodies in BNT162b2-Immunized SARS-CoV-1 Survivors. *N Engl J Med.* 2021; 385(15):1401–6. DOI: 10.1056/NEJMoa2108453.
140. Garcia-Beltran WF, St Denis KJ, Hoelzemer A, Lam EC, Nitido AD, Sheehan ML, et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell.* 2022; 185(3):457-466. DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.033.
141. Kaku CI, Bergeron AJ, Ahlm C, Normark J, Sakharkar M, Forsell MNE, et al. Recall of preexisting cross-reactive B cell memory after Omicron BA.1 breakthrough infection. *Sci Immunol.* 2022; 7(73):eabq3511. DOI: 10.1126/sciimmunol.abq3511.
142. Windsor IW, Tong P, Lavidor O, Moghaddam AS, McKay LGA, Gautam A, et al. Antibodies induced by an ancestral SARS-CoV-2 strain that cross-neutralize variants from Alpha to Omicron BA.1. *Sci Immunol.* 2022; 7(74):3425. DOI: 10.1126/sciimmunol.abo3425.

143. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Gálvez RI, et al. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell*. 2022; 185(14):2434-2451. DOI: 10.1016/j.cell.2022.05.022.
144. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021; 371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063.
145. Mateus J, Dan JM, Zhang Z, Moderbacher CR, Lammers M, Goodwin B, et al. Low-dose mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells. *Science*. 2021; 374(6566):eabj9853. DOI: 10.1126/science.abj9853.
146. Piñana JL, López-Corral L, Martino R, Vazquez L, Pérez A, Martin-Martin G, et al. SARS-CoV-2 vaccine response and rate of breakthrough infection in patients with hematological disorders. *J Hematol Oncol*. 2022; 15(1):54. DOI: 10.1186/s13045-022-01275-7.
147. Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bibi S, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021; 27(11):2032–40. DOI: 10.1038/s41591-021-01540-1.
148. Greaney AJ, Loes AN, Gentles LE, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, et al. Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do those from SARS-CoV-2 infection. *Sci Transl Med*. 2021; 13(600):eabi9915. DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.003.
149. Garrett ME, Galloway JG, Wolf C, Logue JK, Franko N, Chu HY, et al. Comprehensive characterization of the antibody responses to SARS-CoV-2 Spike protein finds additional vaccine-induced epitopes beyond those for mild infection. *Elife*. 2022; 11:e73490. DOI: 10.7554/eLife.73490.
150. Swadźba J, Anyszek T, Panek A, Chojęta A, Wyrzykowska K, Martin E. Head-to-Head Comparison of 5 Anti-SARS-CoV-2 Assays Performance in One Hundred COVID-19 Vaccinees, over an 8-Month Course. *Diagnostics*. 2022; 12(6):1495. DOI: 10.3390/diagnostics12061426.

151. Danese E, Montagnana M, Salvagno GL, Gelati M, Peserico D, Pighi L, et al. Comparison of five commercial anti-SARS-CoV-2 total antibodies and IgG immunoassays after vaccination with BNT162b2 mRNA. *J Med Biochem.* 2021; 40(4):335–40. DOI: 10.5937/jomb0-31475.
152. Salvagno GL, Lippi G. Correlation between Anti-SARS-CoV-2 Total Antibodies and Spike Trimeric IgG after BNT162b2 Booster Immunization. *Vaccines.* 2022; 10(6):890. DOI: 10.3390/vaccines10060890.
153. Lukaszuk K, Kiewisz J, Rozanska K, Dabrowska M, Podolak A, Jakiel G, et al. Usefulness of IVD Kits for the Assessment of SARS-CoV-2 Antibodies to Evaluate the Humoral Response to Vaccination. *Vaccines.* 2021; 9(8):840. DOI: 10.3390/vaccines9080840.
154. Carta M, Marinello I, Cappelletti A, Rodolfi A, Cerrito E, Bernasconi C, et al. Comparison of Anti-SARS-CoV-2 S1 Receptor-Binding Domain Antibody Immunoassays in Health Care Workers Before and After the BNT162b2 mRNA Vaccine. *Am J Clin Pathol.* 2022; 157(2):212–8. DOI: 10.1093/ajcp/aqab107.
155. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022; 32(5):e2381. DOI: 10.1002/rmv.2381.
156. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, Song W, Xiao T, Wang L, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nat.* 2022; 608(7923):593–602. DOI: 10.1038/s41586-022-04980-y.
157. Hachmann NP, Miller J, Collier A ris Y, Ventura JD, Yu J, Rowe M, et al. Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *N Engl J Med.* 2022; 387(1):86–8. DOI: 10.1056/NEJMc2206576.
158. Tuekprakhon A, Nutalai R, Dijokaite-Guraliuc A, Zhou D, Ginn HM, Selvaraj M, et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell.* 2022; 185(14):2422–2433. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.005.

159. Wang Q, Guo Y, Iketani S, Nair MS, Li Z, Mohri H, et al. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nat.* 2022; 608(7923):603–8. DOI: 10.1038/s41586-022-05053-w.
160. Arora P, Kempf A, Nehlmeier I, Schulz SR, Cossmann A, Stankov M V., et al. Augmented neutralisation resistance of emerging omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *Lancet Infect Dis.* 2022; 22(8):1117–8. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00422-4.
161. Papadopoulos D, Ntanas-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Evangelakou Z, Malandrakis P, Manola MS, et al. Predictive Factors for Neutralizing Antibody Levels Nine Months after Full Vaccination with BNT162b2: Results of a Machine Learning Analysis. *Biomedicines.* 2022; 10(2). DOI: 10.3390/biomedicines10020204.
162. Osmanodja B, Stegbauer J, Kantauskaite M, Rump LC, Heinzl A, Reindl-Schwaighofer R, et al. Development and validation of multivariable prediction models of serological response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Front Immunol.* 2022; 13:997343. DOI: 10.3389/fimmu.2022.997343.
163. Alejo JL, Mitchell J, Chiang TPY, Chang A, Abedon AT, Werbel WA, et al. Predicting a Positive Antibody Response After 2 SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Transplant Recipients: A Machine Learning Approach With External Validation. *Transplantation.* 2022; 106(10):e452–60. DOI: 10.1097/TP.0000000000004259.
164. Piñana JL, Rodríguez-Belenguer P, Caballero D, Martino R, Lopez-Corral L, Terol MJ, et al. Applicability of probabilistic graphical models for early detection of SARS-CoV-2 reactive antibodies after SARS-CoV-2 vaccination in hematological patients. *Ann Hematol.* 2022; 101(9):2053–67. DOI: 10.1007/s00277-022-04906-8.
165. Miller J, Hachmann NP, Collier A ris Y, Lasrado N, Mazurek CR, Patio RC, et al. Substantial Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Variants BQ.1.1 and XBB.1. *N Engl J Med.* 2023; 388(7):662–4. DOI: 10.1056/NEJMc2214314.

VIII. ANEXOS

1. Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral

Artículo I

Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the Valencian Community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant. *J Med Virol.* 2022; 95(1):e28284. doi:10.1002/jmv.28284

Jorge Camacho (1), Estela Giménez (1), Eliseo Albert (1), Joao Zulaica (2), Beatriz Álvarez-Rodríguez (2), Ignacio Torres (1), Luciana Rusu (2), Javier S.Burgos (3), Salvador Peiró (4), Hermelinda Vanaclocha (5), Ramón Limón (6), María Jesús Alcaraz (1), José Sánchez-Payá (7,8), Javier Díez-Domingo (4), Iñaki Comas (9,10), Fernando Gonzáles-Candelas (2,10), Ron Geller (2), David Navarro (1,11), grupo de estudio del Programa Valenciano de Investigación de la Vacuna frente a la COVID-19 (ProVaVac).

- 1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
- 2.- Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio), Universidad de Valencia-CSIC, Valencia, España.
- 3.- Dirección General de Investigación y Supervisión Sanitaria, Consejería de Sanidad, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- 4.- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Valencia, España.
- 5.- Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- 6.- Dirección General de Asistencia Sanitaria. Consejería de Sanidad, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- 7.- Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General y Universitario de Alicante, Alicante, España.
- 8.- Instituto Alicantino de Investigación Sanitaria y Biomédica (ISABIAL), Alicante, España.
- 9.- Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, España.
- 10.- CIBER de Epidemiología y Salud Pública, España; Unidad Mixta de Investigación “Infecciones y Salud Pública” FISABIO-Universidad de Valencia, Valencia, España.
- 11.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Jorge Camacho realizó parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

6.8

Artículo II

A performance comparison of two (electro) chemiluminescence immunoassays for detection and quantitation of serum anti-spike antibodies according to SARS-CoV-2 vaccination and infections status. *J Med Virol.* 2022; 95(1):e28397. doi:10.1002/jmv.28397

Jorge Camacho (1), Eliseo Albert (1), Joao Zulaica (2), Beatriz Álvarez-Rodríguez (2), Luciana Rusu (2), Beatriz Olea (1), María Jesús Alcaraz (1), Ron Geller (2), Estela Giménez (1,3), David Navarro (1,3,4).

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.

2.- Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio), Universidad de Valencia-CSIC, Valencia, España.

3.- CIBERINFEC (Centro de investigación en red de enfermedades infecciosas), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

4.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Jorge Camacho realizó la mayor parte de los aspectos analíticos y recopilación de datos, y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados, además de revisar el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

6.8

Artículo III

Neutralizing antibodies against Omicron BA.4/5 after COVID-19 vaccination in SARS-CoV-2 experienced versus naïve individuals in the general population. *J. Infect.* 2023; 86(3):256-308. doi:10.1016/j.jinf.2022.12.029

Jorge Camacho (1), Joao Zulaica (2), Estela Giménez (1,3), Luciana Rusu (2), Sebastian Velandia-Álvarez (2), Eliseo Albert (1), Salvador Peiró (4), Hermelinda Vanaclocha (5), Ramón Limón (6), Ron Geller (2), David Navarro (1,3,7), grupo de estudio del Programa Valenciano de Investigación de la Vacuna frente a la COVID-19 (ProVaVac).

- 1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
- 2.- Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio), Universidad de Valencia-CSIC, Valencia, España.
- 3.- CIBERINFEC (Centro de investigación en red de enfermedades infecciosas), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
- 4.- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Valencia, España.
- 5.- Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- 6.- Dirección General de Asistencia Sanitaria. Consejería de Sanidad, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- 7.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Jorge Camacho participó en la metodología y la validación de los datos y asistió en el análisis, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

14.3

Artículo IV

A machine learning model for predicting serum neutralizing activity against Omicron SARS-CoV-2 BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population. *J Med Virol.* 2023; 95(4):e28739. doi:10.1002/jmv.28739

Jorge Camacho (1), Eliseo Albert (1), Beatriz Álvarez-Rodríguez (2), Luciana Rusu (2), Joao Zulaica (2), Alicia Rodríguez Moreno (2), Salvador Peiró (3), Ron Geller (2), David Navarro (1,4,5), Estela Giménez (1,4).

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.

2.- Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio), Universidad de Valencia-CSIC, Valencia, España.

3.- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Valencia, España.

4.- CIBERINFEC (Centro de investigación en red de enfermedades infecciosas), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

5.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Jorge Camacho realizó parte del proceso experimental y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados, además de revisar el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

6.8



Fdo. David Navarro Ortega

2. Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, realizo el presente escrito con el objetivo de informar que el doctorando, Jorge Camacho, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, participó en los análisis estadísticos y revisó los textos definitivos.

Ni el doctorando, Jorge Camacho, ni ninguno de los coautores han utilizado ninguno de los artículos compendiados en esta tesis ni implícita ni explícitamente para la realización de otras tesis doctorales.

A handwritten signature in dark ink, consisting of a stylized 'D' followed by a horizontal line and a small vertical stroke.

Fdo. David Navarro Ortega

Artículos

RESEARCH ARTICLE

Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the Valencian Community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant

Jorge Camacho¹  | Estela Giménez¹ | Eliseo Albert¹ | Joao Zulaica² | Beatriz Álvarez-Rodríguez² | Ignacio Torres¹ | Luciana Rusu² | Javier S. Burgos³ | Salvador Peiró⁴ | Hermelinda Vanaclocha⁵ | Ramón Limón⁶ | María Jesús Alcaraz¹ | José Sánchez-Payá^{7,8} | Javier Díez-Domingo⁴ | Iñaki Comas^{9,10} | Fernando Gonzáles-Candelas^{2,10}  | Ron Geller² | David Navarro^{1,11}  | the Valencian Vaccine Research Program (ProVaVac) study group

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

²Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), University of Valencia-CSIC, Valencia, Spain

³General Directorate of Research and Healthcare Supervision, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain

⁴Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of the Valencian Community (FISABIO), Valencia, Spain

⁵General Directorate of Public Health, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain

⁶General Directorate of Healthcare, Department of Health, Valencian Government, Valencia, Spain

⁷Preventive Medicine Service, Alicante General and University Hospital, Alicante, Spain

Abstract

Studies investigating the cumulative incidence of and immune status against SARS-CoV-2 infection provide valuable information for shaping public health decision-making. A cross-sectional study on 935 participants, conducted in the Valencian Community (VC), measuring anti-SARS-CoV-2-receptor binding domain-RBD-total antibodies and anti-Nucleocapsid (N)-IgGs via electrochemiluminescence assays. Quantitation of neutralizing antibodies (NtAb) against ancestral and Omicron BA.1 and BA.2 variants and enumeration of SARS-CoV-2-S specific-IFN γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells was performed in 100 and 137 participants, respectively. The weighted cumulative incidence was 51.9% (95% confidence interval [CI]: 48.7–55.1) and was inversely related to age. Anti-RBD total antibodies were detected in 97% of participants; vaccinated and SARS-CoV-2-experienced (VAC-ex; $n = 442$) presented higher levels ($p < 0.001$) than vaccinated/naïve (VAC-n; $n = 472$) and nonvaccinated/experienced (UNVAC-ex; $n = 63$) subjects. Antibody levels correlated inversely with time elapsed since last vaccine dose in VAC-n (Rho, -0.52 ; $p < 0.001$) but not in

Jorge Camacho and Estela Giménez contributed equally to this study.

Members of the Valencian vaccine research program (ProVaVac) study group: Burgos JS (General Directorate of Research and Healthcare Supervision, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain); Meneu de Guillaena R (Vice-President Foundation Research Institute in Public Services, Valencia, Spain); Vanaclocha Luna H (General Directorate of Public Health, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain); Burks DJ (The Prince Philip Research Center-CIPF, Valencia, Spain); Cervantes A (INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain); Comas I (Biomedicine Institute of Valencia, Spanish Research Council (CSIC); Díez-Domingo J (Foundation for the promotion of health and biomedical research of the Valencian Community-FISABIO, Valencia, Spain); Peiro S (Foundation for the promotion of health and biomedical research of the Valencian Community-FISABIO, Valencia, Spain); González-Candelas F (CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain; Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia, Valencia, Spain; Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University of Valencia, Valencia, Spain); Ferrer Albiach C (Castelló Provincial Hospital Foundation); Cervantes A (INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain); Redón J (INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain); Sánchez-Payá J (Preventive Medicine Service, Alicante General and University Hospital, Alicante, Spain; Alicante Institute of Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, Spain); Sanz G (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe); Sempere JM (Biotechnology Department, University of Alicante, Spain); Zapater Latorre E (Foundation of the General University Hospital of Valencia); Navarro D (Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain; Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain).

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

⁸Alicante Institute of Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, Spain

⁹Biomedicine Institute of Valencia, Spanish Research Council (CSIC), Valencia, Spain

¹⁰CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain; Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia, Valencia, Spain

¹¹Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

David Navarro and Estela Giménez, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA. Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.
Email: david.navarro@uv.es and estela.gimenez-quiles@gmail.com

Funding information

European Commission NextGenerationEU

VAC-ex ($\rho = -0.02$; $p = 0.57$). Heterologous booster shots resulted in increased anti-RBD antibody levels compared with homologous schedules in VAC-n, but not in VAC-ex. NtAbs against Omicron BA.1 were detected in 94%, 75%, and 50% of VAC-ex, VAC-n and UNVAC-ex groups, respectively. For Omicron BA.2, the figures were 97%, 84%, and 40%, respectively. SARS-CoV-2-S-reactive IFN- γ T cells were detected in 73%, 75%, and 64% of VAC-ex, VAC-n and UNVAC-ex, respectively. Median frequencies for both T-cell subsets were comparable across groups. In summary, by April 2022, around half of the VC population had been infected with SARS-CoV-2 and, due to extensive vaccination, displayed hybrid immunity.

KEYWORDS

cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection, neutralizing antibodies, SARS-CoV-2, seroprevalence, T cells

1 | INTRODUCTION

Spain has been severely affected by the SARS-CoV-2 pandemic, with more than 12.4 million microbiologically confirmed cases as of June 8th, 2022.¹ The Valencian Community (VC) is the fourth most populous Spanish autonomous community with more than five million inhabitants and has reported around 1.5 million SARS-CoV-2 infections and almost 10,000 attributed deaths to date.¹ Importantly, a large percentage of the VC population has received either a primary full vaccination series (93.9%) or a booster vaccination schedule (57.3%).² Registries of confirmed COVID-19 cases tend to underestimate the cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection, as previously shown in the ENE-COVID study, a nationwide, population-based, seroepidemiological study conducted in Spain during 2020.³

Some serosurvey studies in the general population and extending into the Omicron wave have been reported.^{4–6} These studies provided valuable information on the extent of transmission in the past and contributed toward understanding the future course of the pandemic and shaping public health decision-making. Here, as part of the ProVaVac Valencian COVID-19 vaccine research program, we conducted a population-based study aimed primarily at estimating the cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general VC population after the surge and spread of the Omicron BA.1 variant. Given that both SARS-CoV-2-Spike (S)-binding functional antibodies and S-reactive T cells elicited following vaccination or natural infection seemingly contribute toward protecting against severe COVID-19,^{7–9} we also assessed the impact of COVID-19 vaccination, SARS-CoV-2 infection and time elapsed between these two events on SARS-CoV-2 humoral and cellular immune status. We specifically measured anti-SARS-CoV-2-S(Spike)-Receptor Binding domain (RBD) total antibody levels in all participants, and SARS-CoV-2-S Wuhan-Hu-1 (G614), Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing

antibody (NtAb) titers and SARS-CoV-2-S-reactive IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell levels in a subsample of randomly selected subjects, representative of the population recruited.

2 | METHODS

2.1 | Study design and setting

The current cross-sectional, region-wide study was conducted in the primary care zones (PCZ) of the Valencia Health System in April 2022, after the Omicron BA.1 variant had spread extensively within the VC. A sample size of 998 participants was calculated to achieve a precision of $\pm 1\%$ (Supplementary material). For operational reasons, 100 PCZs were randomly selected to simplify sample transport logistics. Each PCZ was given a specific date on which to collect between 8 and 17 samples depending on the size of the population served, stratified by age and sex. An additional sodium heparin 5 cc tube was collected from patients having blood drawn on doctor's orders for any reason and fulfilling the age/sex selection criteria assigned to each center. The informed consent requirement was waived by the Research Ethics Committee of Public Health (ref. 20220408/02) because the project was developed under the epidemiological surveillance competencies of the VC Ministry of Health (Law 10/2014 of the Valencian Community on Public Health).

2.2 | Variables and definitions

Registered, prior SARS-CoV-2 infection was established by consulting the VC microbiology registry (RedMiVa) and taking into account

the results of SARS-CoV-2 antibody assays performed, as described below. The vaccination status of participants was obtained from the VC vaccination registry. Participants were grouped into the following categories: vaccinated/experienced (VAC-ex, vaccinated individuals with a record of a positive AIDT—active infection diagnostic test—result and/or serological evidence of past infection), vaccinated/naïve (VAC-n, vaccinated participants with no record or serological evidence of previous SARS-CoV-2 infection), unvaccinated/experienced (UNVAC-ex, unvaccinated population with history or serological evidence of prior SARS-CoV-2 infection) and unvaccinated/naïve (UNVAC-n, unvaccinated population with no history or serological evidence of prior SARS-CoV-2 infection). AIDTs included rapid antigen-detection assays targeting the N protein or commercially-available RT-PCRs.

2.3 | Immunological testing

Serum SARS-CoV-2-RBD-total antibodies and nucleocapsid (N)-reactive IgG antibodies were measured using the Roche Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S and Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 N assays (Roche Diagnostics), respectively. Neutralizing antibodies (NtAb) targeting the S protein were measured using a GFP-expressing vesicular stomatitis virus pseudotyped with the Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1 and BA.2 variants, as previously described¹⁰ (Supplementary Material). SARS-CoV-2-S specific-IFN γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells were enumerated by whole-blood flow cytometry for intracellular cytokine staining ICS (BD Fastimmune, Becton Dickinson and Company Biosciences, San Jose, CA), as previously reported^{10,11} (Supplementary Material).

2.4 | Statistical analysis

Frequency comparisons for categorical variables were carried out using the Fisher exact test. Differences between medians were compared via the Mann-Whitney U, Wilcoxon or Kruskal-Wallis test, as appropriate. Two-sided exact *p*-values were reported; a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. The overall results are shown for the sample and weighted by the proportion of VC population in each age/sex stratum. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS) and STATA 17.0 (StataCorp).

3 | RESULTS

3.1 | Participants' characteristics

Of 1043 eligible participants, 935 (89.6%) subjects—524 (56%) females and 411 (44%) males—aged between 0 and 87 years were finally enrolled in the study (Supporting Information: Table S1). The nonattendance of participants matching predetermined requirements

regarding sex and age prevented full recruitment. The number of participants from each VC province was balanced to the respective population size. Detailed information regarding the vaccine platforms used and the number of doses received by participants is shown in Supporting Information: Table S2. In summary, 812 (86.8%) participants had received a complete vaccination schedule (in most cases, Comirnaty® or Spikevax®), 39 (4.1%) were incompletely vaccinated and 84 (8.9%) were unvaccinated (48% children aged under 9 years) at the time of recruitment. The percentage of fully vaccinated participants increased with age. Booster vaccine doses were administered to 582 (69%) participants (homologous in 276 and heterologous in 306) (Table 1). The median time elapsed between last vaccine dose and recruitment was 118 days (range: 2–428).

3.2 | Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection

Blood volume was insufficient for analysis in four participants, who were accordingly excluded, leaving 931 individuals for the analyses detailed in continuation. Past SARS-CoV-2 infection was documented in a total of 442 (47.4%) participants (Table 2 and Supporting Information: Table S3), based on the presence of anti-SARS-CoV-2-N IgGs (*n* = 404), a recorded positive AIDT result (*n* = 237) or isolated detection of anti-SARS-CoV-2-RBD total antibodies in unvaccinated/SARS-CoV-2-naïve individuals (*n* = 16). The crude cumulative incidence of prior SARS-CoV-2 infection in the VC was 47.4% (95% confidence interval [CI]: 44.1–50.6), whereas age/sex weighted cumulative incidence was 51.9% (95% CI: 48.7–55.1). The rate of past SARS-CoV-2 infection was inversely related to age; evidence of prior SARS-CoV-2 infection was found in more than two-thirds of subjects under 34 years of age, in contrast to around a quarter of those over 65. Importantly, among participants with a documented positive AIDT result (*n* = 237), 11% were diagnosed with SARS-CoV-2 infection in 2020 (*n* = 25), 22% in the first semester of 2021 (*n* = 52), 17% in the second semester of 2021 (*n* = 40) and 51% in the first trimester of 2022 (*n* = 120), periods when the ancestral Wuhan-Hu-1 (including G614), Alpha, Delta and Omicron BA.1 variants, respectively, were dominant in the VC. Overall, the median time elapsed between microbiological diagnosis of SARS-CoV-2 infection and recruitment was 111 days (range: 8–591). For analytical purposes, participants were grouped as VAC-ex (*n* = 379), VAC-n (*n* = 472), UNVAC-ex (*n* = 63), and UNVAC-n (*n* = 21).

3.3 | Anti-SARS-CoV-2-RBD total antibodies

Overall, 906/931 (97.3%) had detectable anti-RBD total antibodies; most individuals (23/25) with undetectable antibody levels were UNVAC-n children. As shown in Figure 1A, median anti-RBD total antibody levels were significantly higher (*p* < 0.001) in VAC-ex than in VAC-n participants (median: 23,120 BAU/ml; IQR: 10,186–46,196 vs. median: 9,023 BAU/ml; IQR: 3844–20,329); this difference was

TABLE 1 COVID-19 Vaccination status among participants according to their age

Age groups (no. of participants)	Vaccination status					Nonvaccinated participants (%)
	No. of participants (%) that received an incomplete vaccine schedule	No. of participants (%) that received a complete vaccine schedule	No. of participants that received booster COVID-19 vaccine dose/s (%)			
			All combined	Heterologous	Homologous	
All ages (935)	39 (4)	812 (89)	582 (69)	306 (52□5)	276 (47□5)	84 (9)
0–9 (40)	13 (33)	8 (20)	0	-	-	19 (48)
10–19 (88)	10 (11)	68 (77)	9 (12)	7 (78)	2 (22)	10 (11)
20–34 (150)	10 (7)	126 (84)	63 (46)	50 (79)	13 (21)	14 (9)
35–49 (181)	4 (2)	158 (87)	103 (64)	79 (77)	24 (23)	19 (10)
50–64 (174)	1 (1)	169 (97)	135 (79)	114 (84)	21 (16)	4 (2)
65–79 (160)	1 (1)	152 (95)	145 (95)	48 (33)	97 (67)	7 (4)
>80 (142)	0 (0)	131 (92)	127 (97)	8 (6)	119 (94)	11 (8)

TABLE 2 Cumulative incidence of past SARS-CoV-2 infection, as determined by active infection diagnostic test and/or serological assays by participants' age

Age (years) group (no. of participants)	Record of a positive AIDT result (%; 95% CI)	Detectable anti-SARS-CoV-2 N IgG (%; 95% CI)	Detectable anti-SARS-CoV-2 RBD total antibodies (%; 95% CI)	Past SARS-CoV-2 infection (%; 95% CI) ^a
0–9 (40)	35.0 (20.6–51.7)	62.4 (46.7–78.1)	80.0 (67.0–93.0)	65.0 (48.3–79.4)
10–19 (87)	29.9 (20.5–40.6)	65.6 (55.4–75.8)	98.8 (96.6–100)	69.0 (58.1–78.4)
20–34 (150)	39.3 (31.5–47.6)	61.2 (53.3–69.1)	97.3 (94.7–99.9)	64.0 (55.8–71.7)
35–49 (181)	32.0 (25.3–39.4)	51.2 (43.8–58.5)	98.3 (96.5–100)	56.9 (49.3–64.2)
50–64 (173)	27.2 (20.7–34.4)	44.5 (37.0–52.0)	98.3 (96.3–100)	47.4 (39.8–55.1)
65–79 (159)	11.9 (7.3–18.0)	22.0 (15.5–28.6)	98.7 (97.0–100)	26.4 (19.7–34.0)
≥80 (141)	9.2 (5.0–15.2)	18.4 (11.9–24.8)	97.2 (94.3–99.9)	22.7 (16.1–30.5)
Total (931)	25.3 (22.6–28.3)	43.4 (40.2–46.6)	97.3 (96.3–98.4)	47.4 (44.1–50.6)
Total _w (931) ^b	28.2 (25.3–31.1)	47.9 (44.7–51.1)	96.7 (95.5–97.8)	51.9 (48.7–55.1)

Abbreviations: AIDT, active infection diagnostic test (antigen or RT-PCR-bases assays); CI, confidence interval; N, SARS-CoV-2 nucleocapsid protein; RBD, receptor binding domain.

^aOne or more of the following: positive AIDT result, detectable anti-SARS-CoV-2 N IgG or detectable anti-SARS-CoV-2 RBG total antibodies in unvaccinated participants (in the absence of anti-N IgG, and history of a positive AIDT test).

^bTotal age/sex weighted Valencia Community population.

observed across most age ranges (Supporting Information: Figure S1). In turn, VAC-ex and VAC-n individuals displayed significantly higher ($p < 0.001$) antibody levels than UNVAC-ex participants (median: 622 BAU/ml; IQR: 82–6913).

Compared with VAC-n, individuals in the VAC-ex subgroup were younger (median: 41 years; range: 5–94 years; vs. 62 years; range: 5–95; $p < 0.001$) and more frequently men (49% vs. 40%; $p < 0.02$). Importantly, time elapsed between last vaccine dose and testing was shorter in VAC-n than in VAC-ex subjects (median: 116 days; range: 0–428 vs. 150 days; range: 0–343; $p < 0.001$), as the former were more likely ($p < 0.001$) to have received a booster vaccine dose than the latter (83.5% vs. 44.3%). In turn, VAC-ex and UNVAC-ex participants were matched for sex ($p = 0.62$)

and time since diagnosis of SARS-CoV-2 infection (median: 92 days; range: 8–718; vs. median: 82 days; range: 51–516; $p = 0.25$). Nevertheless, the UNVAC-ex subgroup comprised more participants aged under 9 years than the VAC-ex group, which included more subjects aged 50–64 years ($p < 0.001$).

Overall, the number of vaccine doses received had a direct impact on the level of anti-RBD total antibodies, irrespective of SARS-CoV-2 infection status (Figure 1B). Interestingly, among participants who had received a third vaccine dose, heterologous booster shots resulted in increased anti-RBD antibody levels compared with homologous schedules in SARS-CoV-2-naïve, but not SARS-CoV-2-experienced participants, regardless of age and sex (Figure 1C).

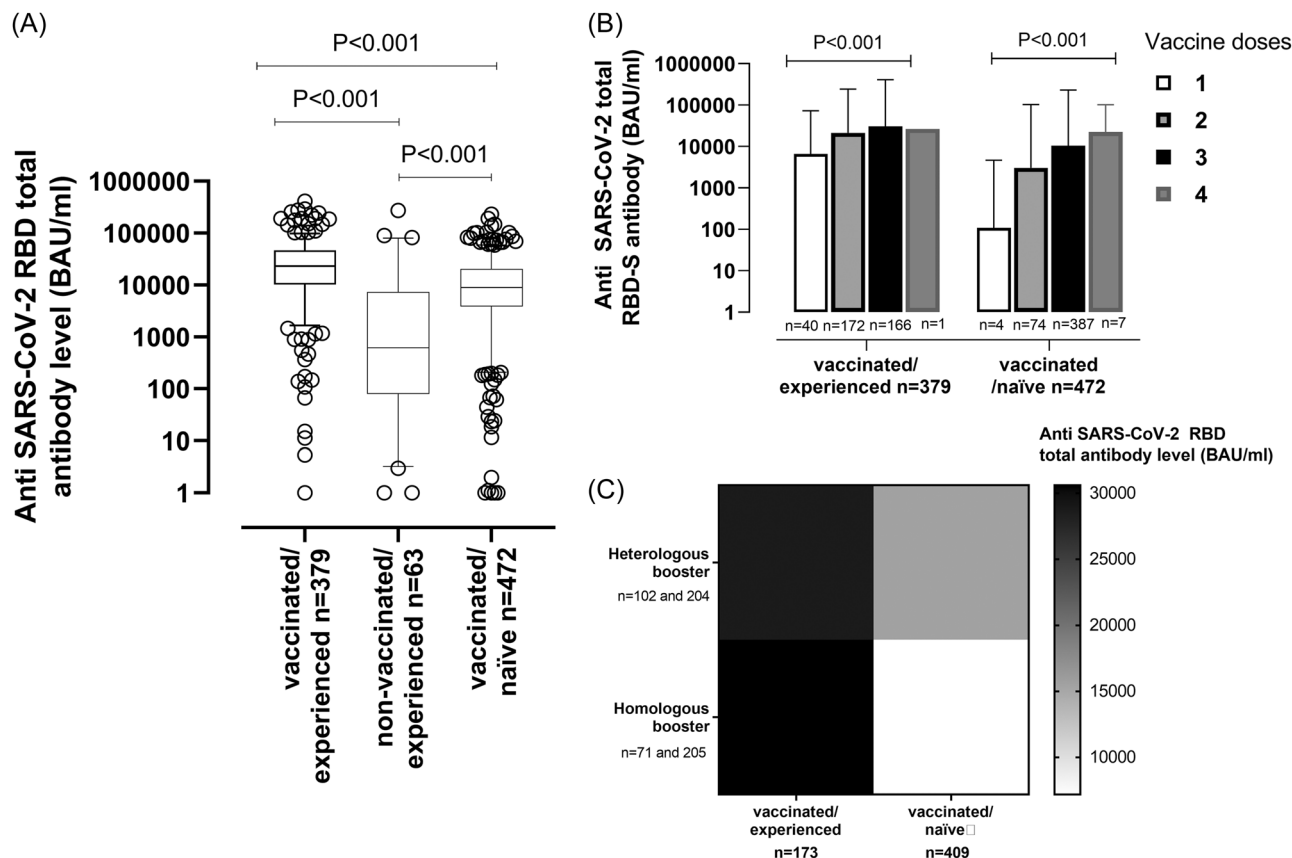


FIGURE 1 SARS-CoV-2-receptor binding domain (RBD) total antibodies (in BAU/ml) in participants. (A) Box Whisker plots depicting serum antibody levels according to vaccination and SARS-CoV-2 infection status at time of recruitment. (B) Box Whisker plots depicting serum antibody levels in vaccinated/SARS-CoV-2-experienced and vaccinated/SARS-CoV-2-naïve participants by number of vaccine doses received. (C) Serum antibody levels in vaccinated/SARS-CoV-2-experienced and vaccinated/SARS-CoV-2-naïve receiving one or more booster doses by booster type (homologous vs. heterologous). *p*-values for statistical comparisons are shown where appropriate.

However, no correlation was found between time elapsed since last vaccine dose and anti-RBD total antibody levels (ρ : -0.02; 95% CI: -0.13 to 0.07; p = 0.57) in VAC-ex individuals, whereas a moderate inverse correlation (ρ : -0.52; 95% CI: -0.59 to -0.45; p < 0.001) was observed in VAC-n (Figure 2). Interestingly, in VAC-ex participants with a recorded positive AIDT result (n = 220) (Figure 3), time elapsed since documentation of SARS-CoV-2 infection correlated weakly (inversely) with anti-RBD antibody levels (ρ : -0.30; 95% CI: -0.42 to -0.17; p < 0.001).

Finally, subtle age-related differences in anti-RBD total antibody levels were noticed in both VAC-ex and VAC-n subgroups (Supporting Information: Figure S1), which were likely related to dissimilarities across age groups regarding the number of vaccine shots received and time elapsed since administration of the last vaccine dose.

3.4 | Neutralizing antibodies against the ancestral Wuhan-Hu-1 and Omicron subvariants

A total of 100 randomly selected participants across all age groups were screened for the presence of NtAb against SARS-CoV-2 (sub)

variants. The main characteristics of the subjects evaluated are shown in Supporting Information: Table S4.

The proportions of participants presenting NtAbs against the Wuhan-Hu-1 variant were 100%, 93%, and 40% in the VAC-ex, VAC-n and UNVAC-ex groups, respectively; for Omicron BA.1, the percentages were 94%, 75%, and 50%, respectively; and for Omicron BA.2, 97%, 84%, and 40%, respectively.

Overall, NtAb titers were lower against Omicron BA.1 and BA.2 than against Wuhan-Hu-1 across all comparison groups; in turn, median levels of NtAb binding Omicron BA.1 and BA.2 were comparable across all study groups (Figure 4). Of note, NtAb targeting all (sub)variants screened were higher in VAC-ex than in VAC-n individuals, although statistical significance was reached for those against Wuhan-Hu-1 (p = 0.05) and BA.1 (p = 0.008), but not against BA.2 (p = 0.74) (Figure 4). Moreover, both VAC-ex and VAC-n displayed higher NtAb titers than UNVAC-ex participants (p = 0.001 for Wuhan Hu-1; p = 0.052 for BA.1 and p = 0.003 for BA.2). Overall, comparable NtAb titers against all (sub)variants tested were seen across VAC-ex participants whether boosted with an additional vaccine dose or not (Supporting Information: Table S5). Nevertheless, a significant, although weak, inverse

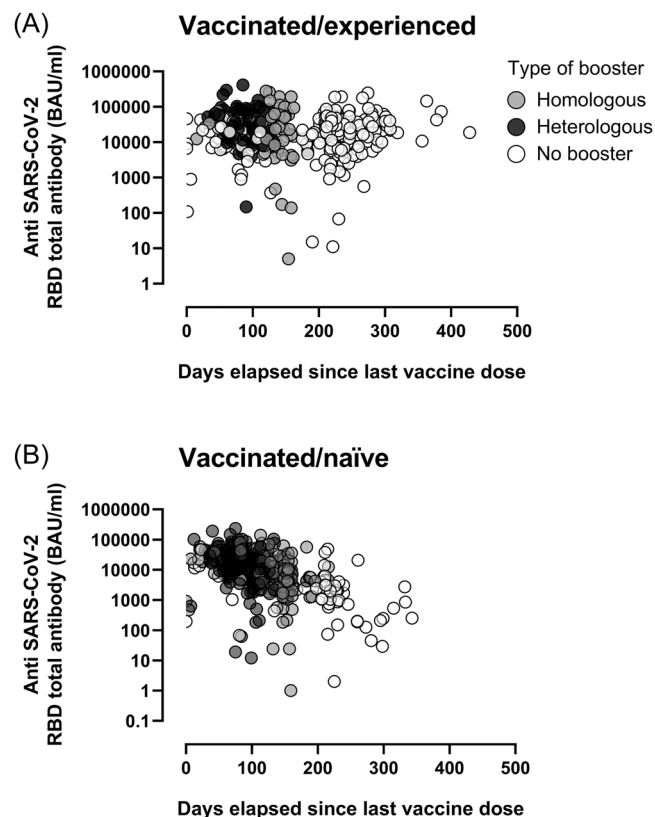


FIGURE 2 SARS-CoV-2-receptor binding domain (RBD) total antibodies (in BAU/ml) in vaccinated/SARS-CoV-2-experienced (A) and vaccinated/SARS-CoV-2-naïve (B) participants according to the vaccination schedule (full vaccination with no booster dose, homologous booster dose and heterologous booster dose) and time elapsed since last vaccine dose.

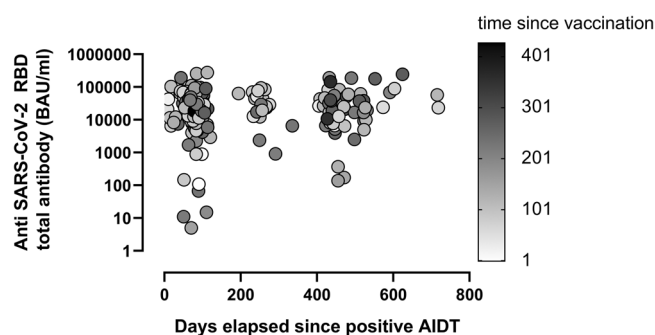


FIGURE 3 SARS-CoV-2-receptor binding domain (RBD) total antibodies (in BAU/ml) in vaccinated/SARS-CoV-2 experienced participants with a history of a positive active infection diagnostic test (AIDT) according to time elapsed since documentation of the positive result and time since last vaccine dose.

correlation between NtAb titers against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1 and time elapsed since last vaccine dose was observed in VAC-n but not VAC-ex individuals (Supporting Information: Table S6).

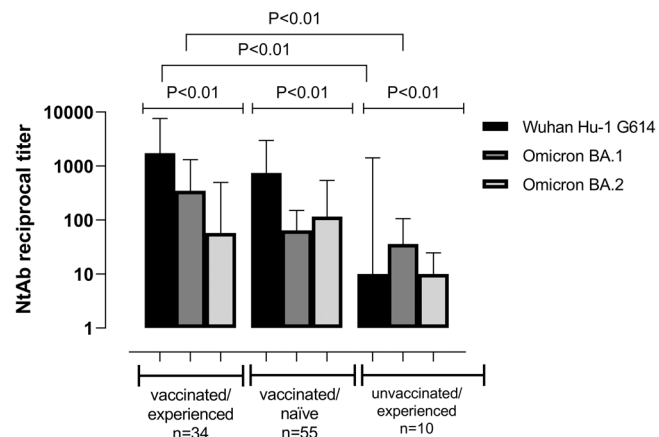


FIGURE 4 Serum neutralizing antibody titers (reciprocal IC₅₀) against SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, Omicron BA.1 and BA.2 (sub) variants in vaccinated/SARS-CoV-2 experienced, vaccinated/SARS-CoV-2 naïve participants and unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced participants. Vaccinated/experienced, vaccinated/naïve and nonvaccinated/experienced participants were matched for sex and age, and vaccinated participants for booster type. Nevertheless, time since last vaccine dose was significantly shorter ($p < 0.001$) in vaccinated/naïve than in vaccinated/experienced participants (median 116 days; range, 29–298; vs. 162 days; range, 0–308). p -values for statistical comparisons are shown.

3.5 | SARS-CoV-2-Spike T-cell responses

We enumerated SARS-CoV-2-S-reactive IFN- γ CD4⁺ and CD8⁺ T cells in 137 participants (Supporting Information: Table S4). Overall, 101 (73.7%) participants had detectable SARS-CoV-2-S-IFN- γ T cells: CD4⁺ ($n = 15$; 14.9%), CD8⁺ ($n = 41$; 40.6%) or both ($n = 45$; 44.6%). In detail, the figures were 73%, 75%, and 64% for VAC-ex, VAC-n, and UNVAC-ex, respectively. Median frequencies of both T-cell subsets were comparable across subgroups ($p = 0.92$ for CD8⁺ T cells and $p = 0.80$ for CD4⁺ T cells) (Figure 5). Likewise, neither age ($p = 0.86$) nor sex ($p = 0.57$) impacted the median frequencies of the two T-cell subsets. SARS-CoV-2 T-cell subset frequencies were comparable irrespective of having received booster vaccine doses (Supporting Information: Table S5), or time elapsed since last vaccine dose (Supporting Information: Table S6) in both VAC-ex and VAC-n individuals.

4 | DISCUSSION

To date, only a handful of seroepidemiological studies extending into the Omicron wave have been performed in the general population.^{4–6} Here, we conducted a cross-sectional serosurvey to estimate the prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in the general VC population after the Omicron BA.1 variant surge and retrieved prior documented SARS-CoV-2 infection data for the recruited population from the RedMiVa VC registry. Our results can probably be extrapolated to other autonomous communities in Spain, as previously suggested.³ We estimated an age/sex weighted cumulative incidence of prior

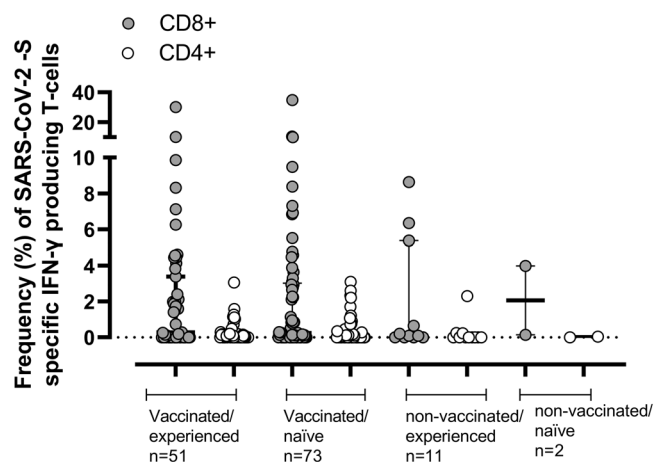


FIGURE 5 Frequency of SARS-CoV-2-Spike(S)-reactive IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vaccinated/SARS-CoV-2 experienced, vaccinated/SARS-CoV-2 naïve participants, unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced and unvaccinated/SARS-CoV-2 naïve participants. Vaccinated/experienced, vaccinated/naïve and unvaccinated/experienced participants were balanced for sex and age, and for vaccinated individuals for booster type; nevertheless, time since last vaccine dose was significantly lower ($p < 0.001$) in vaccinated/naïve than in vaccinated/experienced participants (median 113 days; range, 0–298; vs. 175 days; range, 0–308).

SARS-CoV-2 infection of 51.9% (95% CI: 48.7–55.1). While this figure was comparable across males and females, age-related differences were observed, the highest rate occurring in individuals under 34 years of age and the lowest in those aged 65 or older. Such differences could be explained by dissimilarities in the rate of full or booster vaccination and social behavior across age groups. Interestingly, around 9% of participants lacked anti-SARS-CoV-2-N antibodies despite documentation of previous SARS-CoV-2 infection, suggesting, in line with previous findings,¹² that assessment of anti-N antibodies alone might underestimate the incidence of SARS-CoV-2 infection.

Evaluation of SARS-CoV-2 immune status according to vaccination schedule, time elapsed since vaccination, and previous virus exposure also provides valuable information to model the course of the pandemic. Here, we measured serum anti-RBD total antibody levels, as a surrogate for serum neutralizing activity,^{6,7} in all participants, and NtAb titers and the frequency of peripheral blood SARS-CoV-2-S-reactive IFN- γ CD4⁺ and CD8⁺ T cells in a randomly selected subset representing the entire study population. In our view, the following facts were relevant for data interpretation. First, the median time elapsed from last vaccine dose to testing was around 4 months; second, among participants with a documented positive AIDT result, the median time elapsed between SARS-CoV-2 diagnosis and recruitment was 111 days overall; third, as stated above, approximately 50% of SARS-CoV-2 infections in recruited subjects with a positive AIDT result were seemingly caused by the Omicron BA.1 variant.

In this setting, 97% of participants had detectable anti-RBD total antibodies, whose levels were increased in VAC-ex individuals compared with VAC-n participants and, especially, with UNVAC-ex individuals matched for time of SARS-CoV-2 diagnosis, suggesting that antibody waning may occur more rapidly in these latter individuals. VAC-ex participants displayed higher levels of anti-RBD total antibodies than VAC-n across virtually all age groups. This occurred irrespective of the number of vaccine doses received and despite VAC-n having received the last vaccine dose (in most cases a booster) more recently than VAC-ex subjects. Importantly, the increase in anti-RBD total antibodies following a booster vaccine dose was greater in VAC-n than VAC-ex participants, particularly after a heterologous boost, in line with previous findings.^{13,14} Our data suggested that anti-RBD total antibody responses may be more durable in VAC-ex, as evidenced by an inverse correlation between time elapsed since last vaccine dose and anti-RBD total antibody levels in VAC-n but not VAC-ex participants. In addition, time elapsed since documentation of SARS-CoV-2 infection correlated weakly (inversely) with anti-RBD antibody levels in VAC-ex participants. Taken collectively, this data suggested that hybrid immunity provided stronger and more durable anti-RBD antibody responses than vaccination alone, which concurs with previous observations.^{12,15–21}

Our data on virus neutralization experiments led to several potentially relevant conclusions. First, the proportion of participants displaying detectable NtAbs against Omicron BA.2, the dominant variant in the VC by May 2022, before completion of the current study, was as high as that against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1; moreover, median levels of NtAbs binding Omicron BA.1 and BA.2 were comparable in participants across all study subgroups, suggesting a substantial degree of B-cell epitope cross-reactivity across these subvariants, as previously observed.²² Our finding that a high percentage of vaccinated participants had either prior SARS-CoV-2 infection or detectable NtAbs against Omicron BA.1 (94% and 75%, respectively) was compatible with the idea that both Wuhan-based vaccine platforms and breakthrough infections elicit cross-reactive antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern^{14,23} and that Omicron BA.1 breakthrough infection may induce sublineage-specific (i.e., BA.2) NtAbs, in addition to recall of memory B cells established by prior vaccination.^{24–26} Second, our data supported the assumption that hybrid immunity provides a more robust and, perhaps, more durable NtAb response against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1 than that elicited by either vaccination or natural infection alone. Nevertheless, this was apparently not the case for BA.2; this could have important implications in the design of vaccination policies in the near future, as currently dominant sublineages worldwide, such as BA.4, BA.5, BA.2.12.1, and BA.2.75 resemble BA.2 more than BA.1 in terms of their ability to escape antibody responses elicited by Wuhan-Hu-1 based vaccines.¹³ Third, our data revealed no differences in NtAb titers against all (sub)variants tested across VAC-ex participants, boosted or not with an additional vaccine dose. Nevertheless, the low number of participants included in the analysis limited the robustness of this conclusion. Detectable SARS-CoV-2 T-cell responses are known to persist up to 8 months following natural infection or

vaccination.²⁷⁻²⁹ Our data supported this notion in that SARS-CoV-2-S- IFN- γ CD4⁺, CD8⁺ T cells, or both could be detected in 75% of participants a median of 4 months after the last vaccine dose. In effect, SARS-CoV-2-S IFN- γ T-cell responses may remain relatively stable over time as frequencies of both T-cell subsets did not correlate with time elapsed since last vaccine dose. Moreover, administering a booster dose had minimal impact on the magnitude of T-cell responses. Interestingly, in contrast to our observations on functional antibodies, we found no differences between VAC-ex and VAC-n regarding the frequencies of either T-cell subset.

A limitation of our study is that it lags behind the emerging SARS-CoV-2 subvariant epidemiological landscape in the VC and world-wide; yet the data on the cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection across the different age groups revealed a virus transmission pattern in our community, which has probably been maintained following the BA.5 and BA.2.12.1 surges (in Spain, the presence of BA.2.75 is currently anecdotal). This may allow public health officials and policymakers to identify hot spots and areas where transmission has been reduced so that they may respond accordingly (selective administration of vaccine boosters or targeted use of monoclonal antibodies, when indicated). Also, our data could help establish selective mitigation tactics upon the emergence and spread of new, highly transmissible sublineages. Our study had other limitations: first, bias may have been introduced by excluding some PCZs and by only including individuals scheduled for blood tests; second, participants were not asked if they had recently experienced COVID-19-related symptoms; Third, SARS-CoV-2 variant sequencing was not performed; Fourth, an unstandardized flow cytometry ICS assay was used for enumerating SARS-CoV-2-S-reactive T cells; Fifth, T-cell functionalities other than IFN- γ production were not explored and Wuhan-Hu-1-based instead of VOC-adapted overlapping peptide libraries were used.

In summary, our study indicated that, by April 2022, around half of the VC population had been infected with SARS-CoV-2 and, due to extensive vaccination, exhibited hybrid immunity. Currently, the BA.5 omicron sublineage dominates in the VC. The large percentage of participants with detectable functional antibody and T-cell responses against SARS-CoV-2, which may be cross-reactive with this subvariant to some extent, indicated lower expected severity than in previous waves. Although pending confirmation in wider studies, this aspect is relevant for public health decision-making.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jorge Camacho, Estela Giménez, Eliseo Albert, Joao Zulaica, Ignacio Torres, Luciana Rusu, Beatriz Álvarez Rodríguez, María Jesús Alcaraz, Iñaki Comas, Fernando Gonzáles-Candelas, and Ron Geller carried out antibody and T-cell assays and validated and analyzed the data. Ramón Limón was responsible for the logistics of the study. Javier S. Burgos, Hermelinda Vanaclocha, Salvador Peiró, José Sánchez-Payá, Javier Díez-Domingo, and David Navarro: conceptualization, study design, and data interpretation. Salvador Peiró and David Navarro wrote the manuscript. All authors reviewed the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the staff and nurses of primary care centers participating in this study. We also thank Ana Berenguer, General Director of Analysis and Public Policies of the Presidency of the Generalitat. Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) and Ignacio Torres (Río Hortega Contract; CM20/00090) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). Ron Geller holds a Ramon y Cajal fellowship from the Spanish Ministry of Economics and Competitiveness (RYC-2015-17517). This work was supported in part by the European Commission NextGenerationEU fund, awarded to RG and IC through CSIC's Global Health Platform (PTI Salud Global).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Jorge Camacho  <http://orcid.org/0000-0002-6602-0966>

Fernando Gonzáles-Candelas  <http://orcid.org/0000-0002-0879-5798>

David Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

REFERENCES

- Spanish Center for the Coordination of Health Alerts and Emergencies. Update no. 605. *Coronavirus Disease (COVID-19)*. Accessed June 9, 2022. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_605_COVID-19.pdf
- Ministry of Health. GIV Covid 19 Comprehensive management of Covid vaccination. Activity report 03.06.2022. *Spanish Ministry of Health*, 2022. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Informe_GIV_comunicacion_20220603.pdf
- Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *The Lancet*. 2020;396:535-544.
- Zamani M, Poustchi H, Mohammadi Z, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibody among urban Iranian population: findings from the second large population-based cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2022;22:1031.
- Clarke KEN, Jones JM, Deng Y, et al. Seroprevalence of Infection-Induced SARS-CoV-2 antibodies - United States, September 2021-February 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022;71:606-608.
- Bingham J, Cable R, Coleman C, et al. Estimates of prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies among blood donors in South Africa. 2022. doi:10.21203/rs.3.rs-1687679/v1
- Liu H, Wilson IA. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunol Rev*. 2022;310(1):76-92. doi:10.1111/imr.1308
- Kent SJ, Khoury DS, Reynaldi A, et al. Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19: leading actors or supporting cast? *Nat Rev Immunol*. 2022;22:387-397.
- Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med*. 2022;291:32-50.

10. Giménez E, Albert E, Zulaica J, et al. SARS-CoV-2 adaptive immunity in nursing home residents following a third dose of the Comirnaty® COVID-19 vaccine. *Clin Infect Dis*. 2022;75(1):e865-e868.
11. Torres I, Albert E, Giménez E, et al. B- and T-cell immune responses elicited by the Comirnaty® COVID-19 vaccine in nursing-home residents. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27:1672-1677.
12. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel. *N Engl J Med*. 2021;385:e85.
13. Cheng H, Peng Z, Si S, et al. Immunogenicity and safety of homologous and heterologous prime-boost immunization with COVID-19 vaccine: systematic review and meta-analysis. *Vaccines*. 2022;10:798.
14. Chiu NC, Chi H, Tu YK, et al. To mix or not to mix? A rapid systematic review of heterologous prime-boost Covid-19 vaccination. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20:1211-1220.
15. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nature Med*. 2021;27:981-984.
16. Stamatatos L, Czartoski J, Wan YH, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*. 2021;372:1413-1418.
17. Guo Y, Han J, Zhang Y, et al. SARS-CoV-2 omicron variant: epidemiological features, biological characteristics, and clinical significance. *Front Immunol*. 2022;13:87710.
18. Choudhary HR, Parai D, Dash GC, et al. IgG antibody response against nucleocapsid and spike protein post-SARS-CoV-2 infection. *Infection*. 2021;49:1045-1048.
19. Wratil PR, Stern M, Priller A, et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nature Med*. 2022;28:496-503.
20. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Protection and waning of natural and hybrid immunity to SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2022;386:2201-2212.
21. Epsi NJ, Richard SA, Lindholm DA, et al. Understanding 'hybrid immunity': comparison and predictors of humoral immune responses to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Clin Infect Dis*. 2022;ciac392. doi:10.1093/cid/ciac392
22. Yu J, Collier AY, Rowe M, et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2 variants. *N Engl J Med*. 2022;386:1579-1580.
23. Tan CW, Chia WN, Young BE, et al. Pan-sarbecovirus neutralizing antibodies in BNT162b2-Immunized SARS-CoV-1 survivors. *N Engl J Med*. 2021;385:1401-1406.
24. Garcia-Beltran WF, St. Denis KJ, Hoelzemer A, et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell*. 2022;185:457-466.e4.
25. Kaku CI, Bergeron AJ, Ahlm C, et al. Recall of pre-existing cross-reactive B cell memory following Omicron BA.1 breakthrough infection. *Sci Immunol*. 2022;(73):eabq3511.
26. Windsor IW, Tong P, Lavidor O, et al. Antibodies induced by ancestral SARS-CoV-2 strain that cross-neutralize variants from Alpha to Omicron BA.1. *Sci Immunol*. 2022;7(74):eabo3425. doi:10.1126/sciimmunol.abo3425
27. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, et al. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *BioRxiv*. 2022;185(14):2434-2451.e17. doi:10.1016/j.cell.2022.05.022
28. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371:eabf4063.
29. Mateus J, Dan JM, Zhang Z, et al. Low-dose mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells. *Science*. 2021;374:eabj9853.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Camacho J, Giménez E, Albert E, et al. Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the Valencian Community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant. *J Med Virol*. 2022;e28284. doi:10.1002/jmv.28284

RESEARCH ARTICLE

A performance comparison of two (electro) chemiluminescence immunoassays for detection and quantitation of serum anti-spike antibodies according to SARS-CoV-2 vaccination and infections status

Jorge Camacho¹  | Eliseo Albert¹ | Joao Zulaica² | Beatriz Álvarez-Rodríguez² | Luciana Rusu² | Beatriz Olea¹ | María Jesús Alcaraz¹ | Ron Geller² | Estela Giménez^{1,3} | David Navarro^{1,3,4} 

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

²Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de Valencia-CSIC, Valencia, Spain

³CIBERINFEC (Centro de investigación en red de enfermedades infecciosas), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain.
Email: david.navarro@uv.es

Funding information

European Regional Development Fund; Instituto de Salud Carlos III

Abstract

The information provided by SARS-CoV-2 spike (S)-targeting immunoassays can be instrumental in clinical-decision making. We compared the performance of the Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S assay (Roche Diagnostics) and the LIAISON® SARS-CoV-2 TrimericS IgG assay (DiaSorin) using a total of 1176 sera from 797 individuals, of which 286 were from vaccinated-SARS-CoV-2/experienced (Vac-Ex), 581 from vaccinated/naïve (Vac-N), 147 from unvaccinated/experienced (Unvac-Ex), and 162 from unvaccinated/naïve (Unvac-N) individuals. The Roche assay returned a higher number of positive results (907 vs. 790; $p = 0.45$; overall sensitivity: 89.3% vs. 77.6%). The concordance between results provided by the two immunoassays was higher for sera from Vac-N (κ : 0.58; interquartile ranges [IQR]: 0.50–0.65) than for sera from Vac-Ex (κ : 0.19; IQR: –0.14 to 0.52) or Unvac-Ex (κ : 0.18; IQR: 0.06–0.30). Discordant results occurred more frequently among sera from Unvac-Ex (34.7%) followed by Vac-N (14.6%) and Vac-Ex (2.7%). Antibody levels quantified by both immunoassays were not significantly different when <250 ($p = 0.87$) or <1000 BAU/ml ($p = 0.13$); in contrast, for sera ≥ 1000 BAU/ml, the Roche assay returned significantly higher values than the DiaSorin assay ($p < 0.008$). Neutralizing antibody titers (NtAb) were measured in 127 sera from Vac-Ex or Vac-N using a S-pseudotyped virus neutralization assay of Wuhan-Hu-1, Omicron BA.1, and Omicron BA.2. The correlation between antibody levels and NtAb titers was higher for sera from Vac-N than those from Vac-Ex, irrespective of the (sub)variant considered. In conclusion, neither qualitative nor quantitative results returned by both immunoassays are interchangeable. The performance of both assays was found to be greatly influenced by the vaccination and SARS-CoV-2 infection status of individuals.

Estela Giménez and David Navarro are senior authors who contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

KEYWORDS

antibodies, DiaSorin immunoassay, neutralizing antibodies, receptor binding domain antibodies, Roche immunoassay, SARS-CoV-2, S-trimeric antibodies

1 | INTRODUCTION

Extensive evidence supports a major role of antibodies binding the spike (S) protein of SARS-CoV-2 in providing protection against acquisition of infection and development of COVID-19, in particular those displaying virus-neutralizing activity elicited following vaccination or after natural infection^{1–6}; nevertheless, elucidation of antibody thresholds conferring protection remains elusive. Detection and quantitative estimation of S-binding antibodies are pivotal for assessment of immune status against SARS-CoV-2, due to their potential use to gauge the need to administer booster vaccine dose or S-specific monoclonal antibodies on a preexposure basis at the individual level in highly vulnerable populations such as immunosuppressed patients.^{7,8} Numerous immunoassays permitting quantitative assessment of SARS-CoV-2-S binding antibodies have been marketed, with potential differences in the analytical design, performance characteristics, immunoglobulin class measured, and the nature of SARS-CoV-2 antigen to which target antibodies are directed (i.e., receptor binding domain [RBD]—the S protein in its trimeric conformation, or the S1 or S2 subunits).⁹ As a result, immunoassays may return discordant qualitative or quantitative results,^{10–18} the latter despite calibration to the first WHO SARS-CoV-2 antibody international standard.¹⁹ Moreover, the correlation between antibody levels quantitated by S-targeting antibody assays and virus neutralizing antibody titers (NtAb) may differ notably across immunoassays.^{20–22} Against this background, using a large panel of sera we carried out a head-to-head comparison study assessing the performance of two widely used (electro)chemiluminescence immunoassays: the Elecsys[®] Anti-SARS-CoV-2 S assay (Roche Diagnostics), which quantifies total antibodies against the RBD domain on the S protein, and the LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG assay (DiaSorin S.p.A), which measures IgG against the S protein on its trimeric conformation according to the vaccination and SARS-CoV-2 infection status of participants.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sera and participants

This retrospective study included 1176 consecutive sera from 797 individuals (median age: 58 years; range: 1–100; 428 female/369 male), collected between January 2021 and April 2022. Serological determinations were performed upon physician or public health authority request. History of past SARS-CoV-2 infection was established after examination of the Valencian Community Microbiology registry (RedMiVa). Vaccination status of participants was

obtained from the Valencian Community Vaccination Registry. According to their vaccination and SARS-CoV-2 infection status at the time of testing, participants were grouped into the following categories: (i) vaccinated/SARS-CoV-2-experienced (Vac-Ex); that is, patients who had completed a full vaccination schedule and had a record of a positive active infection diagnostic test (AIDT) result and/or serological evidence of past infection (presence of SARS-CoV-2-Nucleocapsid [N] IgG); (ii) vaccinated/SARS-CoV-2-naïve (Vac-N), in whom no record or serological evidence of previous SARS-CoV-2 infection was available; (iii) non-vaccinated/SARS-CoV-2-experienced (Unvac-Ex); (iv) non-vaccinated/SARS-CoV-2-naïve (Unvac-N). The study was approved by the INCLIVA Research Ethics Committee (December, 2020), and informed consent was waived due to its retrospective nature.

2.2 | SARS-CoV-2-S-targeting (electro)chemiluminescence immunoassays

The Roche Elecsys[®] anti-SARS-CoV-2 S is an electrochemiluminescence sandwich immunoassay (ECLIA) that detects total antibodies (IgG/IgM/IgA) directed against the RBD of the S protein. According to the manufacturer's the quantification range is between 0.4 and 25 000 BAU/ml (1/100 dilution) and 0.8 BAU/ml is used as a cut-off for positivity. The assay is linear up to 50 000 BAU/ml (1/200 dilution). The LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG assay (DiaSorin S.p.A) is a chemiluminescence assay that detects IgG against the S protein on its trimeric conformation. The quantification range is between 4.81 and 2080 BAU/ml, and the cut-off for positivity is 33.8 BAU/ml. According to the manufacturer's, the assay keeps linearity up to 41 600 BAU/ml (1/20 dilution). Specimens were assayed at the Microbiology Service of the Hospital Clínico Universitario of Valencia in singlets within 24 h of collection. Sera were kept at 4°C until testing.

2.3 | Virus neutralization assay

NtAb targeting the S protein were measured using a Green Fluorescent protein-expressing vesicular stomatitis virus pseudotyped with the Wuhan-Hu-1 variant, and Omicron BA.1 and BA.2 sublineages, following a previously published protocol,^{23,24} with several modifications (Supporting Information material). Sera resulting in less than 50% neutralization at the lowest dilution tested were arbitrarily ascribed a reciprocal antibody titer of 10 (the limit of detection of the assay). Cryopreserved (–70°C) sera were retrieved for virus neutralization assays, which were carried out at the Institute

for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de Valencia-CSIC.

2.4 | Statistical analysis

Continuous variables are reported in medians and interquartile ranges (IQR). Medians were compared by the Mann–Whitney *U* test or Kruskal–Wallis test, for two or more unpaired samples and the Wilcoxon rank test for paired data, as appropriate. Frequency comparison across groups was performed using Fisher's exact test. Cohen's kappa and Spearman's rank correlations were applied to evaluate between-assay agreement; correlation coefficient interpretation was as previously suggested.²⁵ Fisher–Z-transformation of *p* values was conducted to statistical comparison.²⁶ Being *a* the number of specimens returning positive results by both comparison tests, *b* and *c* the number of specimens retrieving discordant (positive/negative) results by either method and *d*, the number of specimens testing negative by both tests, the positive percent agreement (PPA) was defined by $[a/a + b] \times 100$ and the negative percent agreement by $[d/c + d] \times 100$. When deemed appropriate, the term sensitivity was used referring to the rate of detection of antibodies in Vac-Ex, Vac-N, and Unvac-Ex. The specificity of the respective assay was calculated taking into account sera from Unvac-N individuals. The Bland–Altman test was used to evaluate mean differences of values measured by the two immunoassays. Receiver operating characteristic (ROC) curves were built to assess the sensitivity and specificity for every possible cut-off value of a given immunoassay predicting NtAb detectability (≥ 10 reciprocal IC₅₀). Two-sided exact *p* values were reported. A *p* < 0.05 was considered statistically significant. The analyses and graphs were performed using SPSS version 20.0 (SPSS) and GraphPad Software Inc. v6.0, respectively.

3 | RESULTS

A total of 1176 sera from 797 individuals were included in the study, of which 286 sera were collected from 204 Vac-Ex, 581 from 316 Vac-N, 147 from 134 Unvac-Ex, and 162 from 143 Unvac-N. Of relevance, a record of a positive active infection diagnostic test (Valencian Community RedMiva Registry) was available from 232 individuals. According to the dominance of SARS-CoV-2 variants in the Valencian Community at the time of diagnosis, the ancestral, Alpha, Delta, and Omicron variant were allegedly responsible of 13, 114, 100, and 6 cases, respectively. Median time since diagnosis to sample collection was 120 days (IQR: 30–320 days). Note that in vaccinated participants, time elapsed since receipt of last vaccine dose to collection of sera was a median of 51 days (IQR: 19.3–103.8) for SARS-CoV-2-naïve, and a median of 98 days (IQR: 30.3–180.3) for SARS-CoV-2-experienced. For those with a record of a positive

AIDT, the time from diagnosis to serum testing was a median of 172.5 (IQR: 18.3–281.8) and 29 days (IQR: 6.3–110.5) in vaccinated and non-vaccinated individuals, respectively.

3.1 | Qualitative agreement between immunoassays

Overall, a larger number of sera returned positive results by the Roche assay compared to the DiaSorin assay (907 vs. 790; *p* = 0.45; κ : 0.69; 95% CI: 0.71–0.84), this translating into a higher overall sensitivity for detection of previous exposure or vaccination was higher for the Roche assay (89.3% vs. 77.6%). This was consistent across all study groups, except for the Unvac-N, but only reached statistical significance for sera from Unvac-Ex individuals (*p* ≤ 0.001; Table 1). Nonetheless, concordance between results provided by the two immunoassays differed across groups, being higher for sera from Vac-N (κ : 0.58; IQR: 0.50–0.65) than for sera from Vac-Ex (κ : 0.19; IQR: −0.14 to 0.52) or Unvac-Ex (κ : 0.18; IQR: 0.06–0.30). The rate of discordant results, in most cases anti-RBD positive/anti-S-trimeric negative, was higher among sera from Unvac-Ex (34.7%) followed by Vac-N (14.6%) and Vac-Ex (2.7%) (Table 1 and Figure 1). The specificity of both assays was calculated only considering sera from Unvac-N individuals, and was found to be 98.8% for the Roche assay and 98.1% for the DiaSorin assay. Interestingly, the overall sensitivity of the DiaSorin assay may increase by 11% (88.9%) by lowering the antibody threshold for positivity from 33.8 (as recommended by the manufacturer) to 4.9 BAU/ml without a major decrease in specificity (from 98.1% to 95.1%).

3.2 | Quantitative agreement between immunoassays

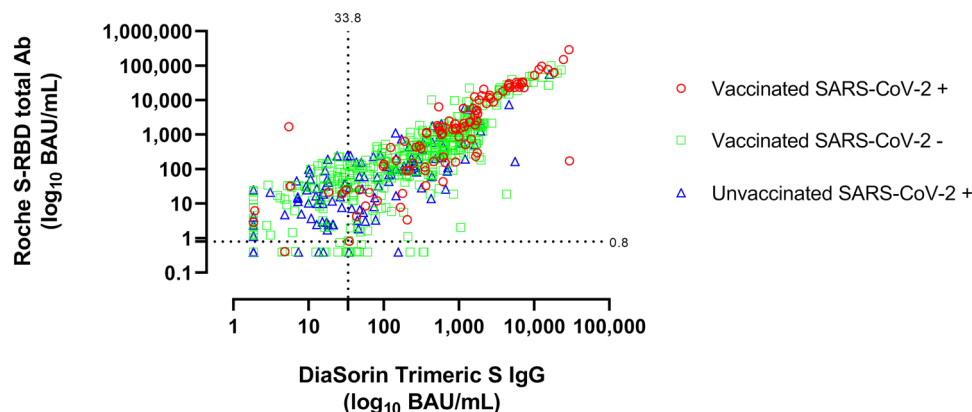
Of the 774 sera testing positive by both serological tests, 469 returned antibody levels falling between the quantitative range of both immunoassays and were included in the analysis detailed below. The remaining 305 sera yielded antibody levels that could not be fully quantified by the DiaSorin immunoassay (*n* = 262) or the Roche immunoassay (*n* = 208), and were excluded from the analyses. Overall, antibody levels measured by the two immunoassays did not differ significantly (Table 2); nevertheless, a trend toward higher BAU/ml values measured by Roche assay for sera from Vac-Ex was noticed; on the contrary, a trend toward higher BAU/ml measured by the DiaSorin assay was observed for sera from Vac-N and Unvac-Ex. The overall correlation between antibody levels quantified by both immunoassays was strong (*p* = 0.82; 95% CI: 0.78–0.84; *p* < 0.001), and remained strong for sera from Vac-Ex (*p*: 0.84; 95% CI: 0.82–0.92; *p* < 0.001) and Vac-N (*p*: 0.80; 95% CI: 0.78–0.84; *p* < 0.001), but was only moderate for sera from Unvac-Ex (*p*: 0.66; 95% CI: 0.49–0.78; *p* < 0.001), this difference

TABLE 1 Qualitative results returned by Roche and DiaSorin immunoassays according to vaccination and SARS-CoV-2 infection status of participants

Parameter	Study group			
	Vaccinated/SARS-CoV-2 experienced (n = 286)	Vaccinated/SARS-CoV-2 naïve (n = 581)	Unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced (n = 147)	Unvaccinated/SARS-CoV-2 naïve (n = 162)
Detectable anti-RBD total antibodies (%)	284 (99.3)	487 (83.8)	134 (91.2)	2 (1.2)
Detectable anti-S-trimeric IgG (%)	278 (97.2)	422 (72.6)	87 (59.2)	3 (1.9)
p Value ^a	0.62	0.058	<0.001	1.00
Kappa index (95% CI)	0.19 (-0.14 to 0.52)	0.58 (0.50–0.65)	0.18 (0.06–0.30)	-
Positive percent agreement (PPA)	97.0	83.0	63.0	-
Negative percent agreement (NPA)	11.0	50.0	18.0	97.0
Discordant results				
Anti-RBD total antibodies positive/anti-S-trimeric IgG negative (%)	7 (2.4)	75 (12.9)	49 (33.3)	2 (1.2)
Anti-RBD total antibodies negative/anti-S-trimeric IgG positive (%)	1 (0.3)	10 (1.7)	2 (1.4)	3 (1.9)

Abbreviations: RBD, receptor binding domain; S, SARS-CoV-2 spike protein.

^aFrequency comparison across groups (detectable anti-RBD total antibodies vs. detectable anti-S-trimeric IgG) was performed using Fisher's exact test or χ^2 test, as appropriate.

**FIGURE 1** Antibody levels (in BAU/ml) measured by the Roche Elecsys[®] anti-SARS-CoV-2 S and LIAISON[®] SARS-CoV-2 TrimericS IgG assays in sera from individuals displaying different vaccination and SARS-CoV-2 infection status. The threshold for positivity of both assays are shown.

reaching statistical ($p = 0.0048$). To compare quantitative results yielded by the two immunoassays across different antibody concentration ranges, we arbitrarily grouped sera into four categories based on the DiaSorin immunoassay results: <250, 250–1000, 1001–2080, and >2080 BAU/ml. As shown in Table 3, antibody levels quantified by both immunoassays were not significantly different when <1000 BAU/ml; in contrast, for sera ≥ 1000 BAU/ml, the Roche assay returned significantly higher values; this was irrespective of the vaccination and SARS-CoV-2 infection status of participants (not shown). The Bland–Altman plot depicted in Figure 2 shows the impact of antibody concentration on the level of discordance between quantitative values measured by the two immunoassays (A, all sera; B, sera

with <1000 BAU/ml; C, sera with ≥ 1000 BAU/ml, as quantitated by the DiaSorin assay).

3.3 | Correlation between antibody levels measured by the two immunoassays and NtAb

A total of 127 sera randomly chosen among those returning positive results by both the Roche and DiaSorin assays were evaluated for their ability to neutralize vesicular stomatitis virus (VSV) pseudotyped with different S genotypes (Wuhan-Hu-1/Omicron BA.1 and BA.2). These sera had been collected from fully vaccinated individuals (median age: 62 years; IQR: 44–82; 62

TABLE 2 Quantitative results returned by Roche and DiaSorin immunoassays according to vaccination and SARS-CoV-2 infection status of participants

Parameter	Vaccinated/SARS-CoV-2 experienced (n = 94)	Vaccinated/SARS-CoV-2 naïve (n = 305)	Unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced (n = 70)
Anti-RBD total antibodies levels (BAU/ml)	1868 (213.8–13 313)	429.6 (122.6–1441)	135.4 (53.7–530.2)
Anti-S-trimeric IgG (BAU/ml)	1170 (366.4–2690)	495 (180–1241)	226.5 (80.63–586.3)
p Value for comparison of medians ^a	0.09	0.55	0.09
Correlation between anti-RBD total antibodies levels and anti-S-trimeric IgG (Rho value/p value) ^b	0.88/<0.001	0.80/<0.001	0.66/<0.001

Abbreviations: RBD, receptor binding domain; S, SARS-CoV-2 spike protein.

^aMann–Whitney U test.

^bSpearman's correlation test.

TABLE 3 Quantitative results returned by the Roche and DiaSorin immunoassays according to antibody concentration

Parameter	Anti-S-trimeric IgG quantitative results			
	<250 BAU/ml (n = 153)	250–1000 BAU/ml (n = 159)	1001–2080 BAU/ml (n = 94)	>2080 BAU/ml (n = 63)
Anti-RBD total antibodies in BAU/ml. Median (IQR)	88.45 (25.09–172.7)	467.9 (206.4–1090)	1756 (719–3775)	23 476 (13 940–39 904)
Anti-S-trimeric IgG in BAU/ml. Median (IQR)	97.10 (51.25–170.5)	534 (368–686)	1405 (1208–1733)	5490 (3520–9790)
p Value for comparison of medians ^a	0.87	0.13	0.007	<0.001
Correlation between anti-RBD total antibodies levels and anti-S-trimeric IgG (Rho value/p value) ^b	0.42/<0.001	0.34/<0.001	0.18/0.07	0.78/<0.001

Abbreviations: BAU, binding antibody units; IQR, interquartile range; RBD, receptor binding domain; S, SARS-CoV-2 spike protein.

^aWilcoxon signed rank test.

^bSpearman's correlation test.

male/65 female) who were either SARS-CoV-2 naïve (n = 88) or experienced (n = 39) at the time of testing. The rate of sera displaying detectable NtAb was higher against Wuhan-Hu-1 (89%) than against Omicron BA.1 (56%) or BA.2 (70%; Table 4). Overall, NtAb titers were highest for Wuhan-Hu-1 followed for Omicron BA.1 and Omicron BA.2. Striking differences were noted across Vac-Ex and Vac-N; a higher rate of sera with detectable NtAb and higher NtAb titers against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1 was observed in Vac-Ex compared to Vac-N ($p < 0.001$ for both comparisons); on the contrary, the rate of detectable NtAb against Omicron BA.2 were higher in Vac-N as compared to Vac-Ex ($p = 0.015$) although antibody levels were comparable in both groups ($p = 0.92$) (Table 4). Overall, correlation between antibody levels measured by the Roche and DiaSorin immunoassays with NtAb titers was moderate for those against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1, but weak for those targeting BA.2 (Table 5). Strikingly, no correlation at all was observed between antibody levels measured by either immunoassay and NtAb against Omicron BA.2 (Table 5). Correlation between NtAb against all (sub)variants was always higher for sera from Vac-N compared to

those from Vac-Ex, irrespective of the immunoassay used; yet, the differences reached statistical significance for NtAb against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.2, but not for those against BA.1 (Supporting Information: Table 1). By building ROC curves, we next determined the antibody level thresholds as measured by the immunoassays that would optimally (maximum combined sensitivity and specificity) predict detection of NtAb against the different (sub)variants. As shown in Table 6, irrespective of whether sera were run on the Roche or DiaSorin platform, overall antibody cut-offs associated with NtAb detectability were lowest for Wuhan-Hu-1 and highest (and less accurate) for Omicron BA.2. Nevertheless, lower antibody levels as measured by the Roche immunoassay compared to those quantified by the DiaSorin immunoassay were associated with detection of NtAb against Wuhan-Hu-1 (1.9-fold); On the contrary, higher antibody levels as measured by the Roche immunoassay compared to those quantified by the DiaSorin immunoassay were associated with detection of NtAb against Omicron BA.1 and BA.2 (2.8-fold). A similar analysis using only sera from Vac-N yielded similar results (Table 7).

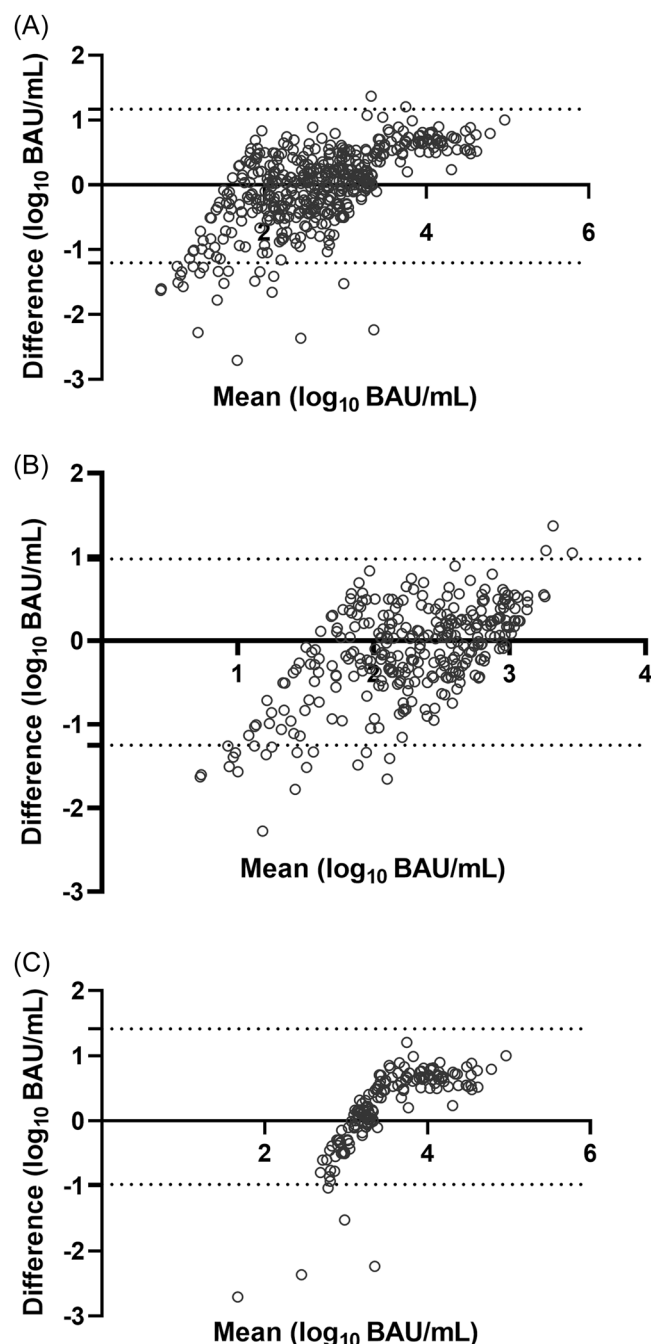


FIGURE 2 Bland-Altman plot for the Roche Elecsys® anti-SARS-CoV-2 S and LIAISON® SARS-CoV-2 Trimeric IgG assays for all sera included in the panel (A), or sera returning <1000 BAU/ml (B) or ≥1000 BAU/ml, as measured by the LIAISON® SARS-CoV-2 Trimeric IgG assay. Plots show bias in log₁₀ BAU/ml.

4 | DISCUSSION

To date, international agency (i.e., FDA or ECDC) approval of quantitative SARS-CoV-2 S-targeting immunoassays extends to use for research purposes, evaluation of vaccine immunogenicity in clinical trials, and seroprevalence studies. Beyond their use for these purposes, immunoassays may be instrumental for clinical-decision

TABLE 4 Neutralizing antibody titers against SARS-CoV-2 (sub) variants in sera testing positive by both the Roche and Diasorin immunoassays collected from vaccinated individuals

SARS-CoV-2 (sub) variant	No of sera testing positive (%) ^a /median NtAb titer (IQR)	
	SARS-CoV-2 naïve	SARS-CoV-2 experienced
Wuhan-Hu-1	74 (84)/445 (124–1724)	39 (100)/2122 (585–7578)
Omicron BA.1	39 (44)/20 (20–92)	32 (82)/276 (20–798)
Omicron BA.2	38 (76)/107 (25–566)	20 (60)/60 (25–505)

Abbreviation: NtAb, neutralizing antibodies.

^aA total of 127 were assayed for quantitation of NtAb against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1. A total of 83 sera were assayed for NtAb against Omicron BA.2.

making at the individual level in the near future. For example, the European Conference on Infections in Leukemia recommends (ungraded) that oncohematological patients who have been vaccinated before or during hematological treatment should be assessed 6 months after the end of treatment and revaccinated if they have low antibody titers, although no specific definition of low antibody titers is provided. In this regard, a threshold of around 250 BAU/ml has been suggested as discriminating between those exhibiting (above) or not (below) reasonable protection against symptomatic disease (at least disease caused by the ancestral variant), in both patients with hematological disorders²⁷ and the general population.^{6,28} Likewise, the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices currently recommends Evusheld infusion for highly vulnerable individuals, preferentially when SARS-CoV-2 seronegativity or low anti-S antibody levels (<260 BAU/ml) are documented.⁷ In this context, head-to-head analytical and clinical performance comparison of commercially available S-specific quantitative immunoassays is of key importance, even when these tests detect different antibody isotypes or incorporate different antigenic targets. Here, two widely used assays, the Roche anti-RBD total antibody and the DiaSorin S-trimeric IgG assay, were compared by parallel testing a large number of sera from individuals with different vaccination and SARS-CoV-2 infection status. We also investigated the correlation of antibody levels quantitated by the two immunoassays with NtAb titers; these were measured using a S-pseudotyped virus neutralization assay of three different S genotypes: the ancestral variant present in approved vaccines, and the Omicron BA.1 and BA.2 S belonging to subvariants either dominant or rapidly expanding, respectively, in our setting at the time of study design.

From a qualitative standpoint, both assays correlated reasonably well (κ index: 0.68); nevertheless, the Roche assay returned a higher number of positive results than the DiaSorin assay, thus exhibiting a higher overall sensitivity for detection of previous virus exposure, vaccination or both. Interestingly, PPA was higher for sera from Vac-Ex (0.97) or Vac-N (0.83) than for sera from Unvac-Ex (0.63). Differences in the array of epitopes within the S protein eliciting

TABLE 5 Correlation between quantitative values returned by the Roche and the DiaSorin (electro)chemiluminescent immunoassays and neutralizing antibody titers against several SARS-CoV-2 (sub)variants in vaccinated individuals according to their SARS-CoV-2 infection status

SARS-CoV-2 (sub) variant ^a	Rho value [95% CI] (p value) for the correlation between the Roche/DiaSorin immunoassays and NtAb titers		
	All participants	SARS-CoV-2 -naïve	SARS-CoV-2-experienced
Wuhan-Hu-1	0.69 [0.58–0.77] (<0.001)/0.71 [0.61–0.79] (<0.001)	0.71 [0.60–0.81] (<0.001)/0.75 [0.64–0.83] (<0.001)	0.40 [0.09–0.64] (<0.001)/0.37 [0.06–0.62] (<0.001)
Omicron BA.1	0.64 [0.52–0.73] (<0.001)/0.67 [0.55–0.75] (<0.001)	0.61 [0.46–0.73] (<0.001)/0.60 [0.45–0.73] (<0.001)	0.52 [0.24–0.72] (<0.001)/0.59 [0.33–0.77] (<0.001)
Omicron BA.2	0.30 [0.08–0.49] (<0.001)/0.24 [0.02–0.44] (<0.001)	0.52 [0.27–0.70] (<0.001)/0.49 [0.02–0.68] (<0.001)	–0.05 [–0.34 to 0.31] (0.78)/–0.15 [–0.48 to 0.21] (0.4)

Abbreviation: NtAb, neutralizing antibodies.

^aA total of 127 were assayed for quantitation of NtAb against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1. A total of 83 sera were assayed for NtAb against Omicron BA.2.

TABLE 6 Antibody level thresholds as measured by the Roche and DiaSorin immunoassays predicting detectability of spike-binding neutralizing antibodies according to SARS-CoV-2 (sub)variant

Immunoassay	SARS-CoV-2 (sub)variant ^a	Antibody threshold (BAU/ml)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC (p value)
Roche	Wuhan-Hu-1	>300	92.04	92.86	0.96 (<0.001)
	Omicron BA.1	>5257	88.73	92.86	0.95 (<0.001)
	Omicron BA.2	>8816	74.32	77.78	0.74 (0.016)
DiaSorin	Wuhan-Hu-1	>586	83.19	92.86	0.96 (<0.001)
	Omicron BA.1	>1810	81.69	92.86	0.94 (<0.001)
	Omicron BA.2	>3055	63.51	77.78	0.71 (0.039)

Abbreviations: AUC, area under the receiver operating characteristic curve; BAU, binding antibody units.

^aA total of 127 were assayed for quantitation of neutralizing antibodies against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1. A total of 83 sera were assayed for neutralizing antibodies against Omicron BA.2.

TABLE 7 Antibody level thresholds as measured by the Roche and DiaSorin immunoassays predicting detectability of spike-binding neutralizing antibodies in vaccinated, SARS-CoV-2 naïve participants according to SARS-CoV-2 (sub)variant

Immunoassay	SARS-CoV-2 (sub)variant ^a	Antibody threshold (BAU/ml)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC (p value)
Roche	Wuhan-Hu-1	>300	90.54	92.86	0.96 (<0.001)
	Omicron BA.1	>4123	92.31	91.84	0.95 (<0.001)
	Omicron BA.2	>8851	69.05	87.50	0.77 (0.012)
DiaSorin	Wuhan-Hu-1	>586	77.03	92.86	0.95 (<0.001)
	Omicron BA.1	>1505	79.49	91.84	0.94 (<0.001)
	Omicron BA.2	>3055	61.90	87.50	0.72 (0.05)

Abbreviations: AUC, area under the receiver operating characteristic curve; BAU, binding antibody units.

^aA total of 88 were assayed for quantitation of neutralizing antibodies against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.1. A total of 50 sera were assayed for neutralizing antibodies against Omicron BA.2.

stronger antibody responses following vaccination or natural infection may account for our observation.^{29,30} Moreover, the fact that Unvac-Ex and Vac-Ex differed critically in the timeframe of virus exposure in subjects (median of 29 days for Unvac-Ex vs. 172.5 days for VacEx) may also have impacted on the results, due to the potentially varying kinetics of antibody decay over time across different antibody specificities. Notably, qualitative agreement

between immunoassays was highest in sera from Vac-N (κ index: 0.58). By only considering sera from Unvac-N individuals, we found the specificity of both assays to be comparable (98.8% for the Roche assay and 98.1% for the DiaSorin assay). Importantly, the difference in the overall sensitivity between the two immunoassays may be substantially narrowed by lowering the DiaSorin assay cut-off for positive results from 33.8 to 4.9 BAU/ml, without significantly

decreasing its specificity, as in around 80% of sera testing Roche positive/DiaSorin negative, values in the latter fell within 4.9–33.8 BAU/ml. It is important to note that while the overall sensitivity of both assays calculated herein was substantially lower than that indicated by the respective manufacturer (98.8% and 98.7% for the Roche assay and the DiaSorin assay, respectively), the specificity was only slightly decreased (99.8% and 99.5% for the Roche assay and the DiaSorin assay, respectively, according to the respective manufacturer). To gauge the relevance of this apparent discrepancy it needs to be taken into account that both assays were originally evaluated by the manufacturers using sera drawn from unvaccinated individuals and shortly after SARS-CoV-2 infection due to the Wuhan-Hu-1 ancestral variant.

From a quantitative perspective, no significant differences were observed in antibody levels measured by the two immunoassays for sera belonging to any of the study groups. Nevertheless, these correlated to a lesser extent for sera from Unvac-Ex ($p = 0.66$) than those from Vac-Ex ($p = 0.88$) and Vac-N ($p = 0.80$), likely due to differences in the antigenic specificity of antibodies generated following vaccination or natural infection. In agreement with our findings, previous studies reported correlation levels between the Roche and DiaSorin immunoassays ranging from 0.80 to 0.93 in panels mostly comprising sera from vaccinated/naïve individuals.^{13–18} The sizable difference between correlation levels across Vac-Ex and Unvac-Ex observed in our study are also congruent with findings by Lukaszuk et al.¹⁷ A relatively novel observation of this study relates to the impact of antibody concentration on the magnitude of quantitative discordances across the two immunoassays; in effect, for sera with <1000 BAU/ml, the DiaSorin assay returned higher values than the Roche assay, whereas the reverse was documented for sera ≥ 1000 BAU/ml. Although not explicitly stated, the occurrence of such differences in quantitative estimations of antibody levels provided by the Roche and DiaSorin immunoassays can be inferred from data from previous studies.^{13,16–18}

We next evaluated the correlation between antibody levels returned by the Roche and DiaSorin immunoassays and NtAb titers against Wuhan-Hu-1, Omicron BA.1, and BA.2 measured using an S-pseudotyped virus neutralization assay. To this end, we randomly selected 127 sera collected from Vac-Ex and Vac-N. Given the timing of sera collection, both the rate of sera exhibiting neutralizing activity (any titer) and NtAb titers were higher against the ancestral variant than against Omicron BA.1 and BA.2. Several major observations were made regarding the degree of correlation between antibody levels measured by both immunoassays and NtAb titers. First, the correlation level was substantially lower for sera in the Vac-Ex group compared to those in the Vac-N, irrespective of the SARS-CoV-2 variant considered; this difference was strikingly evident for NtAb against Omicron BA.2 ($p: 0.52$ in Vac-N vs. $p: -0.05$ in Vac-Ex). Second, antibody level cut-offs predicting NtAb detection (at any level) varied widely depending upon the SARS-CoV-2 (sub)variant considered and the immunoassay employed. This was also the case when sera from Vac-N individuals were analyzed separately. Of note, we chose a binary outcome for categorization of NtAb results

(detectable vs. undetectable), as no NtAb threshold has clearly been defined for protection against SARS-CoV-2 infection (due to any variant). In effect, Wuhan-Hu-1 NtAb detectability was associated with lower antibody levels as measured by both binding immunoassays than was the case for Omicron (sub)variants; this was not unexpected as both immunoassays contain the S or RBD protein as target antigens derived from the ancestral variant, and the Wuhan-Hu-1 variant substantially diverges antigenically from Omicron sublineages.³¹ Third, RBD and S-trimeric binding antibody levels predicting NtAb against Omicron BA.2 were substantially higher than those against Omicron BA.1 irrespective of the immunoassay used, likely reflecting the higher degree of variation of sequence within critical antibody binding sites in BA.2 S protein³¹; moreover, prediction of Omicron BA.2 NtAb detectability was somewhat inaccurate (AUC: 0.71). Fourth, antibody level thresholds predicting detection of NtAb against all SARS-CoV-2 variants screened were substantially dissimilar for the Roche and DiaSorin assay. The current study has several limitations. First, as stated above, sera yielding contradictory qualitative results across immunoassays were not further analyzed to account for discrepancies, impeding an optimal specificity analysis. Second, no sera from Unvac-Ex individuals were run on the NtAb assay. Our study has also some strengths: the large number of sera tested, the heterogeneity of participants in terms of vaccination and SARS-CoV-2 infection status, and the use of S-pseudotyped virus neutralization assays instead of a surrogate NtAb method.

In summary, our data revealed that neither qualitative nor quantitative results returned by the Roche and DiaSorin immunoassays (the latter despite calibration to the first WHO SARS-CoV-2 antibody standard) are necessarily interchangeable. In both assays, moreover, analytical performance was found to be greatly influenced by individuals' vaccination, and SARS-CoV-2 infection status. Importantly, an impact of antibody concentration on the magnitude of quantitative discordances across the two immunoassays was noticed. Our data also highlight the need for continuous evaluation of S-based immunoassays for their performance in epidemiological settings dominated by emerging (sub)variants, particularly the correlation between BAUs provided and NtAb titers. Widespread future use of indicators such as absence of S-directed antibodies or a given antibody level threshold to determine eligibility for an additional vaccine dose (either Wuhan-Hu-1-based or adapted) or S-targeted monoclonal antibody therapies, may increase the clinical impact of between-assay differences in sensitivity and quantitative performance. In this context, our data may contribute toward optimal immunoassay selection.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

David Navarro and Ron Geller conceived and designed the analysis. Jorge Camacho, Joao Zulaica, Beatriz Álvarez-Rodríguez, Luciana Rusu, and María Jesús Alcaraz performed the experiments. Jorge Camacho and Estela Giménez collected the data. Jorge Camacho, Eliseo Albert, and Beatriz Olea performed the analysis. David Navarro and Jorge Camacho wrote the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) and Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). Beatriz Álvarez-Rodríguez holds the GVA postdoctoral fellowship (APOSTD/2021/017). This study work was supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (FIS, PI21/00563) to David Navarro, and by the European Commission NextGenerationEU fund (EU 2020/2094), through CSIC's Global Health Platform (PTI Salud Global) to Ron Geller. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Jorge Camacho  <http://orcid.org/0000-0002-6602-0966>

David Navarro  <https://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

REFERENCES

- Liu H, Wilson IA. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunol Rev*. 2022;310(1):76-92. doi:10.1111/imr.1308
- Kent SJ, Khoury DS, Reynaldi A, et al. Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19: leading actors or supporting cast? *Nat Rev Immunol*. 2022;22:387-397.
- Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med*. 2022;291:32-50.
- Cromer D, Steain M, Reynaldi A, et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2022;3:e52-e61.
- Khouri DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Med*. 2021;27:1205-1211.
- Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science*. 2022;375:43-50.
- Recomendaciones de utilización de Evusheld para la prevención de Covid-19. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/covid19/docs/Recomendaciones_uso_Evusheld.pdf
- Cesaro S, Ljungman P, Mikulska M, et al. Recommendations for the management of COVID-19 in patients with haematological malignancies or haematopoietic cell transplantation, from the 2021 European Conference on infections in leukaemia (ECIL 9). *Leukemia*. 2022;36:1467-1480.
- Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: what do we know and should we be testing for it? *J Clin Microbiol*. 2022;60(60):e0048221.
- Higgins V, Fabros A, Kulasingam V. Quantitative measurement of anti-SARS-CoV-2 antibodies: analytical and clinical evaluation. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e03149.
- Theel ES, Johnson PW, Kunze KL, et al. SARS-CoV-2 serologic assays dependent on dual-antigen binding demonstrate diverging kinetics relative to other antibody detection methods. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e0123121.
- Saker K, Escuret V, Pitiot V, et al. Evaluation of commercial anti-SARS-CoV-2 antibody assays and comparison of standardized titers in vaccinated healthcare workers. *J Clin Microbiol*. 2021;60:e017462.
- Swadźba J, Anyszek T, Panek A, Chojeła A, Wyrzykowska K, Martin E. Head-to-head comparison of 5 anti-SARS-CoV-2 assays performance in one hundred COVID-19 vaccinees, over an 8-month course. *Diagnostics*. 2022;12:1426.
- Danese E, Montagnana M, Salvagno G, et al. Comparison of five commercial anti-SARS-CoV-2 total antibodies and IgG immunoassays after vaccination with BNT162b2 mRNA. *J Med Biochem*. 2021;40:335-340.
- Salvagno GL, Lippi G. Correlation between anti-SARS-CoV-2 total antibodies and spike trimeric IgG after BNT162b2 booster immunization. *Vaccines*. 2022;10:890.
- Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Koller T, et al. Anti-spike protein assays to determine SARS-CoV-2 antibody levels: a head-to-head comparison of five quantitative assays. *Microbiol Spectrum*. 2021;9:e0024721.
- Lukaszuk K, Kiewisz J, Rozanska K, et al. Usefulness of IVD kits for the assessment of SARS-CoV-2 antibodies to evaluate the humoral response to vaccination. *Vaccines*. 2021;9:840.
- Carta M, Marinello I, Cappelletti A, et al. Comparison of anti-SARS-CoV-2 S1 receptor-binding domain antibody immunoassays in health care workers before and after the BNT162b2 mRNA vaccine. *Am J Clin Path*. 2022;157:212-218.
- Mattiuzzo G, Bentley EM, Hassall M, et al. Openshaw PJMKBB. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. World Health Organization; 2020: 1-60.
- Valdivia A, Torres I, Latorre V, et al. Inference of SARS-CoV-2 spike-binding neutralizing antibody titers in sera from hospitalized COVID-19 patients by using commercial enzyme and chemiluminescent immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40:485-494.
- Tang MS, Case JB, Franks CE, et al. Association between SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and commercial serological assays. *Clin Chem*. 2020;66:1538-1547.
- Jung K, Shin S, Nam M, et al. Performance evaluation of three automated quantitative immunoassays and their correlation with a surrogate virus neutralization test in coronavirus disease 19 patients and pre-pandemic controls. *J Clin Lab Anal*. 2021;35:e23921.
- Sánchez-Sendra B, Albert E, Zulaica J, et al. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern elicited by the comirnaty COVID-19 vaccine in nursing home residents. *Sci Rep*. 2022;12:3788.
- Giménez E, Albert E, Zulaica J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 adaptive immunity in nursing home residents following a third dose of the comirnaty coronavirus disease 2019 vaccine. *Clin Infect Dis*. 2022;75:e865-e868.
- Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesth Analg*. 2018;126:1763-1768.
- Myers L, Sirois MJ. Spearman correlation coefficients, differences between. In: Kotz S, Read CB, Balakrishnan N, Vidakovic B, Johnson NL, eds. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. John Wiley & Sons, Inc; 2006.
- Piñana JL, López-Corral L, Martino R, et al. SARS-CoV-2 vaccine response and rate of breakthrough infection in patients with hematological disorders. *J Hematol Oncol*. 2022;15:54.

28. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Med.* 2021;27:2032-2040.
29. Greaney AJ, Loes AN, Gentles LE, et al. Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do those from SARS-CoV-2 infection. *Sci Transl Med.* 2021;13:eabi9915.
30. Garrett ME, Galloway JG, Wolf C, et al. Comprehensive characterization of the antibody responses to SARS-CoV-2 spike protein finds additional vaccine-induced epitopes beyond those for mild infection. *eLife.* 2022;11:e73490.
31. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022;32:e238. doi:10.1002/rmv.2381

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Camacho J, Albert E, Zulaica J, et al. A performance comparison of two (electro) chemiluminescence immunoassays for detection and quantitation of serum anti-spike antibodies according to SARS-CoV-2 vaccination and infections status. *J Med Virol.* 2022;e28397. doi:10.1002/jmv.28397

from different departments of the hospital. The data revealed that male patients get more infected than females. The present study revealed the year 2018 has a high rate of infection but a decline in 2019. Although, in 2020 it increased slightly in the covid-19 pandemic but did not reach up to 2018. The present study supports the previous studies regarding the decline of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children in China. We report the age group 0–1 year shows the highest changes as a decline in infection, but the age group 5–10 does not have many changes. During the COVID-19 pandemic, >10 age children group has lower infection during the COVID-19 and after the pandemic. This lower rate may be mainly related to increased awareness of wearing masks and paying attention to hand hygiene during the COVID-19 pandemic. All details are shown in Fig. 1. AST results suggested that *K. pneumoniae* increased the development of resistance against Ceftazidime, cefoperazone/sulbactam, Ceftolozane, and cefepime but the resistance trend declined in the case of Amoxicillin+clavulanic acid, Ceftriaxone, and Cefoxitin. The increased resistance against the cephalosporin group may result from the overuse of antibiotics during the pandemic. To support this, a recent study has reported *K. pneumoniae* shows high resistance to cephalosporin antibiotics because the high capacity for clonal expansion and exchange of mobile genetic elements carries resistance determinants.⁷ ESBLs producing isolates analysis showed a decline in the COVID-19 pandemic but again increased in 2021. AST data are shown in Fig. 2 and it indicates *K. pneumoniae* MDR phenotype which is worrisome in the management of clinical conditions. *K. pneumoniae* infection declined in paediatric patients compared to the year 2018 but constant surveillance is needed not for this but also for various pathogens. We all face the COVID-19 pandemic and found it an enemy to humans. The scientific community must come together to help each other, jointly address risks and challenges and jointly safeguard the world. In conclusion, *K. pneumoniae* infection in children of all ages has declined during and after the COVID-19 pandemic but resistance development has increased. Close monitoring of epidemiological trends helps to prevent *K. pneumoniae* infection in children.

Funding

This work was funded by the Shenzhen Fund for Guangdong Provincial High-Level Clinical Key Specialties (No. SZGSP012); Shenzhen Key Medical Discipline Construction Fund (No. SZXK034).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Huttner B.D., Catho G., Pano-Pardo J.R., Pulcini C., Schouten J., COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(7):808–10. doi:10.1016/j.cmi.2020.04.024.
- Li Y., Guo Y., Duan Y., Changes in *Streptococcus pneumoniae* infection in children before and after the COVID-19 pandemic in Zhengzhou, China. *J Infect* 2022;85(3):e80–1. doi:10.1016/j.jinf.2022.05.040.
- Zhou J., Zhao P., Nie M., Gao K., Yang J., Sun J., Changes of *Haemophilus influenzae* infection in children before and after the COVID-19 pandemic, Henan, China [published online ahead of print, 2022 Oct 20]. *J Infect* 2022;4453(22):00615–16 S0163-. doi:10.1016/j.jinf.2022.10.019.
- Ying L., Pin Z., Bang D., Xianwei Z., Guangjun H., Wancun Z., changes of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children before and after the COVID-19 pandemic, Henan, China, Published: December 15, 2022. doi:10.1016/j.jinf.2022.12.015.
- Lemenand O., Coeffic T., Thibaut S., et al. Decreasing proportion of extended-spectrum beta-lactamase among *E. coli* infections during the COVID-19 pandemic in France. *J Infect* 2021;83(6):664–70. doi:10.1016/j.jinf.2021.09.016.
- Ashurst J.V., Dawson A., *Klebsiella Pneumonia*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

- Oliveira R., Castro J., Silva S., Oliveira H., Saavedra M.J., Azevedo N.F., et al. Exploring the antibiotic resistance profile of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Portugal. *Antibiotics* 2022;11:1613. doi:10.3390/antibiotics11111613.

Sandip Patil

Department of Haematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China
Paediatric Research Institute, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

Hongyu Chen

Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

Shaowei Dong

Paediatric Research Institute, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

Sixi Liu

Department of Haematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

Feiqiu Wen*

Department of Haematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China
Paediatric Research Institute, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China

*Corresponding author at: Department of Haematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China.

E-mail address: fwen62@163.com (F. Wen)

Accepted 4 January 2023
Available online 14 January 2023

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.01.003>

© 2023 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Neutralizing antibodies against Omicron BA.4/5 after COVID-19 vaccination in SARS-CoV-2 experienced versus naïve individuals in the general population



Dear Editor,

We read with interest the study published by Dimeglio *et al.* in the *Journal of Infection* showing that SARS-CoV-2 Omicron BA.1

Members of the Valencian vaccine research program (ProVaVac) study group:

Vanaclocha Luna H (General Directorate of Public Health, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain); Burks DJ (The Prince Felipe Research Center-CIPF, Valencia, Spain); Cervantes A (INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain); Comas I (Biomedicine Institute of Valencia, Spanish Research Council (CSIC); Díez-Domingo J (Foundation for the promotion of health and biomedical research of the Valencian Community-FISABIO-, Valencia, Spain); Peiro S (Foundation for the promotion of health and biomedical research of the Valencian Community-FISABIO-, Valencia, Spain); González-Candelas F (CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain; Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia, Valencia, Spain; Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University of Valencia, Valencia, Spain); Ferrer Albiach C (Fundación Hospital Provincial de Castelló); Redón J (INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain); Sánchez-Payá J (Preventive Medicine Service, Alicante General and University Hospital, Alicante, Spain; Alicante Institute of Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, 41,423.Spain; Sanz G (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe); Semper JM (Biotechnology Department, University of Alicante, Spain); Zapater Latorre E (Fundación Hospital General Universitario de València); Navarro D (Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain; Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain).

breakthrough infection following receipt of two or three COVID-19 vaccine doses elicits a stronger homotypic (BA.1) neutralizing antibody (NtAb) response than vaccination alone in the general population.¹ In this study most recruited individuals were young (median age, 39 years) and NtAb measurements (using a live SARS-CoV-2 Omicron BA.1 isolate) were performed soon after receipt of the last vaccine dose (between 3 and 6 weeks). Omicron BA.1 has been long displaced worldwide by several Omicron sublineages, including Omicron BA.4/5 which display an increased ability to evade NtAb responses elicited by Wuhan-Hu-1 vaccine platforms compared to BA.1.^{2–4} Here, we extend the observations of Dimeglio et al.¹ to show that long after full or booster vaccination (median, 287 days; IQR, 260–332), SARS-CoV-2 experienced individuals exhibit more robust NtAb responses against Omicron BA.4/5 than their vaccinated SARS-CoV-2 naïve counterparts, regardless of whether infection was due to Wuhan-Hu-1, Omicron BA.1 or Omicron BA.2 variants.

Sera from a total of 130 individuals (62 males/68 females; median age, 56 years; IQR, 34–72) were analyzed as described below. Individuals were randomly selected from a total of 787 participants in a SARS-CoV-2 seroprevalence cross-sectional, region-wide, population-based study that was conducted in the primary care zones of the Valencian Community (VC) in (Spain) during October of 2022 (unpublished results), as described in an analogous study conducted in April 2022.⁵ The requirement for informed consent was waived by the Research Ethics Committee of Public Health (ref. 20,220,408/02) since the project was developed under the epidemiological surveillance competencies of the VC Ministry of Health (Law 10/2014 of the Valencian Community on Public Health).

Out of the 130 participants, 91 were categorized as SARS-CoV-2 experienced (VAC-ex) upon detection of anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein IgG antibodies (Elecys® Anti-SARS-CoV-2 N assays; Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Twenty-two out of the 91 had a record of a positive RT-PCR assay in nasopharyngeal specimens [VC microbiology registry (RedMiVa)]. The remaining 39 participants were deemed as SARS-CoV-2 naïve (VAC-n), as they lacked anti-N IgGs and had no record of prior infection. As shown in Table 1, VAC-ex and VAC-n participants were matched by sex, vaccine platform employed, receipt of a booster dose, type of booster (homologous vs. heterologous), and the time elapsed since the last vaccine dose. Nevertheless, participants in the VAC-n group were significantly younger ($P < 0.007$). NtAbs were measured using a GFP-expressing vesicular stomatitis virus pseudotyped with the Wuhan-Hu-1 or Omicron BA.4/5 spike (S) protein, as previously described.^{5,6} The BA.4/5 spike was cloned into a pCG1 vector using a codon-optimized Omicron BA.4/5 S expression plasmid obtained from Addgene (Catalog number 186,031) as the template. Both constructs used lacked the terminal 19 amino acid residues to improve pseudotyping efficiency. Neutralization assays were performed as previously described,⁶ except VeroE6/TMPRSS2 cells (JCRB Cell bank catalog code: JCRB1819) were used. Sera testing negative (undetectable) were arbitrarily ascribed a titer of 1/20. Most VAC-ex (100%) and VAC-n (94.7%) participants exhibited detectable NtAb responses against the Wuhan-Hu-1 variant ($P = 0.30$). In contrast, the percentage of VAC-n individuals displaying detectable NtAb against Omicron BA.4/5 was significantly lower than that for VAC-ex (52.6% vs. 98.9%; $P < 0.001$). Overall, as shown in Fig. 1A, NtAb titers against Omicron BA.4/5 were significantly lower than that against Wuhan-Hu-1 in both VAC-ex (median inverse reciprocal titer for BA.4/5 and Wuhan-Hu-1, respectively of 1462; IQR, 536–4803 vs. 11,398; IQR, 4652–62,500; $P < 0.001$) and VAC-n (median, 24 IQR, 10–204, vs. 1504; IQR, 565–6883; $P < 0.001$). Nevertheless, compared to VAC-n, VAC-ex exhibited significantly higher NtAb titers against both Wuhan-Hu-1 (7-fold; $P < 0.001$) and Omicron BA.4/5 (61-fold; $P < 0.001$), irrespective of whether partic-

Table 1
Participant characteristics.

Parameter	Vaccinated/ SARS-CoV-2 experienced (n = 91)	Vaccinated/ SARS-CoV-2 naïve (n = 39)	P value ^a
Sex: no. male/female (%)	42/49 (46/54)	20/19 (51/49)	0.99
Age (median years, IQR)	70 (31–67)	51 (48–82)	0.007
0–9	3 (3.3%)	2 (5.1%)	
10–19	8 (8.8%)	1 (2.6%)	
20–34	19 (20.9%)	2 (5.1%)	
35–49	14 (15.4%)	7 (18%)	
50–64	21 (23%)	5 (12.8%)	
65–79	20 (22%)	9 (23%)	
≥80	6 (6.6%)	13 (33.3%)	
Vaccine platform: no. (%)			0.91
mRNA Comirnaty® (BioNTech /Pfizer)	54 (59)	29 (74)	
mRNA Spikevax® (Moderna / Lonza)	16 (17.6%)	5 (12.8)	
Viral Vector Vaxzevria® (Oxford / AstraZeneca)	15 (16.5)	2 (5)	
Viral Vector Jcovden® (JandJ / Janssen)	5 (5)	3 (7.7)	
Inactivated CoronaVac® (Sinovac Biotech)	1 (1)	0	
Number of vaccine doses: no. (%)			0.99
One	2 (2.20)	1 (2.6)	
Two	25 (27.5)	10 (25.6)	
Three	62 (68)	28 (71.8)	
Four	2 (2.2)	0	
Receipt of a booster vaccine dose (Yes, %/No, %)	68 (75) /23 (25)	30 (77) /9 (23)	0.99
Type of booster: no. (%)			0.96
Homologous	28 (41)	15 (50)	
Heterologous	40 (59)	14 (50)	
Days elapsed since last vaccine dose (median, IQR)	283 (260–322)	307 (267–336)	0.09

^a Fisher's exact test or Mann-Whitney U test, as appropriate. Two-sided exact P-values are reported. A P-value <0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and STATA 17.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA).

ipants receiving a regular vaccine schedule or boosted with an additional vaccine dose were analyzed separately (not shown).

Out of the 22 VAC-ex individuals with a record of a positive SARS-CoV-2 RT-PCR assay, in 13 infection was documented during 2022 within waves dominated (≥95% of cases) by BA.1 ($n = 6$) and BA.2 ($n = 7$), and before the emergence of BA.4/5 in the VC; the remaining 9 individuals had contracted SARS-CoV-2 infection during 2020/2021, prior to the surge of the Omicron variant in the VC. Following the matching of individuals in both comparison groups according to the time elapsed from the receipt of the last vaccine dose, NtAb titers against Omicron BA.4/5, but not against Wuhan-Hu-1 (Fig. 1B), were significantly lower ($P < 0.001$) in individuals that contracted SARS-CoV-2 infection prior to 2022. Importantly, VAC-n individuals displayed lower NtAb titers against both Wuhan-Hu-1 ($P < 0.01$) and Omicron BA.4/5 ($P < 0.001$) than VAC-ex, irrespective of when SARS-CoV-2 infection was documented. The current study has several limitations. First, the date of SARS-CoV-2 infection could only be documented in a small percentage of VAC-ex participants. Second, the SARS-CoV-2 lineages could not be confirmed by sequencing in cases with positive RT-PCR results. Third, whether participants that experienced COVID-19 due to Wuhan-Hu-1 were reinfectd by Omicron BA.1 or BA.2 could not be ascertained. Fourth, due to the possibility of N-seroreversion some participants could have been miscategorized as being SARS-CoV-2 naïve. In summary, the main observation of our study was that long (median 287 days) after COVID-19 vaccination with full or booster regimens, VAC-ex individuals display a more robust NtAb response against Omicron BA.4/5 compared to VAC-n. Interestingly,

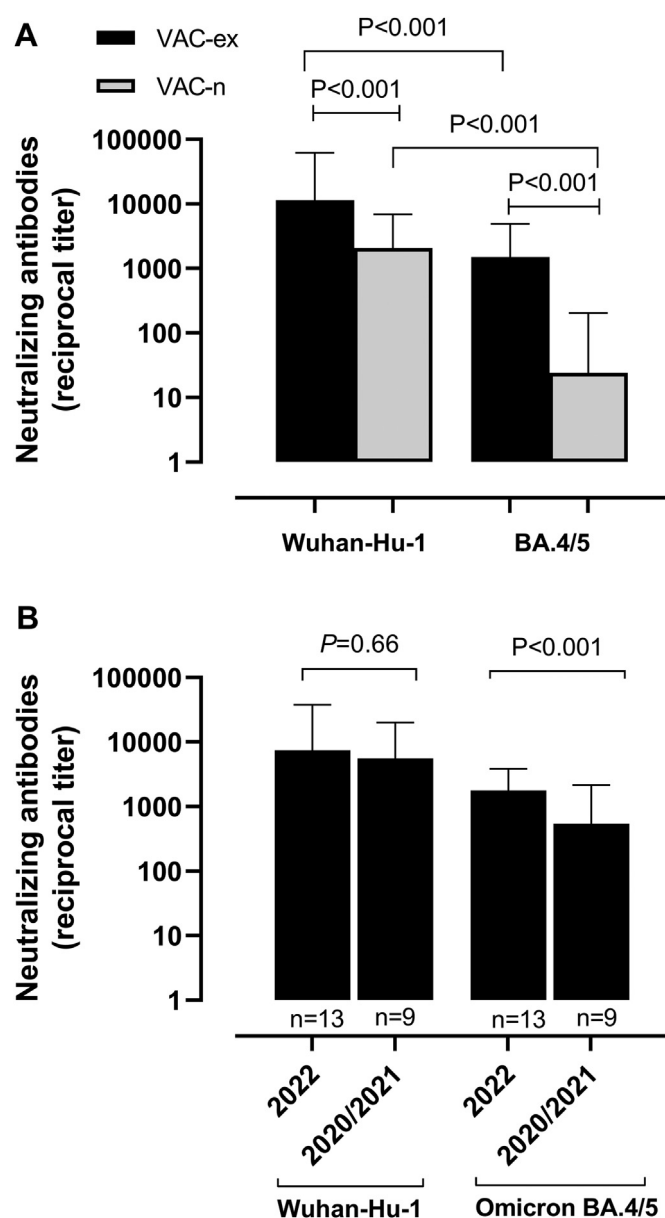


Fig. 1. Neutralizing antibody (NTAb) responses against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.4/5 as measured using a pseudotyped vesicular stomatitis virus system. (A) Reciprocal NtAb titers against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.4/5 in vaccinated/SARS-CoV-2 experienced (VAC-ex) and vaccinated/SARS-CoV-2 naïve participants (VAC-n). (B) Reciprocal NtAb titers against Wuhan-Hu-1 and Omicron BA.4/5 in vaccinated/SARS-CoV-2 experienced (VAC-ex) participants with SARS-CoV-2 infection documented by RT-PCR. *P* values for comparisons across groups (Mann-Whitney U test) are shown. A *P* value <0.05 was deemed as significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and STATA 17.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA).

although the difference across groups was more marked when participants contracting Omicron BA.1 or BA.2 infection were considered separately, it was also maintained for those that were infected with the ancestral SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 variant or pre-Omicron variants of concern. Our observation agrees with data reported in several series comprising individuals vaccinated (either boosted or not) with mRNA or inactivated SARS-CoV-2-based COVID-19 vaccine platforms^{2-4,7,8} and may help inform public health decision-making regarding COVID-19 vaccination policies for the near future.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

JC, JZ, EG, LR, S V-A and EA, methodology and data validation. HV and RL participated in the implementation of the vaccine roll-out program in the Valencian Community. SP, RG and DN, conceptualization and data analysis. RG and DN wrote the manuscript.

Funding

This work was supported in part by the European Commission NextGenerationEU fund, awarded to RG through CSIC's Global Health Platform (PTI Salud Global).

Data availability statement

The data presented in the manuscript have not been made available, but can be shared upon request.

Acknowledgments

We are grateful to the staff and nurses of primary care centers participating in this study. We also thank Ana Berenguer, General Director of Analysis and Public Policies of the Presidency of the Generalitat. Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) and Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). Sebastian Velandia-Álvarez holds a Generalitat Valenciana Grisolia Ph.D. fellowship (CIGRIS/2021/080).

References

- Dimeglio C, Miguera M, Chapuy-Regaud S, Da-Silva I, Jougla I, Pradere C, et al. Comparative effects of mRNA vaccine booster and natural Omicron infection on the neutralizing antibody response. *J Infect* 2022;**85**(1):e4–6.
- Cao Y, Yisimayi A, Jian F, Song W, Xiao T, Wang L, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature* 2022;**608**(7923):593–602.
- Hachmann N.P., Miller J., Collier A.Y., Ventura J.D., Yu J., Rowe M., et al. Neutralization escape by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *N Engl J Med* 2022;**387**(1):86–8.
- Tuekprakhon A., Nutalai R., Djokaite-Guraliuc A., Zhou D., Ginn H.M., Selvaraj M., et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell* 2022;**185**(14):2422–33 e13.
- Camacho J., Giménez E., Albert E., Zulaica J., Álvarez-Rodríguez B., Torres I., et al. Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the valencian community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant. *J Med Virol* 2022:e28284.
- Giménez E., Albert E., Zulaica J., Torres I., Rusu L., Moreno A.R., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 adaptive immunity in nursing home residents following a third dose of the comirnaty coronavirus disease 2019 vaccine. *Clin Infect Dis* 2022;**75**(1):e865–8.
- Wang Q., Guo Y., Iketani S., Nair M.S., Li Z., Mohri H., et al. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature* 2022;**608**(7923):603–8.
- Arora P., Kempf A., Nehlmeier I., Schulz S.R., Cossmann A., Stankov M.V., et al. Augmented neutralisation resistance of emerging omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *Lancet Infect Dis* 2022;**22**(8):1117–18.

Jorge Camacho
on behalf of the Microbiology Service, Clinic University Hospital,
INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

Joao Zulaica
Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de
Valencia-CSIC, 46980 Valencia, Spain

Estela Giménez

Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain
 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Luciana Rusu, Sebastian Velandia-Álvarez
 Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de Valencia-CSIC, 46980 Valencia, Spain

Eliseo Albert
 Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

Salvador Peiró
 Foundation for the promotion of health and biomedical research of the Valencian Community (FISABIO), Valencia, Spain

Hermelinda Vanaclocha
 General Directorate of Public Health, Department of Health, Valencia Government, Valencia, Spain

Ramón Limón
 General Directorate of Healthcare, Department of Health, Valencian Government, Valencia, Spain

Ron Geller¹
 Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de Valencia-CSIC, 46980 Valencia, Spain

David Navarro^{*1}
 Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain
 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
 Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

*Corresponding author at: Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.
 E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro)

¹ Senior authors that contributed equally to the current work.
 Accepted 29 December 2022
 Available online 14 January 2023

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.12.029>

© 2023 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Remdesivir and survival outcomes in critically ill patients with COVID-19: A multicentre observational cohort study



Dear Editor,

The role of remdesivir (RDV) in the treatment of critically ill COVID-19 patients remains ill-defined.¹ The impact of the systemic inflammation and other aspects adding to the potential severity of patients in the SARS-CoV-2 viral dynamics are not well elucidated, particularly in critically ill patients.^{2–4} Thus, we aimed to evaluate the effect of RDV on the outcomes of critically ill patients with severe COVID-19 and analyze such outcomes in certain subsets of patients to investigate whether RDV proved particularly beneficial in a particular group of critically ill patients.

Multicentre, observational cohort study including consecutive COVID-19 patients admitted to 55 Spanish ICUs between 5

February 2020 and 21 December 2021. We compared two main groups: patients receiving RDV versus those who did not receive RDV at any moment. The primary outcome was all-cause 90-day mortality. We examined outcomes according to the following categories: (1) overall population; (2) several patient subgroups based on baseline data at ICU admission: age, illness severity and organ damage (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation [APACHE] -II and Sequential Organ Failure Assessment [SOFA] score, respectively), laboratory findings (lymphocyte count and C-reactive protein [C-RP]), respiratory support; (3) by corticosteroids therapy; (4) by SARS-CoV-2 viral load (viral RNAemia, viral antigenemia and viral RNA load [N1 region]); and (5) by RDV administration timing. To evaluate the effect of remdesivir on 90-day mortality, we used a Cox regression model stratified on the center variable, tested in univariable and propensity-adjusted multivariable analyses. A further analysis using the propensity score matching method was performed to confirm the results obtained with the propensity-adjusted multivariable model. On the other hand, effect modification by factors potentially associate with patient outcomes and remdesivir use were assessed by an interaction term. We also analysed the association between remdesivir therapy and the following variables: in-hospital and 30-day mortality (by means of a Fine-Gray competing risks model stratified on the center variable and a Cox regression model stratified on the center variable, respectively); and nosocomial bacterial pneumonia (by means of generalised estimating equations, considering a binomial distribution and accounting for the effect raised by the clustering of patients from the same center).

Among the 6225 COVID-19 patients that were admitted to 55 ICUs. We included 5004 patients in this analysis, of whom 4209 (84%) did not receive RDV and 795 (16%) received RDV during hospitalization (Fig. 1).

Ninety-day mortality rate was lower in patients who received RDV than in those who did not receive RDV (34 % vs. 29%, $p = 0.012$). Also, in-hospital (31 % vs. 27%, $p = 0.025$) and 30-day mortality (25 % vs. 18%, $p < 0.001$) were lower in the RDV group (Supplementary Table 1). In the propensity-adjusted multivariable analysis, RDV use was not significantly associated with 90-day mortality (HR 1.00, 95% CI 0.85 to 1.17; $p = 0.970$), nor with in-hospital (sHR 0.94, 95% CI 0.81 to 1.09, $p = 0.41$) and 30-day mortality (HR 0.86, 95% CI 0.71 to 1.05, $p = 0.145$) (Table 1). In the analysis using the propensity score matching (777 patients received RDV and 777 did not receive RDV), the Kaplan-Meier curves showed that there was no statistical difference between both groups for 90-day mortality ($p = 0.280$) (Supplementary Figure 1). Furthermore, Cox regression showed that RDV use was not associated with the risk of 90-day mortality (HR 0.95, 95% CI 0.79 to 1.16; $p = 0.636$), nor with in-hospital mortality (sHR 0.92, 95% CI 0.76 to 1.11; $p = 0.36$) and 30-day mortality (HR 0.81, 95% CI 0.65 to 1.02; $p = 0.075$).

To examine mortality risk for particular types of patients, we explored modification effects by age, APACHE-II score, SOFA score, lymphocyte count, C-RP, respiratory support, corticosteroids, viral RNAemia, viral antigenemia and viral RNA load in plasma. No significant effect modification was found after adjustment for covariates using propensity score (Table 1).

Among the overall population receiving RDV, there was significant association observed between early administration (<5 days since symptoms' onset) and the propensity-adjusted risk of 90-day mortality (HR 1.53, 95% CI 1.02 to 2.31, $p = 0.042$) (Table 1). In contrast, there were no significant association between <7 days since symptoms' onset and the risk of 90-day mortality (HR 1.21, 95% CI 0.85 to 1.72, $p = 0.285$).

When compared to the non-RDV group, patients in the RDV group less frequently presented myocarditis, cardiac ischemia, delirium, coagulation disorder, anemia, acute renal failure and

RESEARCH ARTICLE

A machine learning model for predicting serum neutralizing activity against Omicron SARS-CoV-2 BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population

Jorge Camacho¹  | Eliseo Albert¹ | Beatriz Álvarez-Rodríguez² | Luciana Rusu² | Joao Zulaica² | Alicia Rodríguez Moreno² | Salvador Peiró³  | Ron Geller² | David Navarro^{1,4,5}  | Estela Giménez^{1,4}

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

²Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Universitat de Valencia-CSIC, Valencia, Spain

³Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of the Valencian Community (FISABIO), Valencia, Spain

⁴CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁵Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

Estela Giménez, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA. Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain.
Email: estela.gimenez.quiles@gmail.com

Abstract

Supervised machine learning (ML) methods have been used to predict antibody responses elicited by COVID-19 vaccines in a variety of clinical settings. Here, we explored the reliability of a ML approach to predict the presence of detectable neutralizing antibody responses (NtAb) against Omicron BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population. Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) total antibodies were measured by the Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S assay (Roche Diagnostics) in all participants. NtAbs against Omicron BA.2 and BA.4/5 were measured using a SARS-CoV-2 S pseudotyped neutralization assay in 100 randomly selected sera. A ML model was built using the variables of age, vaccination (number of doses) and SARS-CoV-2 infection status. The model was trained in a cohort (TC) comprising 931 participants and validated in an external cohort (VC) including 787 individuals. Receiver operating characteristics analysis indicated that an anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody threshold of 2300 BAU/mL best discriminated between participants either exhibiting or not detectable Omicron BA.2 and Omicron BA.4/5-Spike targeted NtAb responses (87% and 84% precision, respectively). The ML model correctly classified 88% (793/901) of participants in the TC: 717/749 (95.7%) of those displaying ≥ 2300 BAU/mL and 76/152 (50%) of those exhibiting antibody levels < 2300 BAU/mL. The model performed better in vaccinated participants, either with or without prior SARS-CoV-2 infection. The overall accuracy of the ML model in the VC was comparable. Our ML model, based upon a few easily collected parameters for predicting neutralizing activity against Omicron BA.2 and BA.4/5 (sub)variants circumvents the need to perform not only neutralization assays, but also anti-S serological tests, thus potentially saving costs in the setting of large seroprevalence studies.

KEYWORDS

anti-receptor-binding domain antibodies, BA/4/5 sublineages, machine learning, neutralizing antibodies, Omicron BA.2, SARS-CoV-2

1 | INTRODUCTION

The roll out of vaccination programs against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has dramatically changed the landscape of the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic.¹ SARS-CoV-2 vaccination has been shown to be highly effective in the prevention complications after COVID-19 caused by the inherited Wuhan-Hu-1 variants and subsequently emerging (sub)variants of concern.^{2,3} Among antibodies elicited by SARS-CoV-2 vaccination or natural infection, those exhibiting neutralizing antibody activity (NtAb) are thought to be critically involved in protection against SARS-CoV-2 infection and are thus considered a replacement correlate of vaccine efficacy.^{4,5} Unfortunately, measurement of NtAb by employing either live infectious virus or SARS-CoV-2 (S) pseudotypes is cumbersome and time consuming, and thus not feasible in most clinical microbiology laboratories.

Serum levels of antibodies binding SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD), as measured by commercial (electro)chemiluminescent immunoassays, correlate reasonably well with NtAbs titers,^{6–8} and accordingly may be used as a surrogate of neutralizing activity of sera. Nonetheless, threshold antibody levels for protection, most likely dependent upon the SARS-CoV-2 (sub)variant considered, are yet to be conclusively defined.^{4,9–11}

Supervised ML methods have been successfully employed to predict either qualitative or quantitative antibody responses elicited by COVID-19 vaccines in a variety of clinical settings.^{12–15} Here, we explored the reliability of a ML approach (Classification and Regression Tree, CART)¹⁶ to predict anti-SARS-CoV-2-RBD total antibody levels, which are strongly associated with presence of detectable NtAb responses against Omicron BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population.

2 | METHODS

2.1 | Study population

Two databases were used for analysis purposes, one for building and training the ML algorithm (training cohort [TC]) and the other for validation (validation cohort [VC]). The TC was generated within a previous study launched in April 2022 by the Valencian COVID-19 vaccine research program (ProVaVac) aimed at determining the overall cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the Valencian Community, Spain, and comprising 931 participants from among the general population.¹⁷ The VC database was built within an analogous study conducted in October 2022 that comprised 787 individuals. The demographic characteristics of participants are summarized in Table 1. The informed consent requirement was waived by the Research Ethics Committee of Public Health (ref. 20220408/02) as the project was developed under the epidemiological surveillance competencies of the VC

Ministry of Health (Law 10/2014 of the Valencian Community on Public Health).

2.2 | Antibody assays

Anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (N) IgG antibodies and anti-RBD total antibodies were measured by the Elecsys[®] Anti-SARS-CoV-2 N IgG assay and the Elecsys[®] Anti-SARS-CoV-2 S assay (Roche Diagnostics), as previously reported.¹⁷ NtAbs against Omicron BA.2 and BA.4/5 were measured using a GFP-expressing vesicular stomatitis virus pseudotyped with the Omicron BA.2 and BA.4/5 S protein, as described elsewhere.^{18–20}

2.3 | Definitions

Participants who met one or more of the following criteria were considered to have had prior SARS-CoV-2 infection: (i) presence of serum nucleocapsid (N)-reactive IgG antibodies; (ii) record of positive AIDT (active infection diagnostic test) result on the VC electronic surveillance database RedMiva; (iii) presence of positive anti-SARS-CoV-2 S RBD total antibodies in the absence of vaccination record. Based on the Valencian Community vaccination records, participants were stratified into: (i) unvaccinated; (ii) vaccinated not boosted, including participants with both complete and incomplete vaccination schedules; (iii) fully vaccinated and boosted with a homologous vaccine platform; and (iv) fully vaccinated and boosted with a heterologous vaccine platform. Ultimately, participants were classified into four different groups according to vaccination/SARS-CoV-2 infection status: (i) vaccinated with prior SARS-CoV-2 infection (VAC-ex); (ii) vaccinated with no prior SARS-CoV-2 infection (VAC-n); (iii) unvaccinated with a prior SARS-CoV-2 infection (UNVAC-ex); and (iv) unvaccinated with no prior SARS-CoV-2 infection (UNVAC-n). Median days since last vaccine dose was 138 [IQR 83–159] in the TC and 291 [IQR 258–333] in the VC, respectively.

2.4 | Supervised ML method: CART

The following parameters were used to build the ML model: age (continuous variable), sex, number of vaccine doses received (0–4), vaccination schedule (no vaccination, vaccination [full or incomplete] with no booster dose, or full vaccination with either homologous or heterologous booster), time elapsed since receipt of last vaccine dose (continuous variable), and history of prior SARS-CoV-2 infection (yes or no). For unvaccinated participants, a value of 5000 was arbitrarily assigned to the “days elapsed since vaccination” variable for analysis purposes. A decision tree diagram was constructed using the exhaustive CHAID algorithm, with a maximum tree depth of 10, 5% level of significance, and Bonferroni correction. Variables that showed multicollinearity were

TABLE 1 Demographic characteristics of participants included in the training and validation cohorts.

Parameter	n (%)	UNVAC-n	UNVAC-ex	VAC-n	VAC-ex
<i>Training cohort</i>					
Age (years)					
All	931 (100)	21 (2.3)	63 (6.8)	469 (50.4)	378 (40.6)
0–9	40 (4.3)	7 (33.3)	12 (19)	7 (1.5)	14 (3.7)
10–19	87 (9.3)	1 (4.8)	9 (14.3)	26 (5.5)	51 (13.5)
20–34	150 (16)	3 (14.3)	11 (17.5)	51 (10.9)	85 (22.5)
35–49	181 (19)	3 (14.3)	16 (25)	75 (16)	87 (23)
50–64	173 (18.6)	2 (9.5)	2 (3.2)	89 (19)	80 (21)
65–79	159 (17)	2 (9.5)	5 (7.9)	115 (24.5)	37 (9.8)
>80	141 (15)	3 (14.3)	8 (12.7)	106 (22.6)	24 (6.4)
Sex					
Male	411 (44)	8 (38)	29 (46)	190 (41)	184 (49)
Female	520 (56)	13 (62)	34 (54)	279 (59)	194 (51)
<i>Validation cohort</i>					
Age (years)					
All	787 (100)	8 (1)	61 (7.8)	218 (27.7)	500 (63.5)
0–9	56 (7.1)	5 (62.5)	25 (41)	5 (2.3)	21 (4.2)
10–19	59 (7.5)	-	4 (6.6)	5 (2.3)	50 (10)
20–34	119 (15.1)	1 (12.5)	10 (16.4)	14 (6.4)	94 (18.8)
35–49	146 (18.6)	-	8 (13.1)	40 (18.4%)	98 (19.6%)
50–64	156 (19.8)	-	7 (11.5)	40 (18.4)	109 (21.8)
65–79	140 (17.8)	1 (12.5)	2 (3.3)	57 (26.2)	80 (16)
>80	111 (14.1)	1 (12.5)	5 (8.2)	57 (26.2)	48 (9.6)
Sex					
Male	352 (44.7)	4 (50)	25 (41)	104 (48)	219 (44)
Female	435 (55.3)	4 (50)	36 (59)	114 (52)	281 (56)

Abbreviations: CAV-ex, vaccinated/SARS-CoV-2 experienced; UNVAC-ex, unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced; UNVAC-n, unvaccinated/SARS-CoV-2 naïve; VAC-n, vaccinated/SARS-CoV-2 naïve.

automatically discarded. The CART model was first trained with the entire TC and next by using randomly selected ($n = 30$) participants for verification purposes. Next, we applied the CART model in the VC to assess its predictive ability.

2.5 | Statistical analyses

Receiver Operational Curves (ROC) were generated to investigate the most appropriate cut-off in terms of sensitivity and specificity (area under the curve [AUC]) to discriminate between sera displaying either detectable or undetectable neutralizing activity against each SARS-CoV-2 Omicron sublineage. Two-sided exact p values were reported. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses and graphs were carried out using GraphPad

prism version 9.0.0 for Windows, (GraphPad Software, www.graphpad.com) and XLSTAT software (Addinsoft).

3 | RESULTS

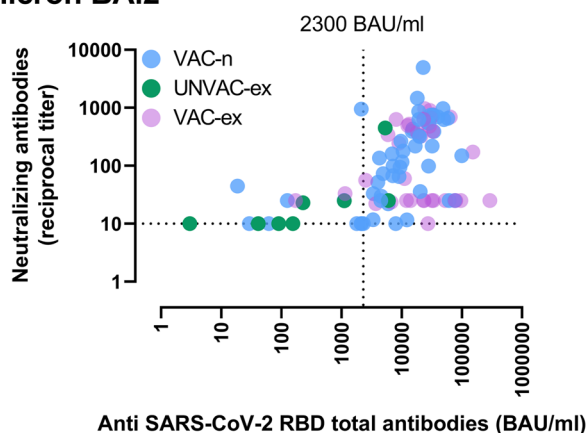
3.1 | Characteristics of the participants included in the training and validation cohorts

A total of 931 participants were included in the training cohort (TC) and $n = 781$ in the validation cohort (VC). The main characteristics of the participants (age, sex, and vaccination and infection status) are shown in Table 1. Of note, the percentage of vaccinated with prior SARS-CoV-2 infection (VAC-ex) participants was significantly higher in the TC than in the VC (63% vs. 41%; $p < 0.01$).

3.2 | Serum anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody levels predicting detectability of neutralizing antibodies against Omicron BA.2 and BA.4/5

A total of 100 randomly selected sera from 100 different participants were examined for detectable levels of NtAb against Omicron BA.2 (found in 88) and BA.4/5 (in 84), with a median reciprocal IC₅₀ titer of 148 (range, 12–1458) and 1031 (range, 24–62,500), respectively. ROC analysis indicated that an anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody threshold of 2300 BAU/mL best discriminated between participants exhibiting detectable NtAb responses and those with undetectable levels, with 90% sensitivity, 71% specificity and 87% precision (AUC: 0.83; $p < 0.001$) for BA.2 and 88% sensitivity, 67% specificity, and 84% precision (AUC, 0.90; $p < 0.001$) for BA.4/5, Figure 1.

Omicron BA.2



Omicron BA.4/5

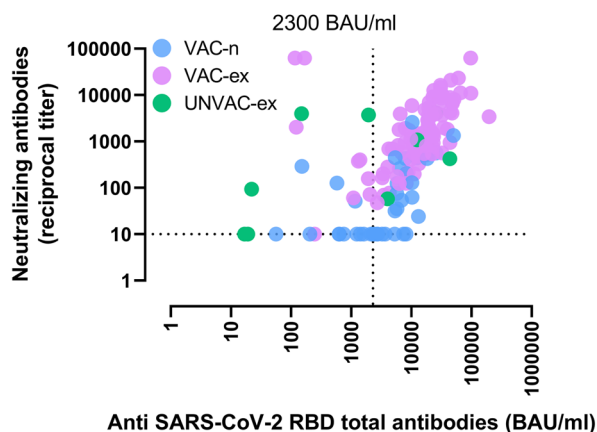


FIGURE 1 Correlation between anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) total antibodies (in BAU/mL) and inverse neutralizing reciprocal IC₅₀ titers (NtAb) against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 and Omicron BA.4/5 in vaccinated/SARS-CoV-2 naïve (VAC-n), unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced (UNVAC-ex) and vaccinated/SARS-CoV-2 experienced (VAC-ex) participants. The anti-RBD total antibody threshold that best discriminated between participants either displaying or not detectable Omicron BA.2 and BA.4/5 NtAb responses is shown.

3.3 | CART model for predicting detectable serum neutralizing activity against Omicron BA.2 and BA.4/5 based upon anti-RBD total antibody level measurements

A CART model was built for predicting the presence of anti-SARS-CoV-2 RBD total antibodies ≥ 2300 BAU/mL as a surrogate for detectable NtAb responses. The model finally included the following variables: age, vaccination schedule, days since receipt of the last vaccine dose, history of prior SARS-CoV-2 infection. Note that as time elapsed since the last vaccine dose showed multicollinearity with the number of vaccine doses received, we chose to maintain only the latter parameter in the final model. As depicted in Figure 2, the model comprised a total of 25 nodes (Supporting Information: Table 1). The first segmentation of the classification tree was based on the vaccination schedule; the probability of displaying anti-RBD total antibodies ≥ 2300 BAU/mL ranged between 94% for fully vaccinated and boosted with an heterologous vaccine platform participants, to 42% for unvaccinated individuals that had contracted SARS-CoV-2 infection. As shown in Figure 3, for vaccinated participants without booster vaccine, Figure 3A, prior SARS-CoV-2 infection, age (for SARS-CoV-2 naïve participants) and number of vaccine doses received (for SARS-CoV-2 experienced) modulated the probability of displaying antibody levels ≥ 2300 BAU/mL. Among fully vaccinated participants who received a homologous booster dose, Figure 3B, the probability ranged between 75% to 100% according to age. Across fully vaccinated participants who received a heterologous booster, Figure 3C, the probability ranged between 78% and 100% depending upon age, and for those aged between 50 and 65 years, the range was between 91% and 100% according to SARS-CoV-2

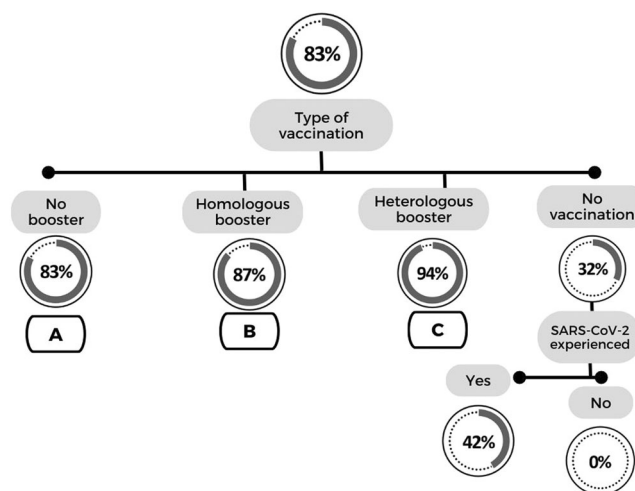


FIGURE 2 Supervised machine learning (classification and regression tree) model for the prediction of anti-SARS-CoV-2 RBD total antibodies ≥ 2300 BAU/mL. Each node classifies the previous population based on a separator variable. The purity of each node (the fraction of data elements in the group that belongs to the same class, [i.e., RBD] total antibodies ≥ 2300 BAU/mL) is represented. RBD, receptor-binding domain.

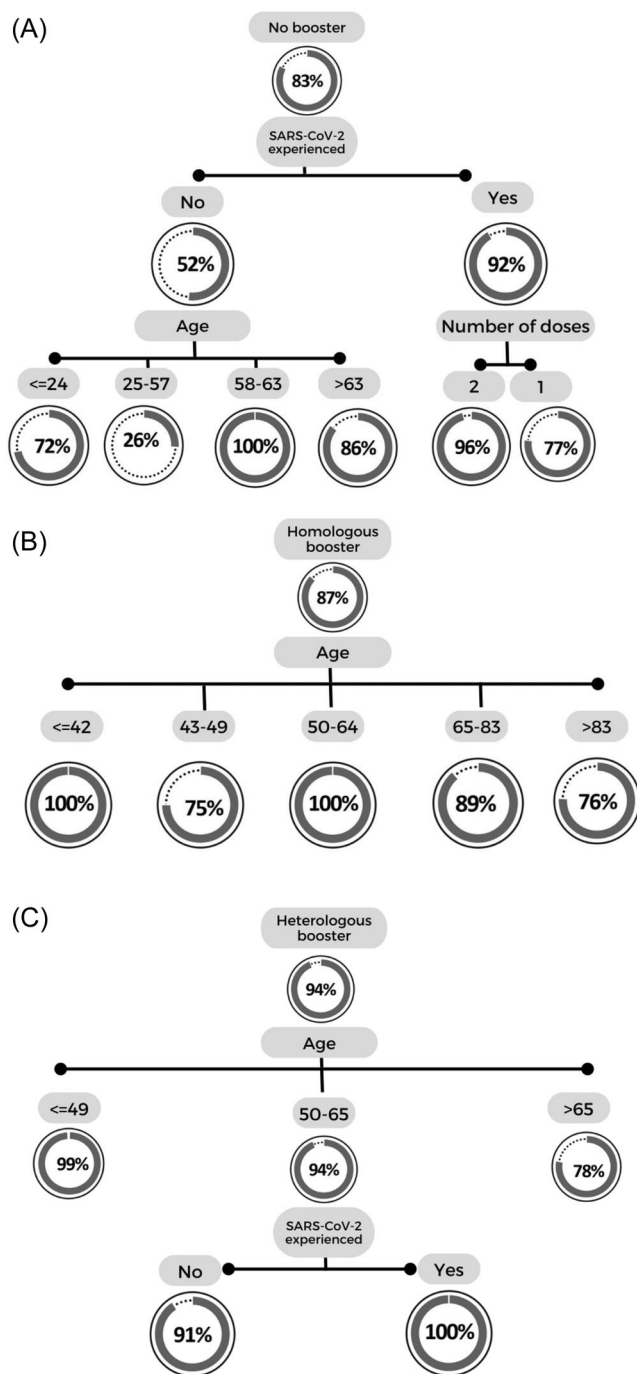


FIGURE 3 Continuation of the CART model for predicting anti-SARS-CoV-2 RBD total antibodies above 2300 BAU/mL: (A) homologous booster, (B) no booster, and (C) heterologous booster. RBD, receptor-binding domain.

experience. As shown in Table 2, overall, the model was able to correctly classify 88% (793/901) of participants in the TC: 717/749 (95.7%) of those displaying ≥ 2300 BAU/mL and 76/152 (50%) of those < 2300 BAU/mL. The model performed better in VAC-n (1% false negatives, 12% false positives) and VAC-ex participants (0% false negatives, 6% false positives) than in UNVAC-ex individuals (41% false negatives).

When used in a TC subcohort comprising 30 randomly selected subjects, the ML model correctly classified 29/30 (96.7%) participants: 26/27 (96%) of those displaying antibody levels ≥ 2300 BAU/mL and 3/3 (100%) of those < 2300 BAU/mL.

3.4 | Validation of the model

Next, we validated the CART model in a new cohort comprising $n = 787$ participants that were included in a seroprevalence study conducted in October 2022. The CART model correctly classified 95% (596/627) and 33% (53/160) of participants with total antibodies above and below 2300 BAU/mL, respectively, with an overall accuracy of 82% (correct categorization of 646/787 participants). The performance of the model is described in detail for each population group in Table 3.

In more detail, in UNVAC-ex, a total of $n = 23$ (38%) participants had antibodies ≥ 2300 BAU/mL but were classified as < 2300 [FN] by the model. Unfortunately data about infection date was lacking in most of them. In the VAC-n group, $n = 63$ (31%) participants had antibodies < 2300 BAU/mL but were classified as ≥ 2300 BAU/mL [FP] by the model. This may be explained in part by the fact that the model was built using a cohort that was tested a median of 166 days [IQR 82–149] after the last vaccine dose, whereas the validation cohort was tested a median of 316 days [IQR 282–335] after the last vaccine dose. In the VAC-ex group, 91% of participants were correctly classified, with total antibodies ≥ 2300 BAU/mL. The remaining $n = 45$ (9%) participants, were considered false positives of the model, Table 3. Infection data were available in 29 of these 45 participants, and the SARS-CoV-2 infection episode occurred a median of 452 days [IQR 263–613] before testing, which could explain, in part, the discrepancy observed.

As with the TC, in the VC the ML model performed better for identifying VAC-n and VAC-ex individuals with antibody levels ≥ 2300 BAU/mL.

4 | DISCUSSION

To our best knowledge, this is the first study to generate a supervised ML model capable of predicting the presence of detectable NtAb against SARS-CoV-2 in individuals among the general population. The model used a small number of easily collectable variables, including age, vaccination schedule, and history of prior SARS-CoV-2 infection. Studies resembling ours have reported on ML models designed to predict SARS-CoV-2 seroconversion or suboptimal (arbitrarily defined) anti-RBD antibody levels following vaccination in solid organ or allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients, which displayed variable precision.^{12–15} For instance, via ML analysis, Papadopoulos et al.¹² showed that age, body mass index and the presence of autoimmune diseases influenced the level of NtAbs against SARS-CoV-2 after vaccination. Osmanodja et al.¹³ applied ML algorithms to predict the positive serological response after third and

TABLE 2 Performance of the machine learning model for predicting anti-SARS-CoV-2 Spike (S) receptor-binding domain (RBD) antibody levels associated with neutralizing activity against Omicron BA.2 and BA.4/5 in the training cohort.

Group (no. of participants)	Measured anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody levels ≥ 2300 BAU/mL		Measured anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody levels < 2300 BAU/mL	
	Predicted ≥ 2300 . n (%) [TP]	Predicted < 2300 . n (%) [FN]	Predicted ≥ 2300 . n (%) [FP]	Predicted < 2300 . n (%) [TN]
UNVAC-n (n = 21)	0	0	0	21 (100)
UNVAC-ex (n = 63)	1 (2)	26 (41)	0	36 (57)
VAC-n (n = 469)	386 (82)	6 (1)	55 (12)	22 (5)
VAC-ex (n = 378)	357 (94)	0	21 (6)	0

Abbreviations: FN, false negative; FP, false positive; TN, true negative; TP, true positive; UNVAC-ex, unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced; UNVAC-n, unvaccinated/SARS-CoV-2 naive; VAC-ex, vaccinated/SARS-CoV-2 experienced; VAC-n, vaccinated/SARS-CoV-2 naive.

TABLE 3 Performance of the machine learning model for the prediction of anti-SARS-CoV-2 Spike (S) receptor-binding domain (RBD) antibody levels associated with neutralizing activity against Omicron BA.2 and BA.4/5 in the validation cohort.

Group (no. of participants)	Measured anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody levels ≥ 2300 BAU/mL		Measured anti-SARS-CoV-2 RBD total antibody levels < 2300 BAU/mL	
	Predicted ≥ 2300 . n (%) (TP)	Predicted < 2300 . n (%) (FN)	Predicted ≥ 2300 . n (%) (FP)	Predicted < 2300 . n (%) (TN)
UNVAC-n (n = 8)	NA	NA	NA	8 (100)
UNVAC-ex (n = 61)	0	23 (38)	0	38 (62)
VAC-n (n = 218)	140 (64)	7 (3)	61 (31)	8 (4)
VAC-ex (n = 500)	455 (91)	0	45 (9)	0

Abbreviations: FN, false negative; FP, false positive; NA, not applicable; TN, true negative; TP, true positive; UNVAC-ex, unvaccinated/SARS-CoV-2 experienced; UNVAC-n, unvaccinated/SARS-CoV-2 naive; VAC-ex, vaccinated/SARS-CoV-2 experienced; VAC-n, vaccinated/SARS-CoV-2 naive.

fourth doses in kidney transplant recipients, but it was built and applied only in seronegative COVID-naïve patients. Alejo et al.¹⁴ also built an ML model for the prediction of antibody levels after vaccination in solid organ transplant recipients. However, it was built using a cohort of COVID-19 naïve recipients, and the predictive ability was moderate. Piñana et al.¹⁵ also built a model for the prediction of a positive antibody response after vaccination in hematological patients that enabled the identification of clinical profiles associated with poor humoral responses.

Our ML model can estimate the probability of individuals of all ages in the general population to display SARS-CoV-2 anti-RBD total antibody levels ≥ 2300 BAU/mL, which is associated with detectability of NtAb against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 (precision, 87%), and BA.4/5 (precision, 84%) sublineages, as measured using an S-pseudotype neutralization assay. The model correctly categorized 95.7% of participants included in the TC displaying antibody levels ≥ 2300 BAU/mL, performing better in VAC-n and VAC-ex than UNVAC-ex or UNVAC-n participants. When used in the VC, the ML model correctly identified 95% of participants with antibody levels ≥ 2300 BAU/mL; importantly, regardless of the time elapsed between sample collection times. Note that the VC was recruited after the surge of Omicron BA.4/5 which substantially increased exposure to SARS-CoV-2 in the general population. The model performed better in VAC-ex participants, whereas its predictive ability in VAC-n participants was highly dependent on the time elapsed since the last vaccine dose, likely because of antibody waning.

The current study has several limitations, including the following: first, the anti-RBD total antibody level cut-off selected for discriminating between participants displaying detectable NtAb responses against Omicron BA.2 and BA.4/5 was not 100% precise (87% for BA.2 and 84% for BA.4/5). Second, NtAb assays were run on a limited percentage of sera from participants in the TC and VC. Third, most sera in both cohorts had anti-RBD total antibody levels ≥ 2300 BAU/mL. Fourth, the precise date of SARS-CoV-2 infection was known only in a few participants, thus precluding the performance of additional subanalyses taking into consideration the SARS-CoV-2 (sub)variant involved. Fifth, testing other ML approaches, such as k-Nearest Neighbors, Naïve-Bayes or Random Forests algorithms, was beyond the scope of the study. Sixth, the ML model was built to predict NtAb detectability, which may not correlate with protection in all individuals; nonetheless, to our knowledge no NtAb threshold level affording protection against Omicron BA.2 and BA.4/5 has yet been defined. Seventh, the ML model was not tested for its predictive ability of detectable NtAb responses against currently expanding SARS-CoV-2 sublineages such as BQ.1.1, BA.2.75, or XBB.1, which may have an enhanced ability to escape from vaccine- or natural infection-elicited NtAb responses.^{21,22} Last but not least, the specific type of immunization strategy (mRNA-based, nonreplicating viral vector, inactivated or recombinant viral vector) used for each vaccine dose was not included in the model, which could have improved the predictive accuracy in vaccinated individuals.

5 | CONCLUSION

In conclusion, our ML CART model based upon a few easy-to-collect parameters for the prediction of neutralizing activity against Omicron BA.2 and BA.4/5 (sub)variants circumvents the need to perform not only NtAb, but also anti-S serological assays, especially in vaccinated individuals with a history of SARS-CoV-2 infection, which could be costly in the setting of large seroprevalence studies. This model could prove useful for public health decision making.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jorge Camacho, Eliseo Albert, Beatriz Álvarez-Rodríguez, Luciana Rusu, and Joao Zulaica performed the experiments. Salvador Peiró, Ron Geller, David Navarro, and Estela Giménez conceived and designed the study. Jorge Camacho and Estela Giménez analyzed the data. David Navarro and Estela Giménez wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Estela Giménez (Juan Rodés Contract, JR18/00053) and Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). Beatriz Álvarez-Rodríguez holds a GVA postdoctoral fellowship (APOSTD/2021/017). This study was supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (FIS, PI21/00563) granted to David Navarro, and by the European Commission NextGenerationEU fund (EU 2020/2094), granted through CSIC's Global Health Platform (PTI Salud Global) to Ron Geller. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or in the decision to submit the work for publication.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Jorge Camacho  <http://orcid.org/0000-0002-6602-0966>

Salvador Peiró  <http://orcid.org/0000-0002-3902-569X>

David Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

REFERENCES

- Moghadas SM, Vilches TN, Zhang K, et al. The impact of vaccination on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreaks in the United States. *Clin Infect Dis*. 2021;73(12):2257-2264.
- Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald C-J, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2022;28:202-221.
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New Engl J Med*. 2021;385:1761-1773.
- Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science*. 2022;375:43-50.
- Castro Dopico X, Ols S, Loré K, Karlsson Hedestam GB. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med*. 2022;291:32-50.
- Cristiano A, Pieri M, Sarubbi S, et al. Evaluation of serological anti-SARS-CoV-2 chemiluminescent immunoassays correlated to live virus neutralization test, for the detection of anti-RBD antibodies as a relevant alternative in COVID-19 large-scale neutralizing activity monitoring. *Clin Immunol*. 2022;234:108918.
- Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: what do we know and should we be testing for it. *J Clin Microbiol*. 2022;60:e0048221.
- Higgins V, Fabros A, Kulasingam V. Quantitative measurement of anti-SARS-CoV-2 antibodies: analytical and clinical evaluation. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e03149-e03120.
- Hachmann NP, Miller J, Collier AY, Barouch DH. Neutralization escape by SARS-CoV-2 omicron subvariant BA.4.6. *N Engl J Med*. 2022;387:1904-1906.
- Jacobsen H, Katzmarzyk M, Higdon MM, et al. Post-vaccination neutralization responses to Omicron sub-variants. *Vaccines*. 2022;10:1757.
- Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Med*. 2021;27:1205-1211.
- Papadopoulos D, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, et al. Predictive factors for neutralizing antibody levels nine months after full vaccination with BNT162b2: results of a machine learning analysis. *Biomedicines*. 2022;10:204.
- Osmanodja B, Stegbauer J, Kantauskaite M, et al. Development and validation of multivariable prediction models of serological response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Front Immunol*. 2022;13:997343.
- Alejo JL, Mitchell J, Chiang TP-Y, et al. Predicting a positive antibody response after 2 SARS-CoV-2 mRNA vaccines in transplant recipients: a machine learning approach with external validation. *Transplantation*. 2022;106:e452-e460.
- Piñana JL, Rodríguez-Belenguer P, Caballero D, et al. Applicability of probabilistic graphical models for early detection of SARS-CoV-2 reactive antibodies after SARS-CoV-2 vaccination in hematological patients. *Ann Hematol*. 2022;101:2053-2067.
- Trujillano J, Sarria-Santamera A, Esquerda A, Badia M, Palma M, March J. Aproximación a la metodología basada en árboles de decisión (CART). Mortalidad hospitalaria del infarto agudo de miocardio. *Gac Sanit*. 2008;22(1):65-72.
- Camacho J, Giménez E, Albert E, et al. Cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection in the general population of the valencian community (Spain) after the surge of the Omicron BA.1 variant. *J Med Virol*. 2023;95:e28284.
- Giménez E, Albert E, Zulaica J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 adaptive immunity in nursing home residents following a third dose of the comirnaty coronavirus disease 2019 vaccine. *Clin Infect Dis*. 2022;75:e865-e868.
- Sánchez-Sendra B, Albert E, Zulaica J, et al. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern elicited by the comirnaty COVID-19 vaccine in nursing home residents. *Sci Rep*. 2022;12:3788.
- Camacho J, Zulaica J, Giménez E, et al. Neutralizing antibodies against Omicron BA.4/5 after COVID-19 vaccination in SARS-CoV-2 experienced versus naïve individuals in the general population. *J Infect*. 2023;50163-4453(22):00755.
- Chatterjee S, Bhattacharya M, Nag S, Dhama K, Chakraborty C. A detailed overview of SARS-CoV-2 omicron: its sub-variants, mutations and pathophysiology, clinical characteristics, immunological landscape, immune escape, and therapies. *Viruses*. 2023;15:167.

22. Miller J, Hachmann NP, Collier AY, et al. Substantial neutralization escape by SARS-CoV-2 Omicron variants BQ.1.1 and XBB.1. *N Engl J Med*. 2023;388:662-664. doi:10.1056/NEJMc2214314

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Camacho J, Albert E, Álvarez-Rodríguez B, et al. A machine learning model for predicting serum neutralizing activity against Omicron SARS-CoV-2 BA.2 and BA.4/5 sublineages in the general population. *J Med Virol*. 2023;95:e28739. doi:10.1002/jmv.28739

