

## Dinámica de las respuestas de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 y duración de la inmunidad: un estudio longitudinal

Wan Ni Chia \*, Feng Zhu \*, Sean Wei Xiang Ong, Barnaby Edward Young, Siew-Wai Fong, Nina Le Bert, Chee Wah Tan, Charles Tiu, Jinyan Zhang, Seow Yen Tan, Surinder Pada, Yi-Hao Chan, Christine Y L Tham, Kamini Kunasegaran, Mark I-C Chen, Jenny G H Low, Yee-Sin Leo, Laurent Renia, Antonio Bertoletti, Lisa F P Ng, David Chien Lye, Lin-Fa Wang

Programme in Emerging Infectious Diseases, Duke-NUS Medical School, Singapore

The Lancet, [doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00025-2), 23 de marzo, 2021.

### Resumen

**Antecedentes.** Los estudios han encontrado diferentes tasas de disminución de los anticuerpos neutralizantes, en comparación con los anticuerpos de unión, contra el SARS-CoV-2. Se desconoce el impacto de la tasa de disminución de los anticuerpos neutralizantes a nivel individual, en la duración de la inmunidad. Nuestro objetivo fue investigar los niveles máximos, y la dinámica de la disminución de los anticuerpos de neutralización, así como la maduración de la avidéz de la IgG con el tiempo, y su correlación con los parámetros clínicos, las citocinas y las respuestas de células T.

**Métodos.** Hicimos un estudio longitudinal de pacientes que se habían recuperado de COVID-19 hasta el día 180 después del inicio de síntomas, mediante el seguimiento de los cambios en los niveles de anticuerpos neutralizantes, utilizando un virus sustituto validado previamente para la prueba de neutralización. Los cambios en la avidéz de los anticuerpos y otros marcadores inmunes en las diferentes etapas de la convalecencia fueron determinados, y correlacionados con las características clínicas. Usando un algoritmo de aprendizaje automático, el cambio temporal en los niveles de anticuerpos neutralizantes se clasificó en cinco grupos y se utilizaron para predecir la longevidad de la inmunidad mediada por anticuerpos neutralizantes.

**Hallazgos.** Invitamos a 517 pacientes para participar en el estudio, de los cuales 288 dieron su consentimiento para el seguimiento ambulatorio y la recolección de muestras de sangre seriadas. 164 pacientes fueron seguidos y se tomaron muestras de sangre para analizar, con un total de 546 muestras de suero recolectadas, incluidas 128 muestras de sangre tomadas hasta 180 días después del comienzo de síntomas.

Identificamos 5 patrones distintivos de la dinámica de anticuerpos neutralizantes de la siguiente manera: negativo, individuos que, en nuestros intervalos de muestreo, no desarrollaron anticuerpos neutralizantes al nivel de inhibición del 30% (19 [12%] de 164 pacientes); menguante rápido, individuos que tenían niveles variables de anticuerpos neutralizantes alrededor de 20 días después del inicio de los síntomas, pero que serorevirtieron en menos de 180 días (44 [27%] de 164 pacientes); menguante lento, individuos que permanecieron con anticuerpos neutralizantes positivos a los 180 días después de la aparición de los síntomas (52 [29%] de 164 pacientes); persistentes, aunque con diferentes niveles máximos de anticuerpos neutralizantes, estos individuos tenían una caída mínima de los anticuerpos neutralizantes (52 [32%] de 164 pacientes); y respuesta tardía, un pequeño grupo que mostró un aumento inesperado de los anticuerpos neutralizantes durante la convalecencia tardía (a los 90 o 180 días después del inicio de los síntomas; tres [2%] de 164 pacientes).

La persistencia de los anticuerpos neutralizantes se asoció con la gravedad de la enfermedad y un nivel sostenido de las citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento.

Por el contrario, las respuestas de las células T fueron similares entre los diferentes grupos dinámicos de anticuerpos neutralizantes.

Sobre la base de las diferentes dinámicas de desintegración, establecimos un algoritmo de predicción que reveló un amplio rango de longevidad de los anticuerpos neutralizantes, que varía desde alrededor de 40 días hasta muchas décadas.

**Interpretación.** La dinámica de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes en los pacientes que se han recuperado de COVID-19 varía mucho, y la predicción de la longevidad inmunitaria solo puede determinarse con precisión a nivel individual. Nuestros hallazgos enfatizan la importancia de las medidas sociales y de salud pública en la respuesta al brote pandémico en curso, y podría haber implicaciones para la longevidad de la inmunidad después de la vacunación.

**Financiamiento.** del Consejo Nacional de Investigación Médica, el Consejo de Investigación Biomédica y A \* STAR, Singapur.

## Investigación en contexto

### Evidencia antes de este estudio

Buscamos en PubMed el 16 de septiembre de 2020, sin restricciones, utilizando los términos ("SARS-CoV-2" O "COVID-19"), ("Anticuerpo neutralizante" O "anticuerpo neutralizante") y "longevidad". Nuestra búsqueda no recuperó artículos publicados. Buscamos medRxiv y bioRxiv y encontramos 22 y 18 preimpresiones, respectivamente. La mayoría de los estudios no fueron directamente relacionados con una investigación de cohorte longitudinal. Algunos estudios siguieron las respuestas de anticuerpos usando ELISA o pruebas de neutralización virales con virus vivo en laboratorios de nivel de bioseguridad (BSL) 3 o pseudovirus en los laboratorios BSL2, y pocos tuvieron una duración de 6 meses después del inicio de los síntomas. Una limitación común fue tamaño de la cohorte (en su mayoría menos de 100 participantes) e irregular frecuencia de muestreo. Ninguno de los estudios investigó la avidez de los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en el contexto de respuestas de anticuerpos contra la proteína S y longevidad de anticuerpos neutralizantes.

### Valor agregado de este estudio

En esta encuesta longitudinal de 180 días, examinamos la dinámica del cambio de los anticuerpos, centrándonos en el nivel de los anticuerpos neutralizantes, ya que se correlacionan mejor con una inmunidad protectora que los anticuerpos de unión total. Además, investigamos el cambio en la avidez como un biomarcador adicional para la calidad de las respuestas de anticuerpos en diferentes individuos, y descubrimos que la rápida maduración de la avidez desempeñaba un papel importante en la determinación no solo el nivel de anticuerpos neutralizantes, sino también una la tasa decreciente de anticuerpos neutralizantes. El nivel de anticuerpos y la avidez se correlacionaron aún más con otros marcadores inmunes, incluidas las citocinas y la inmunidad de células T. Usando la máquina de algoritmos de aprendizaje, establecimos un modelo de predicción que indicó que la longevidad de la inmunidad de anticuerpos neutralizantes para los pacientes con COVID-19 podría variar de semanas a décadas.

### Implicaciones de toda la evidencia disponible

Aunque no estamos en una etapa para correlacionar de manera concluyente los niveles de las respuestas de anticuerpos con la inmunidad protectora, estamos en una posición mucho mejor para evaluar la dinámica de las respuestas de anticuerpos con los datos de una cohorte que ha estado en convalecencia durante más de 6 meses. Nuestros hallazgos muestran que el nivel y la calidad de los anticuerpos neutralizantes pueden variar en gran medida de un paciente a otro, y que los anticuerpos neutralizantes pueden durar un período prolongado en ciertas poblaciones de pacientes, por lo que es importante monitorear esto a nivel individual. Este trabajo podría tener implicaciones para la longevidad de inmunidad después de la vacunación.

## Introducción

---

La pandemia del COVID-19,<sup>1</sup> causada por el SARS-CoV-2,<sup>2</sup> ha durado más de un año, y no hay señales de que termine. Ha provocado más de 114 millones de casos y cerca de 2,5 millones de muertes al 3 de marzo de 2021.<sup>3</sup> Quedan varias preguntas científicas clave sin respuesta sobre la misma. Una de estas preguntas es la naturaleza y la longevidad de la inmunidad protectora, que es muy importante en el contexto de la evaluación de riesgos para la reinfección y desarrollo de vacunas.<sup>4,5</sup>

En cualquier infección viral, se espera que tanto las respuestas de anticuerpos, como de las células T, desempeñarán un papel en la inmunidad protectora, y hay estudios publicados que sugieren que esto también podría ser cierto para la infección por SARS-CoV-2.<sup>4,6,7</sup>

En pacientes que se han recuperado de COVID-19, algunos individuos tienen niveles muy bajos o ausencia de anticuerpos neutralizantes, lo que indica que la inmunidad de las células T podría ser el mecanismo dominante, al menos en algunos individuos.<sup>8,9</sup> Sin embargo, los altos niveles de anticuerpos de neutralización parecen estar correlacionados con la protección contra la reinfección.<sup>7</sup>

Los estudios previos de otros coronavirus ofrecen poca orientación para la serología del SARS-CoV-2. Las respuestas de anticuerpos a los 4 coronavirus humanos estacionales son generalmente de vida corta, y los individuos recuperados son propensos a la reinfección.<sup>5,10</sup> Los conocimientos actuales para el SARS-CoV y el MERS-CoV son menos concluyentes, con algunos estudios que sugieren que los anticuerpos disminuyen rápidamente y otros que indican una inmunidad mediada por anticuerpos de larga duración.<sup>11-13</sup> Para el SARS-CoV-2, varios estudios serológicos han evaluado la dinámica y la duración de las respuestas de los anticuerpos. Estos hallazgos no son uniformes, con algunos afirmando una disminución rápida y otros que muestran persistencia de los anticuerpos, en parte debido al hecho de que diferentes grupos han medido diferentes anticuerpos y la mayoría de los estudios fueron realizados en una etapa temprana de la convalecencia.<sup>14-18</sup>

Los estudios serológicos longitudinales de pacientes que se han recuperados de COVID-19 son vitales para proporcionar información clave que falta en el contexto de la adquisición de inmunidad protectora y de la longevidad de los anticuerpos neutralizantes para el SARS-CoV-2. Nuestro objetivo fue investigar los niveles máximos y la dinámica de la disminución de los anticuerpos neutralizantes y la maduración de la aivez de la IgG con el tiempo, y correlacionar esto con parámetros clínicos, citocinas y respuestas de células T. A continuación, presentamos nuestros hallazgos de un estudio de cohorte de 180 días en Singapur.

## Métodos

---

### Selección de pacientes y recopilación de datos

El criterio de inclusión para este estudio de cohorte prospectivo fue la infección por COVID-19 confirmada, definida como una PCR positiva para SARS-CoV-2 de cualquier muestra respiratoria. No hubo criterios de exclusión. Los registros médicos electrónicos de los pacientes inscritos fueron revisados y los datos fueron ingresados en un formulario de recolección estandarizado adaptado del Consorcio Internacional de Infecciones Severas Respiratorias Agudas. La gravedad de la enfermedad se definió de la siguiente manera: leve (sin neumonía en la radiografía de tórax), moderada (neumonía en la radiografía de tórax, pero que no requirió oxígeno suplementario), y grave (que requirió oxígeno suplementario, admisión a unidad de cuidados intensivos o ventilación mecánica).

Se recolectaron muestras en serie de sangre semanalmente durante la hospitalización y después del alta hospitalaria entre los días 30 y 60, el día 90, y el día 180. Una descripción más detallada de la cohorte de pacientes se da en el apéndice (pág. 1). La cohorte de pacientes fue reclutada desde el 30 de enero de 2020 hasta el 14 de agosto de 2020, y tenían infección confirmada para SARS-CoV-2, detectada por una PCR de un hisopado nasal.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes como parte de un estudio de cohorte observacional multicéntrico más amplio (estudio PROTECT;<sup>19</sup> dominios específicos del National Healthcare Group, Número de referencia de la Junta de Revisión [DSRB] 2012/00917; Código de referencia NUS-IRB H-20-006).

## **Ensayos de nivel de anticuerpos de neutralización y avides de IgG**

Usamos la prueba de neutralización de virus sustituto para ambos SARS-CoV-2 y SARS-CoV. El desarrollo y la validación del ensayo de la prueba de neutralización del virus sustituto de nuestro grupo fue reportado previamente<sup>20</sup> y el detalle de los protocolos se proporciona en el apéndice (p 2). Brevemente, una medición bioquímica de las cantidades de anticuerpos neutralizantes presentes en los sueros de prueba se realizó por inhibición por ELISA, mediante el cual los sueros de prueba se preincubaron primero con el dominio de unión al receptor de SARS-CoV-2 o SARS-CoV unido a una peroxidasa de rábano picante, luego se agregó a placas cubiertas por ECA2. La avides total de la IgG fue determinada mediante ELISA en presencia y ausencia de urea (consulte el apéndice p 2 para obtener más detalles).

## **Inmunoensayos basados en microperlas múltiples**

Las muestras de plasma se trataron una mezcla de Triton X-100 al 1%, un solvente-detergente usado para la inactivación viral.<sup>21</sup> Los niveles de los mediadores inmunes en plasma de los pacientes con COVID-19, 30 y 180 días después del inicio de los síntomas se midieron con el ensayo Luminex utilizando la prueba de citocina / quimiocina / factor de crecimiento 45-plex humano ProcartaPlex Panel 1 (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, Estados Unidos; consulte el apéndice págs. 2–3 para obtener información detallada sobre el método).

## **Análisis de células T específicas del SARS-CoV-2**

Las células T específicas de SARS-CoV-2 se testearon como se describe anteriormente.<sup>6</sup> Brevemente, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica y se analizaron directamente mediante el ensayo IFN- $\gamma$ -ELISpot para reactividad a seis grupos de péptidos de SARS-CoV-2 de 15-mers (apéndice págs. 15-19) que cubren la nucleoproteína (NP-1, NP-2), la proteína de membrana (M), el marco de lectura abierto (ORF) 3a, ORF7 y ORF8 combinado, y un grupo de 55 péptidos que cubren la mayoría de las regiones inmunogénicas de pico (S).

## **Procesamiento de datos, bioinformática y análisis estadístico**

El procesamiento y análisis de datos se realizó en R (versión 4.0.2) con el paquete tidyverse (versión 1.3.0). Las variables se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis o prueba de rango con signo de Wilcoxon, como se indica y las variables categóricas se compararon mediante la prueba exacta de Fisher o prueba de rango con signo de Wilcoxon, según corresponda. Todas las pruebas fueron a dos colas, y una  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa. Se generaron gráficos de dispersión y mapas de calor usando GraphPad Prism versión 8 o el paquete ggplot2 en R (versión 3.3.2). Se aplicaron modelos lineales generalizados en diferentes configuraciones (Gaussiano, Poisson, Gamma y Gaussiano invertido) y se compararon los diferentes grupos con el criterio de información de Akaike. Los niveles de los mediadores inmunes se escalaron entre 0 y 1 para su visualización en el mapa de calor. La predicción de la longevidad de los anticuerpos neutralizantes, se calculó como el tiempo que le llevó a los anticuerpos en la prueba de neutralización del virus sustituto, alcanzar el porcentaje de inhibición del 30%, extrayendo la intercepción para el modelado lineal generalizado (paquete R stats versión 4.0.2), durante los días posteriores a la aparición de los síntomas, y la diferencia porcentual entre la prueba de neutralización de virus sustituto y el 30%. Las muestras se agruparon juntando la longevidad de los anticuerpos neutralizantes y un árbol de decisiones realizado por rpart en R (versión 4.1-15). Se usó regresión logística con el método de reducción de sesgos de Firth (paquete logistf en R versión 1.24) para examinar la asociación entre las características clínicas y la persistencia de anticuerpos.

Se eligieron las siguientes covariables para su inclusión en el modelo multivariable, ya que fueron significativamente diferentes al comparar el grupo de anticuerpos persistentes versus los otros tres grupos: grupo de edad (<45 años, 45-64 años o  $\geq 65$  años), sexo (hombre frente a mujer), grupo índice de comorbilidad de Charlson (0 vs  $\geq 1$ ), hipertensión (presente versus ausente) y la gravedad de la infección (leve, moderada o grave).

Se utilizó una regresión logística ordinal multivariante para examinar la asociación entre las mismas covariables y el grupo serológico (resultado ordenado de 1 = negativo, 2 = disminución rápida, 3 = disminución lenta y 4 = persistente). La suposición proporcional de probabilidades se examinó mediante la prueba de Brant.

### **Papel de la fuente de financiación**

Los patrocinadores del estudio no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, recopilación de datos, análisis de datos, interpretación de datos o en la redacción del informe.

## **Resultados**

---

Se invitaron a 517 pacientes para participar en el estudio, de los cuales 288 dieron su consentimiento para el seguimiento ambulatorio y recogida de muestras de sangre seriadas. 164 pacientes fueron seguidos y se tomaron muestras de sangre para analizar, con un total de 546 muestras de suero recolectadas (apéndice págs. 7-12) durante el tratamiento en el hospital y después del alta, hasta 180 días después de la aparición de los síntomas. El desglose del número de muestras en cada punto de tiempo fue el siguiente: 64 muestras a los 14 días posteriores al inicio de síntomas, 39 muestras a los 21 días posteriores al inicio de los síntomas, 127 muestras a los 28 días posteriores al inicio de los síntomas, 30 muestras a los 60 días posteriores al inicio de los síntomas, 158 muestras a los 90 días después de la aparición de los síntomas y 128 muestras a los 180 días del inicio de síntomas. 42 (26%) de 164 pacientes eran mujeres, y la mediana de edad fue de 44 años (IQR 34,5–56; rango 21-74). 72 (44%) de 164 pacientes tenían al menos una comorbilidad, 47 (29%) tenían hipertensión y 27 (16%) tenía diabetes. 34 (21%) de 164 pacientes estaban asintomáticos en la presentación. Ningún paciente tenía un historial documentado de infección previa por SARS.

Basado en la pendiente de la recta de regresión y si las muestras cruzaron el umbral de significancia de l 30% de inhibición (**figura 1A**), identificamos cinco patrones distintivos en la dinámica de anticuerpos neutralizantes de la siguiente manera: negativos, que son individuos que, en nuestros intervalos de muestreo, no desarrollaron anticuerpos neutralizantes al 30% del nivel de inhibición (19 [12%] de 164 pacientes); menguante rápido, que son los individuos que tenían diferentes niveles de anticuerpos neutralizantes tempranos (alrededor de 20 días después de la aparición de los síntomas), pero que serorevertieron en menos de 180 días luego del inicio de síntomas, con el grupo menguante rápido mostrando casi todas las muestras con menos del 20% de inhibición, el grupo de disminución lenta al 40% de inhibición o más, y el grupo persistente al 80% de inhibición o más.

El quinto grupo, el grupo de respuesta tardía, mostró un aumento inusual de anticuerpos neutralizantes durante el período de convalecencia. El mecanismo y la importancia de este hallazgo no está claro. Dos [67%] de tres pacientes en este grupo tuvieron neumonía en el hospital, pero ninguno requirió oxígeno y uno fue tratado con remdesivir. Desde el alta hospitalaria, dos (67%) pacientes en este grupo de respuesta retardada no informaron ninguna enfermedad febril o infección respiratoria aguda, y un paciente (33%) informó 3 episodios de la exacerbación del asma. Ninguno de los pacientes del grupo de respuesta retardada informó exposición a pacientes conocidos con COVID-19 o trabajadores migrantes, que comprendían a la mayoría de los pacientes con COVID-19 en Singapur. Como el número de muestra es muy pequeño (tres pacientes), estos individuos fueron excluidos de un análisis adicional en el estudio actual y serán objeto de seguimiento en estudios futuros si, encontramos más muestras en esta categoría.

La maduración de la IgG (es decir, el aumento de la avidéz) puede influir en nuestras observaciones. Todas las muestras fueron sometidas a pruebas de avidéz, y los datos revelaron tres hallazgos importantes (**figura 1C**). Primero, los niveles de avidéz de los anticuerpos IgG versus el dominio de unión al receptor (RBD) se relacionan con los niveles y tasas decrecientes de anticuerpos neutralizantes en todos los grupos de pacientes. En segundo lugar, para los grupos negativos, de disminución rápida y de disminución lenta, hubo una correspondiente cinética bifásica para el cambio de avidéz, con un aumento más rápido en la primera fase (desde los días 15 a 30 posteriores al inicio de los síntomas), que la segunda fase (de los días 31 a 180 posteriores al comienzo de síntomas). En tercer lugar, para el grupo persistente, la avidéz alcanzó un nivel alto muy temprano (15 a 30 días después de la aparición de los síntomas) y mostró un cambio bifásico menos obvio.

Para investigar si los niveles de citocinas se correlacionan con los patrones de disminución de los anticuerpos en los pacientes con COVID-19, perfilamos las concentraciones de citocinas y quimiocinas en el plasma a los 30 días y a los 180 días del inicio de los síntomas (apéndice pág. 5). En la convalecencia tardía, 180 días después del inicio de los síntomas, los niveles más altos de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-12p70 y IL-17A), de quimiocina proinflamatoria (IP-10) y de factores de crecimiento (factor de crecimiento humano) se observaron en el grupo persistente en comparación con todos los demás grupos. Este resultado contrasta con los pacientes del grupo negativo, con concentraciones más bajas de IFN- $\gamma$  y citoquinas proinflamatorias, IL-12p70 e IL-17A a los 180 días posteriores al inicio de los síntomas, en comparación con todos los demás grupos. No hubo diferencia en los niveles de IL-6 en los diferentes grupos (datos no mostrados).

Para un subconjunto de 23 muestras seleccionadas al azar de cada grupo en el día 180, probamos si las células T eran reactivas a péptidos de proteínas S, M, NP, ORF3a y ORF7 / 8 para investigar si hubo una correlación entre la inmunidad mediada por células T y las diferentes cinéticas de anticuerpos. Hicimos dos observaciones (apéndice p 6). Primero, todos los pacientes en cada grupo mantuvieron sustanciales respuestas de células T específicas a los 180 días luego del inicio de síntomas, y la respuesta de las células T fue multiespecífica, con la mayoría de los donantes teniendo células T reactivas a NP, M y S. En segundo lugar, no hubo una diferencia clara en la inmunidad de células T entre los grupos, en consonancia con los hallazgos anteriores.<sup>6,22</sup>

Encontramos diferencias significativas en cuanto a edad, presencia de comorbilidades, síntomas basales, investigaciones, y resultados clínicos al comparar los cuatro grupos entre sí y al grupo de anticuerpos persistentes con los otros tres grupos con anticuerpos menguantes o ausentes (**tabla 1**). Observamos una clara progresión escalonada del grupo negativo al grupo persistente, en el que los pacientes con anticuerpos persistentes eran mayores y tenían más comorbilidades, incluyendo hipertensión y diabetes mellitus.

Las diferencias demográficas que observamos fueron probablemente relacionadas con una mayor gravedad de la enfermedad, ya que los pacientes en el grupo de anticuerpos persistentes tuvieron peores resultados clínicos, incluyendo neumonía, requerimiento de oxígeno suplementario, ingreso a la unidad de cuidados intensivos y requerimiento de ventilación mecánica.

Los síntomas y las investigaciones iniciales reflejaron que este aumento de la gravedad de la enfermedad, con una mayor proporción de pacientes con fiebre, tos, disnea, recuento de linfocitos reducidos, aumento de proteína C reactiva y aumento de la enzima lactato deshidrogenasa en el grupo persistente. Observamos una mayor proporción de individuos asintomáticos en el grupo negativo (11 [58%] de 19 pacientes) en comparación con el grupo persistente (tres [6%] de 52 pacientes).

Los datos de la carga viral, en forma de resultados cuantitativos de PCR, estaban disponibles para 70 pacientes y, en este subgrupo, los valores del umbral de ciclo de la PCR del hisopado nasofaríngeo al ingreso, no se asociaron con las respuestas de anticuerpos (datos no mostrados), aunque existen limitaciones a estos datos a medida que variaban los tipos de muestra (por ejemplo, hisopados nasofaríngeo, orofaríngeo o esputo).

En el modelo multivariable que incorporó edad, sexo, y presencia de comorbilidades, solo la gravedad de la enfermedad estuvo asociada de forma independiente con niveles persistentes de anticuerpos, con una razón de posibilidades ajustada de 5,20 (95% CI 1,83–16,7) para la gravedad de la enfermedad moderada y 30,3 (10,0–107,9) para la enfermedad severa, ambas comparadas con pacientes con enfermedad leve (**tabla 2**).

La longevidad de los anticuerpos neutralizantes (en días) fue calculado por la pendiente y la intersección del modelado lineal de los diferentes grupos e individuos. Se aplicaron modelos lineales generales en diferentes entornos y áreas bajo la curva, para los diferentes grupos comparados.

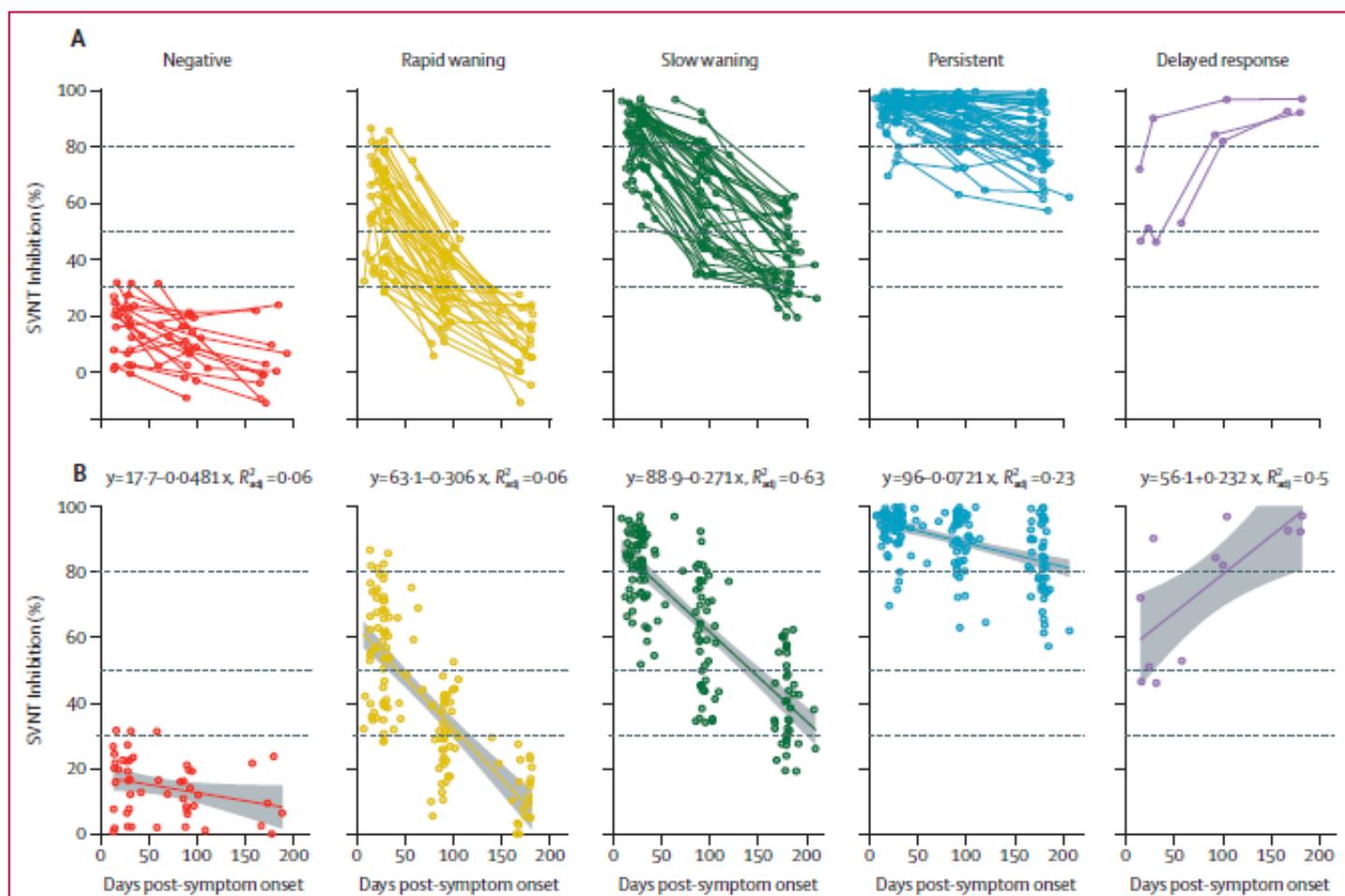
La distribución gaussiana tuvo el criterio de información de Akaike más bajo en todos los grupos a excepción de las muestras negativas, pero ese grupo no se utilizó para la predicción de la longevidad (datos no mostrados). La mediana de días positivos para anticuerpos los neutralizantes para los grupos rápido menguante, lento menguante y persistente fueron de 96 días, 201 días y 580 días, respectivamente. (**figura 2A**;apéndice págs. 7-12). Los días individuales con anticuerpos neutralizantes positivos dentro de cada grupo tuvieron una variación sustancial. El grupo persistente tuvo la mayor variación de longevidad, con una predicción de la duración mínima de los anticuerpos neutralizantes de 326 días y

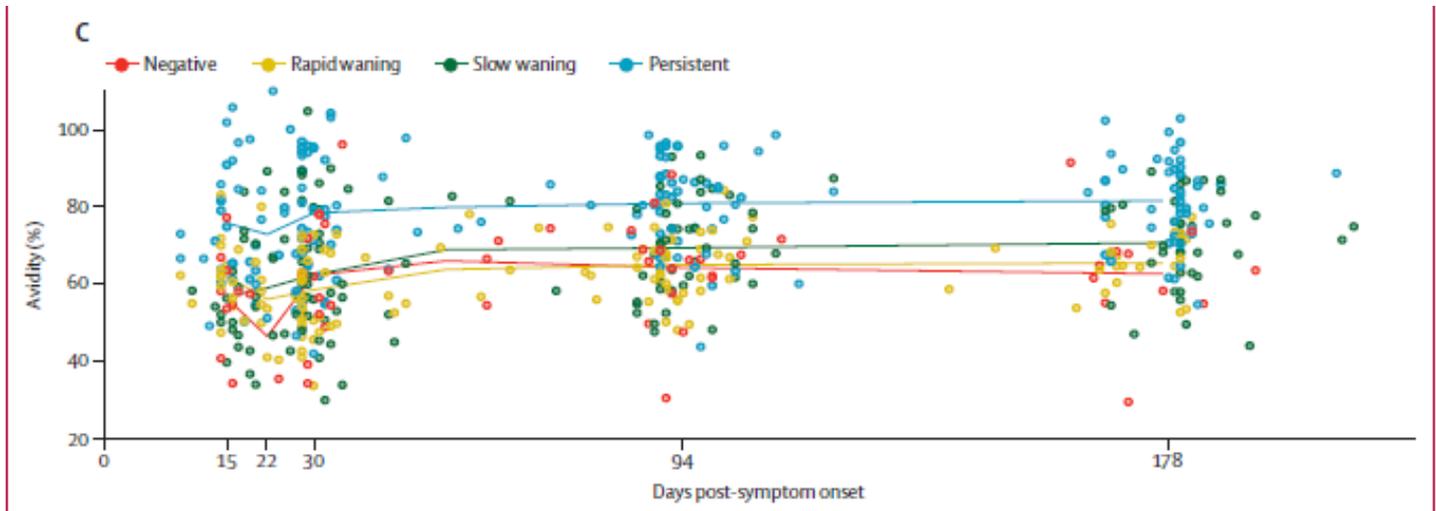
máxima de más de 14.881 días. 56 pacientes estuvieron disponibles durante 270 días después de la aparición de los síntomas, y fueron utilizado para probar la correlación de los modelos y los datos reales.

Los datos de 270 días pronosticados y reales tenían una correlación de Pearson de 0,84, mostrando robustez y validando nuestro algoritmo de predicción de longevidad de los anticuerpos neutralizantes (**figura 2B**).

Observamos que algunos pacientes en los grupos persistentes y de respuesta retardada tenían niveles crecientes de anticuerpos muchos meses después de que se recuperaron de la enfermedad aguda. Este aumento afectó nuestro modelo de predicción para estos pacientes, ya que el modelo se desarrolló para una línea de tendencia, lo que resulta en la predicción infinita de la longevidad de los anticuerpos (más de medio millón de días).

Ampliamos el estudio de cohorte a un total de 20 supervivientes del SARS, reclutados 17 años después de la recuperación de la enfermedad (apéndice p 13). 90% de las personas citadas mostraron en la prueba de neutralización de virus sustituto un porcentaje de inhibición del 30% o más. Este patrón decreciente de la dinámica de los anticuerpos neutralizantes es similar al predicho para el grupo persistente de los pacientes que se recuperaron de SARS-CoV-2.





**Figure 1: Longitudinal dynamics of neutralising antibodies**

(A) Neutralising antibody level, measured by percentage inhibition of sVNT readings. (B) Linear regression model of each grouping for neutralising antibody level. Dashed lines represents 30%, 50%, and 80% of sVNT percentage inhibition. (C) Group mean of IgG avidity percentage is connected at days 14, 21, 30, 90 and 180. Since each patient blood sample was taken at a different timepoint in practice, we marked the mean days post-symptom onset of the samples within the same group but the definition of the time groups remains 14, 21, 30, 90, and 180 days post-symptom onset. Each point represents a single patient. sVNT=surrogate virus neutralisation test.

	Persistent (n=52)*	Slow waning (n=46)	Rapid waning (n=44)	Negative (n=19)	p value†	p value‡
<b>Patient characteristics</b>						
Age, years	52 (43-60.5)	44 (33-55)	25.5 (27-48.5)	42 (37-52)	0.0001	0.0001
Sex					0.76	0.70
Female	14 (27%)	13 (28%)	10 (23%)	3 (16%)	--	--
Male	38 (73%)	33 (72%)	34 (77%)	16 (84%)	--	--
Ethnicity	--	--	--	--	0.020	0.065
Chinese	31 (60%)	27 (59%)	19 (43%)	4 (21%)	--	--
Malay	7 (13%)	2 (4%)	5 (11%)	0	--	--
South Asian (Indian or Bangladeshi)	9 (17%)	11 (24%)	14 (32%)	11 (58%)	--	--
Other	5 (10%)	6 (13%)	6 (14%)	4 (21%)	--	--
Charlson comorbidity index	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.032	0.012
Any comorbidity	29 (56%)	18 (39%)	15 (34%)	7 (37%)	0.15	0.027
Diabetes	17 (33%)	6 (13%)	3 (7%)	1 (5%)	0.0030	0.0005
Hypertension	22 (42%)	12 (26%)	8 (18%)	3 (16%)	0.037	0.0081

### Baseline symptoms

Duration of symptoms, days (n=158)						
n	50	46	44	18	--	--
Median (IQR)	4 (2-7)	2 (1-5)	2 (0-6)	0 (0-3)	0.0008	0.0006
Fever (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	39 (78%)	34 (74%)	18 (41%)	5 (26%)	<0.0001	0.0028
Cough (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	34 (68%)	25 (54%)	22 (50%)	5 (26%)	0.017	0.025
Dyspnoea (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	11 (22%)	3 (7%)	1 (2%)	1 (5%)	0.011	0.0014
Sore throat (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	18 (36%)	15 (33%)	19 (43%)	3 (16%)	0.21	0.86
Rhinorrhoea (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	13 (26%)	9 (20%)	13 (30%)	3 (16%)	0.60	0.69
Asymptomatic (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
n (%)	3 (6%)	7 (15%)	13 (30%)	11 (58%)	<0.0001	0.0008

(Table 1 continues on next page)

Persistent (n=52)\*    Slow waning (n=46)    Rapid waning (n=44)    Negative (n=19)    p value†    p value‡

(Continued from previous page)

### Baseline investigations

White blood count, $\times 10^9/L$ (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
Median (IQR)	5.40 (4.10-6.70)	5.15 (4.50-6.90)	6.35 (4.65-8.45)	7.20 (4.60-9.90)	0.079	0.19
Neutrophil count, $\times 10^9/L$ (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
Median (IQR)	3.84 (2.62-5.40)	3.63 (2.40-4.73)	3.78 (2.51-5.12)	4.14 (3.01-5.68)	0.77	0.95
Lymphocyte count, $\times 10^9/L$ (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
Median (IQR)	1.08 (0.79-1.44)	1.13 (0.85-1.58)	1.79 (1.22-2.56)	1.73 (1.58-2.34)	0.0001	0.0004
C-reactive protein, mg/L (n=153)						
n	49	44	42	18	--	--
Median (IQR)	50.3 (13.0-76.6)	9.85 (1.8-50.7)	3.3 (1.4-7.6)	1.85 (1.2-4.1)	0.0001	0.0001
Lactate dehydrogenase, U/L (n=148)						
n	47	41	41	19	--	--
Median (IQR)	589 (409-721)	423 (364-538)	362 (314-421)	374 (319-439)	0.0001	0.0001
Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ ) (n=159)						
n	50	46	44	19	--	--
Median (IQR)	79.5 (61-87)	73 (62-83)	72 (62-87)	71 (64-81)	0.70	0.26

### Outcomes

Pneumonia	47 (90%)	28 (61%)	12 (27%)	1 (5%)	<0.0001	<0.0001
Supplemental oxygen requirement	33 (63%)	9 (20%)	2 (5%)	0	<0.0001	<0.0001
Intensive care unit admission	21 (40%)	5 (11%)	1 (2%)	0	<0.0001	<0.0001
Mechanical ventilation	8 (15%)	0	0	0	0.0008	<0.0001

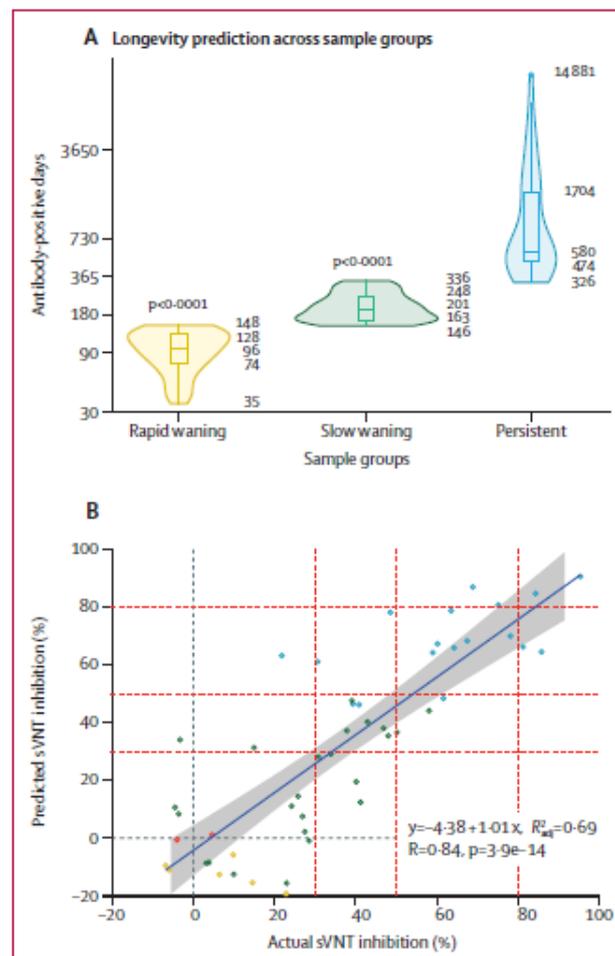
Data are median (IQR) or n (%). Categorical variables represented as number (percentage) and compared using Fisher's exact test. Continuous variables represented as median (Interquartile range) and compared using Kruskal-Wallis test. \*Two of 52 patients had missing data for baseline symptoms and baseline investigations; the rest of the data (demographics, medical history, and clinical outcomes) were complete. †Comparing all four groups independently. ‡Persistent antibody group versus all other three groups (slow waning, rapid waning, and negative).

**Table 1: Demographic and clinical characteristics of patients, grouped by antibody dynamics**

	Univariable model (persistence)*		Multivariable model (persistence)*		Ordinal multivariable logistic regression model†	
	OR (95% CI)	p value	Adjusted OR (95% CI)	p value	Adjusted OR (95% CI)	p value
<b>Age group, years</b>						
<45	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)
45-65	3.19 (1.55-6.76)	0.0015	1.81 (0.72-4.58)	0.21	1.38 (0.68-2.80)	0.37
>65	16.8 (4.23-94.9)	<0.0001	5.37 (0.90-41.7)	0.065	3.18 (0.61-25.2)	0.20
Female sex	1.19 (0.55-2.48)	0.65	1.84 (0.68-5.1)	0.23	2.28 (1.08-4.92)	0.032
Charlson comorbidity index score ≥1	2.51 (1.23-5.15)	0.012	0.92 (0.27-2.91)	0.89	1.26 (0.53-3.03)	0.60
Hypertension	2.72 (1.34-5.56)	0.0059	0.90 (0.26-2.98)	0.86	0.73 (0.29-1.82)	0.50
<b>Severity</b>						
Mild (no pneumonia)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)	1 (ref)
Moderate (pneumonia, no supplemental O <sub>2</sub> )	5.73 (2.06-18.1)	0.0007	5.20 (1.83-16.7)	0.0017	6.45 (2.98-14.48)	<0.0001
Severe (supplemental O <sub>2</sub> or intensive care unit admission)	39.7 (14.0-132.8)	<0.0001	30.3 (10.0-107.9)	<0.0001	51.1 (18.5-154.4)	<0.0001

OR=odds ratio. \*Firth logistic regression. †Ordinal logistic regression. The proportional odds assumption was examined with Brant test: parallel regression assumptions hold for individual variables and the overall model (p=0.99).

**Table 2: Logistic regression analysis of predictors of persistent antibody trend (n=161)**



**Figure 2: Prediction of neutralising antibody longevity using linear regression modelling for different groups**  
 (A) Violin plots and box plots showing neutralising antibody positive days. p-value was calculated by Wilcoxon signed-rank test with the persistent group as the reference. For each group, the 0th, 25th, 50th, 75th, and 100th percentile are marked. (B) Correlation of predicted sVNT inhibition percentage compared with actual sVNT inhibition percentage for a subset of the returning cohort at 270 days post-symptom onset. sVNT=surrogate virus neutralisation test.

## Discusión

---

Estudios publicados anteriormente indicaron que los anticuerpos S-específico disminuyeron más lentamente que los anticuerpos N-específicos,<sup>16,20</sup> y que el nivel de anticuerpos neutralizantes podría ser un indicador importante de protección.<sup>5,7</sup> En este estudio longitudinal de 180 días de la dinámica anticuerpos SARS-CoV-2, nos centramos específicamente en la neutralización funcional de los anticuerpos utilizando una plataforma de ensayo de prueba de neutralización de virus sustituto, que tiene una excelente concordancia con las pruebas de neutralización de virus vivos y que se ha aplicado con éxito en múltiples estudios de diferentes países.<sup>6,7,20,23</sup> La prueba de neutralización de virus sustituto ofrece ventajas a nivel operativo, para procesar un gran número de muestras, y cuando se requiere repetir las pruebas, como fue el caso de este estudio.

Nuestro estudio cubrió un período de 180 días después de la infección, con un subconjunto de muestras extendido a 270 días. El período extendido de tiempo y muestreos múltiples para muchos de los individuos en el estudio nos permitió tener una información más confiable y realizar una disección en profundidad de la naturaleza multifacética de la dinámica de los anticuerpos neutralizantes. En contraste estudios publicados anteriormente,<sup>14,15,17,18</sup> que generalmente se centraron en la desintegración de los anticuerpos entre diferentes cohortes y en diferentes regiones geográficas, mostramos la diversidad de la dinámica de los anticuerpos de neutralización en cinco patrones distintivos.

Estos patrones se diferenciaron en el nivel máximo de anticuerpos de neutralización, la velocidad de desintegración y los procesos de maduración de la avidéz de la IgG y los perfiles inmunomoduladores.

La longevidad de los anticuerpos neutralizantes se asoció con niveles sostenidos de citocinas inflamatorias hasta al menos 180 días después del inicio de los síntomas en los pacientes que se habían recuperado del COVID-19. Los pacientes en el grupo persistente mantuvieron altas concentraciones sistémicas de citocinas proinflamatorias, incluso a los 6 meses después del comienzo de síntomas. Este medio de citocinas proinflamatorias se ha demostrado que se correlaciona fuertemente con los niveles de anticuerpos en el COVID-19.<sup>24</sup> El IFN- $\gamma$  proinflamatorio,<sup>25</sup> la IL-12,<sup>26</sup> y se ha indicado que la IL-17<sup>27</sup> desempeña un papel en el desarrollo de las células B. En este contexto, es interesante notar que no hubo diferencia significativa en los niveles de IL-6 en los diferentes grupos, aunque se ha demostrado que la IL-6 es importante para la producción de IgG.<sup>28</sup> Por el contrario, las respuestas de las células T parecen no tener una correlación clara con los diferentes patrones de la dinámica de los anticuerpos neutralizantes.

Los pacientes de todos los grupos, incluido el grupo negativo, mostraron una inmunidad sostenida de células T, 6 meses después de la infección. Estos datos indican que el ambiente proinflamatorio durante la convalecencia tardía ( $\geq 90$  días después del inicio de los síntomas) podría ser importante para mantener a largo plazo los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos de COVID-19.

En cuanto a los parámetros clínicos, el grupo persistente tuvo la correlación más fuerte con la gravedad de la enfermedad, consistente con hallazgos previos de una correlación entre el nivel de anticuerpos neutralizantes y la gravedad de la enfermedad, en el pico del anticuerpo neutralizante. Mayor gravedad de la enfermedad se asoció de forma independiente con niveles persistentes de anticuerpos neutralizantes, y los pacientes con enfermedad más leve, tuvieron una disminución más rápida de los anticuerpos neutralizantes. Este hallazgo podría tener implicaciones sustanciales en términos de la inmunidad a nivel de la población o de grupo, especialmente si está en curso una mutación viral que atenúe la virulencia del SARS-CoV-2, con una consiguiente reducción de la proporción de pacientes con enfermedad severa. Los individuos asintomáticos parecen tener niveles más bajos de seroconversión o persistencia de anticuerpos,<sup>29</sup> aunque esto necesita más investigaciones, en estudios de grandes cohortes.

Modelando la tasa de disminución de anticuerpos neutralizantes en los diferentes grupos, pudimos establecer modelos predictivos para estimar la longevidad de las respuestas en los individuos que mostraron diferentes tasas de caída de los niveles de anticuerpos neutralizantes. La tasa de disminución sugiere que es probable la reinfección durante la segunda y posterior oleada, lo que limita la viabilidad de una estrategia de inmunidad colectiva antes de que exista vacuna eficaz.<sup>30</sup>

Suponiendo tasas similares de disminución después de la vacunación, es probable que la administración anual sea necesaria para prevenir grandes brotes a medida que disminuye la inmunidad de la población.

Sin embargo, contrariamente a algunos estudios publicados anteriormente sugiriendo una corta vida útil de los anticuerpos SARS-CoV-2 RBD específicos, demostramos que los anticuerpos neutralizantes podrían persistir durante muchos años en algunos pacientes que se han recuperado de COVID-19. Aunque tales predicciones solo se pueden confirmar en los próximos 5 a 10 años, creemos que nuestras predicciones no son irreales considerando que los pacientes infectados con SARS-CoV-2 mostraron una larga duración de los anticuerpos neutralizantes, 17 años después de la infección, también observada en nuestros estudios previos<sup>13,31</sup>. Como la mayoría de los pacientes con SARS desarrollaron una enfermedad grave, no es de extrañar que el patrón de disminución de los anticuerpos neutralizantes esté más alineado con el grupo persistente de pacientes que se recuperaron del SARS-CoV-2.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Este fue un estudio de cohorte observacional, y aunque los individuos inscriptos en el estudio eran representativos de la comunidad durante la pandemia en Singapur, puede haber condiciones de los huéspedes o ambientales en otras poblaciones que afecten las respuestas inmunes, que no podemos explicar.

Las muestras más grandes disponibles en esta cohorte fueron para individuos de etnia china, y dado que hay diferencias en los resultados y la progresión de la enfermedad en los diferentes grupos étnicos observados en algunos países, los resultados de este estudio pueden ser solo generalizables al pueblo chino. La mediana de edad de la cohorte fue 44 años; por lo tanto, los resultados pueden no ser generalizables a adultos mayores o niños, que pueden tener diferentes perfiles inmunes. Inscrimos a personas con varias gravedades de la enfermedad, pero las infecciones asintomáticas fueron pocas en número, lo que limita nuestra capacidad para estudiar este importante grupo. Algunas personas se perdieron durante el seguimiento y el momento de la recogida de muestras también varió. Aunque problemas se pueden ajustar mediante el uso de modelos estadísticos para corregir el sesgo del superviviente, sin saber quién se perdió para el seguimiento de forma permanente (ya que un participante podría perderse en un punto de tiempo, pero regresar para el siguiente), esto no es factible.

En conclusión, nuestro estudio mostró que la dinámica de los anticuerpos de neutralización varía mucho entre los pacientes individuales con COVID-19, en el nivel máximo de anticuerpos y la tasa de disminución, y longevidad de los anticuerpos neutralizantes. Encontramos una asociación entre los anticuerpos neutralizantes persistentes y los síntomas clínicos graves de COVID-19, y en los niveles superiores de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. En un subconjunto de pacientes evaluados, fueron detectadas células T específicas del SARS-CoV-2 independientemente de los patrones menguantes de anticuerpos neutralizantes. Son necesarios estudios clínicos y epidemiológicos estudios de las reinfecciones entre los pacientes que se recuperaron de COVID-19 con y sin persistencia de anticuerpos de neutralización, para responder a importantes preguntas sobre la inmunidad protectora a largo plazo y el nivel de anticuerpos neutralizantes que se corresponden con la protección. En este contexto, es importante realizar grandes estudios longitudinales y de cohorte similares entre personas que han sido vacunadas, para examinar la dinámica y longevidad de la inmunidad.

## Referencias

---

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020; **395**: 470–73.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; **579**: 270–73.
3. WHO. COVID-19 situation reports. 2020. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (accessed March 3, 2021).
4. Hellerstein M. What are the roles of antibodies versus a durable, high quality T-cell response in protective immunity against SARS-CoV-2? *Vaccine X* 2020; **6**: 100076.

- 5 Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun* 2020; **11**: 4704.
- 6 Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; **584**: 457–62.
- 7 Addetia A, Crawford KHD, Dingens A, et al. Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with high attack rate. *J Clin Microbiol* 2020; **58**: e02107–20.
- 8 Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* 2020; **183**: 996–1012.
- 9 Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 2020; **588**: 315–20.
- 10 Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* 2020; **26**: 1691–93.
- 11 Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J Gen Virol* 2020; **101**: 791–97.
- 12 Cao WC, Liu W, Zhang PH, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med* 2007; **357**: 1162–63.
- 13 Anderson DE, Tan CW, Chia WN, et al. Lack of cross-neutralization by SARS patient sera towards SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 2020; **9**: 900–02

- 14 Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1085–87.
- 15 Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1724–34.
- 16 Ripberger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M, et al. Orthogonal SARS-CoV-2 serological assays enable surveillance of low-prevalence communities and reveal durable humoral immunity. *Immunity* 2020; **53**: 925–33.
- 17 Perreault J, Tremblay T, Fournier MJ, et al. Waning of SARS-CoV-2 RBD antibodies in longitudinal convalescent plasma samples within 4 months after symptom onset. *Blood* 2020; **136**: 2588–91.
- 18 Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020; **5**: eabe0367.
- 19 Young BE, Ong SWX, Ng LFP, et al. Viral dynamics and immune correlates of COVID-19 disease severity. *Clin Infect Dis* 2020; published online Aug 28. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1280>.
- 20 Tan CW, Chia WN, Qin X, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol* 2020; **38**: 1073–78.
- 21 Darnell ME, Taylor DR. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. *Transfusion* 2006; **46**: 1770–77.
- 22 Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol* 2020; **5**: eabf3698.
- 23 Perera R, Ko R, Tsang OTY, et al. Evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test for detection of antibody in human, canine, cat and hamster sera. *J Clin Microbiol* 2020; **59**: e02504–20.
- 24 Wu F, Liu M, Wang A, et al. Evaluating the association of clinical characteristics with neutralizing antibody levels in patients who have recovered from mild COVID-19 in Shanghai, China. *JAMA Intern Med* 2020; **180**: 1356–62.
- 25 Abed NS, Chace JH, Fleming AL, Cowdery JS. Interferon-gamma regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN-gamma-mediated inhibition of B cell differentiation. *Cell Immunol* 1994; **153**: 356–66.
- 26 Metzger DW. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. *Cytokine* 2010; **52**: 102–07.
- 27 Shibui A, Shimura E, Nambu A, et al. Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production. *Cytokine* 2012; **59**: 108–14.

28 Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* 2010; **115**: 4699–706.

29 Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; **26**: 1200–04.

30 Alwan NA, Burgess RA, Ashworth S, et al. Scientific consensus on the COVID-19 pandemic: we need to act now. *Lancet* 2020; **396**: e71–72.

31 Chia WN, Tan CW, Foo R, et al. Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections. *Emerg Microbes Infect* 2020; **9**: 1497–505.