



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Respuesta inmune frente a SARS-CoV-2 en sujetos con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento

Guillermo Oliva Ariza

Directores:

Prof. Julia M^a Almeida Parra

Prof. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale

TESIS DOCTORAL

Salamanca, 2023

La presente tesis doctoral incluye dos trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports (Web of Science)*, y un trabajo original sometido a revisión, según se detalla a continuación:

1. High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients

Guillermo Oliva-Ariza^{#1-3}, Blanca Fuentes-Herrero^{#1-3}, Cristina Carbonell²⁻⁴, Quentin Lecrevisse^{1-3,6}, Alba Pérez-Pons¹⁻³, Alba Torres-Valle¹⁻³, Julio Pozo¹⁻³, José Ángel Martín-Oterino²⁻⁴, Óscar González-López¹⁻³, Amparo López-Bernús²⁻⁵, Marta Bernal-Ribes^{1,3}, Moncef Belhassen-García²⁻⁵, Oihane Pérez-Escorza¹⁻³, Martín Pérez-Andrés^{1-3,6}, Lourdes Vazquez^{2,7}, Guillermo Hernández-Pérez^{3,4}, Francisco Javier García Palomo⁸, Pilar Leoz^{2,7}, Pilar Costa-Alba^{2,9}, Elena Pérez-Losada^{2,10}, Ana Yeguas^{2,7}, Miryam Santos Sánchez¹⁻³, Marta García-Blázquez⁷, F. Javier Morán-Plata¹⁻³, Daniela Damasceno^{1-3,6}, Vitor Botafogo¹⁻³, Noemí Muñoz-García¹⁻³, Rafael Fluxa¹¹, Teresa Contreras-Sanfeliciano¹², Julia Almeida^{*1-3,6}, Miguel Marcos^{*2-4}, Alberto Orfao^{*1-3,6}

#GO-A y BF-H han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor.

*JA, MM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor.

Blood, 19 de enero de 2023; 141 (3): 309–314. doi: 10.1182/blood.2022017439
Factor de impacto: 20,3 (Q1)

2. Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis

Guillermo Oliva-Ariza^{#1-3}, Blanca Fuentes-Herrero^{#1-3}, Quentin Lecrevisse^{1-3,6}, Cristina Carbonell²⁻⁴, Alba Pérez-Pons¹⁻³, Alba Torres-Valle¹⁻³, Julio Pozo¹⁻³, José Ángel Martín-Oterino²⁻⁴, Óscar González-López¹⁻³, Amparo López-Bernús²⁻⁵, Marta Bernal-Ribes^{1,3}, Moncef Belhassen-García²⁻⁵, Oihane Pérez-Escorza¹⁻³, Martín Pérez-Andrés^{1-3,6}, Lourdes Vazquez^{2,7}, Guillermo Hernández-Pérez^{3,4}, Francisco Javier García Palomo⁸, Pilar Leoz^{2,7}, Pilar Costa-Alba^{2,9}, Elena Pérez-Losada^{2,10}, Ana Yeguas^{2,7}, Miryam Santos Sánchez¹⁻³, Marta García-Blázquez⁷, F. Javier Morán-Plata¹⁻³, Daniela Damasceno^{1-3,6}, Vitor Botafogo¹⁻³, Noemí Muñoz-García¹⁻³, Rafael Fluxa¹¹, Jacques J.M. van Dongen^{1,2}, Julia Almeida^{*1-3,6}, Miguel Marcos^{*2-4}, Alberto Orfao^{*1-3,6} en representación del Consorcio ECRIN-M3

#GO-A y BF-H han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor.

*MM, JA y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor.

American Journal of Haematology, 4 de octubre de 2023; disponible versión on-line.
doi: 10.1002/ajh.27119
Factor de impacto: 12,8 (Q1)

3. Early immune cell and antibody kinetics following SARS-CoV-2 vaccination in healthy adults and low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

Guillermo Oliva-Ariza^{#1-3}, Ignacio Criado^{#1-3}, Blanca Fuentes-Herrero¹⁻³, Cristina Carbonell²⁻⁴, José Ignacio Sánchez-Gallego¹⁻³, Amparo López-Bernús²⁻⁵, María Laura Gutiérrez^{1-3,6}, Marta Bernal-Ribes^{1,3}, Quentin Lecrevisse^{1-3,6}, Jacques J.M. van Dongen^{1,2}, Miguel Marcos^{*2-4}, Julia Almeida^{*1-3,6}, Alberto Orfao^{*1-3,6} en representación del Consorcio ECRIN-M3.

#GO-A y IC han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor.

*MM, JA y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor.

Frontiers in Immunology. Manuscrito enviado.

Factor de impacto: 7,3 (Q1)

¹Programa de Investigación Clínica y Traslacional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC – Universidad de Salamanca); Servicio de Citometría, NUCLEUS, Salamanca, España.

²Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España.

³Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

⁴Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁵Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, España.

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁸Banco Nacional de ADN, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁹Servicio de Urgencias, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹⁰Servicio de Cuidados Intensivos, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹¹Cytognos SL, Salamanca, España.

¹²Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.



D. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía, y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por D. Guillermo Oliva Ariza y titulado *“RESPUESTA INMUNE FRENTE A SARS-CoV-2 EN SUJETOS CON LINFOCITOSIS B MONOCLONAL DE BAJO RECUENTO”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 8 de noviembre de 2023.

Fdo. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale

Dña. Julia M^a Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía, y Catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por D. Guillermo Oliva Ariza y titulado *“RESPUESTA INMUNE FRENTE A SARS-CoV-2 EN SUJETOS CON LINFOCITOSIS B MONOCLONAL DE BAJO RECUENTO”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 8 de noviembre de 2023.

Fdo. Julia M^a Almeida Parra

A mis padres.
A mi hermana.
A Carmen.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Linfocitosis B monoclonal (LBM)	3
1.1. Definición de LBM	3
1.2. Identificación de linfocitos B clonales en sangre periférica de sujetos con LBM	3
1.3. Clasificación de la LBM.....	4
1.3.1. Clasificación de la LBM de acuerdo con el número absoluto de linfocitos B clonales	4
1.3.2. Clasificación de la LBM según el perfil fenotípico de las células B clonales	5
1.3.3. Clasificación actual de la LBM	6
1.4. Prevalencia de la LBM ^{lo}	7
1.5. Relación ontogénica entre la LBM ^{lo} , la LBM ^{hi} y la LLC.....	12
1.5.1. Progresión de LBM ^{lo} a LBM ^{hi} y LLC	12
1.5.2. Características citogenéticas y moleculares de la LBM ^{lo} vs. LBM ^{hi} y LLC	14
1.6. Alteraciones del sistema inmune en la LBM ^{lo}	15
1.6.1. Evidencias clínicas	16
1.6.2. Evidencias epidemiológicas	17
1.6.3. Evidencias biológicas	18
2. Infección por el virus SARS-CoV-2.....	20
2.1. Características genéticas y moleculares del virus SARS-CoV-2	21
2.2. Características clínicas de la COVID-19.....	24
2.2.1. Manifestaciones clínicas de la COVID-19.....	25
2.2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de COVID-19 grave.....	26
2.2.3. Parámetros de laboratorio.....	28
2.3. Respuesta inmune frente a SARS-CoV-2	31
2.3.1. Inmunopatología de la COVID-19 grave	36
2.3.2. Cinética de los componentes del sistema inmune en SP durante la COVID-19 ..	40
2.4. Vacunación frente a SARS-CoV-2.....	46
2.4.1. Respuesta inmune en individuos vacunados frente a SARS-CoV-2	48
2.4.2. Respuesta a vacunación frente a SARS-CoV-2 en pacientes con LBM ^{hi} y LLC ..	50
Hipótesis y objetivos	53
Material, métodos y resultados	59
Artículo 1: “Elevada frecuencia de linfocitosis B monoclonal de bajo recuento en pacientes hospitalizados por COVID-19”	63
Artículo 2: “Cinética de la respuesta inmune celular y humoral en pacientes COVID-19 con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”	75
Artículo 3: “Cinética a corto plazo de las células del sistema inmune y de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 tras vacunación en adultos sanos y en sujetos con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”	95

Discusión	133
Conclusiones	157
Referencias bibliográficas.....	163
Anexo I	193

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

ACE2: enzima convertidora de la angiotensina 2 (del inglés: “*angiotensin-converting enzyme 2*”).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALT: alanina aminotransferasa.

AST: aspartato aminotransferasa.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATM: gen / proteína de la ataxia telangiectasia.

B

BCR: receptor de célula B.

BIRC3: gen / proteína baculovírica que contiene repeticiones IAP tipo 3 (del inglés: “*baculoviral IAP repeat containing 3*”).

C

CCL19: quimioquina de tipo C-C 19.

CCL21: quimioquina de tipo C-C 21.

CCR7: receptor de quimioquinas tipo C-C 6.

CD: clúster (o grupo) de diferenciación (del inglés: “*cluster of differentiation*”).

CDs: células dendríticas.

CDp: célula dendrítica plasmocitoide.

CG: centro germinal.

COVID-19: del inglés: “*coronavirus disease 2019*”.

CP: célula plasmática.

E

E: proteína de la envuelta de SARS-CoV-2.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

G

GGT: gamma-glutamilttransferasa.

H

HLA-DR: antígeno leucocitario humano isotipo DR (del inglés: “*human leukocyte antigen isotype DR*”).

HLADR-B5: gen de la cadena $\beta 5$ del antígeno leucocitario humano isotipo DR.

I

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

IGHV: región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés: "*immunoglobulin heavy chain V segment*").

IL: interleuquina.

IRF4: factor regulador del interferón 4 (del inglés: "*interferón regulatory factor 4*").

L

LBDCG: linfoma de células B difuso de células grandes.

LBM: linfocitosis B monoclonal.

LBM^{hi}: linfocitosis B monoclonal de alto recuento.

LBM^{lo}: linfocitosis B monoclonal de bajo recuento.

LCM: linfoma de células del manto.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LF: linfoma folicular.

LLC: leucemia linfática crónica.

LLCP: linfoma linfocítico de célula pequeña.

LLP: linfoma linfoplasmocítico.

LZM: linfoma de zona marginal.

M

M: proteína de la membrana de SARS-CoV-2.

MAIT: linfocitos T invariantes asociados a la mucosa (del inglés: "*mucosa-associated invariant T-cell*").

MAVS: proteínas mitocondriales de señalización antiviral (del inglés: "*mitochondrial antiviral signaling protein*").

MERS-CoV: del inglés: "*middle east respiratory syndrome coronavirus*".

MYD88: gen / proteína de la respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (del inglés: "*myeloid differentiation primary response 88*").

N

N: proteína de la nucleocápside de SARS-CoV-2.

NETosis: del inglés: "*neutrophil extracellular trap*".

NK: del inglés: "*natural killer*".

NLR: receptor tipo NOD (del inglés: "*nucleotid-binding oligomerization domain-like receptor*").

O

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: marco abierto de lectura (del inglés: “*open reading frame*”).

P

PAMP: patrones moleculares específicos de patógenos (del inglés: “*pathogen associated molecular patterns*”).

PD-1: proteína de muerte programada 1 (del inglés: “*programmed death 1*”).

PRRs: receptor de reconocimiento de patrones (del inglés: “*pattern recognition receptor*”).

R

RBD: dominio de unión al receptor (del inglés: “*receptor binding domain*”).

RLR: receptor tipo RIG-I (del inglés: “*retinoic acid-inducible gene 1-like receptor*”).

S

S: proteína *spike* de SARS-CoV-2.

SARS-CoV: del inglés: “*severe acute respiratory syndrome coronavirus*”.

SARS-CoV-2: del inglés: “*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*”.

SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo (del inglés: “*acute respiratory distress syndrome*”).

SF3B1: subunidad 1 del factor de *splicing* 3B1 (del inglés: “*splicing factor 3B1*”).

SG: supervivencia global.

sig: inmunoglobulina expresada en la superficie de la célula.

SLPC-B: síndrome linfoproliferativo crónico de células B.

SP: sangre periférica.

T

TCR: receptor de célula T.

Tfh: linfocito T colaborador folicular.

Th: linfocito T colaborador (del inglés: “*helper*”).

TIM3: inmunoglobulina de linfocitos T que contiene el dominio mucina 3 (del inglés: “*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*”).

TL: tricoleucemia.

TLR: receptor tipo *Toll* (del inglés: “*Toll-like receptor*”).

TMPRSS2: serina-proteasa transmembrana de tipo 2 (del inglés: “*transmembrane serine protease 2*”).

TNF: del inglés: “*tumor necrosis factor*”.

TP53: gen / proteína tumoral p53 (del inglés: “*tumoral protein 53*”).

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada.

U

UCI: unidad de cuidados intensivos.

INTRODUCCIÓN

1. Linfocitosis B monoclonal (LBM)

1.1. Definición de LBM

La linfocitosis B monoclonal (LBM) se define por la presencia en sangre periférica (SP) de una o varias pequeñas poblaciones de linfocitos B monoclonales, de aspecto maduro y con un fenotipo aberrante, en un número inferior a 5×10^9 células B clonales/L, en individuos aparentemente sanos, es decir, en ausencia de adenopatías, organomegalias u otros signos y/o síntomas que sugieran la presencia de un síndrome linfoproliferativo crónico de linfocitos B (SLPC-B).¹⁻³ Además, la confirmación diagnóstica exige que los linfocitos B monoclonales se detecten en SP tras al menos 3 meses desde el primer diagnóstico.¹

La LBM se identificó por primera vez en 1997 en el transcurso de un estudio epidemiológico realizado en Estados Unidos,⁴ aunque no fue hasta 2005 cuando se establecieron unos criterios bien definidos para su diagnóstico;¹ tres años después se incluyó por primera vez en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008 como categoría diagnóstica dentro de las neoplasias de células linfoides B maduras.^{3,5} En la actualidad, sabemos que la LBM es una entidad muy frecuente en la población general adulta, en la que los linfocitos B monoclonales presentan patrones fenotípicos similares a los de las células B tumorales de diversos SLPC-B, siendo lo más frecuente en los países occidentales (Europa y Estados Unidos) que presenten un fenotipo indistinguible del de la leucemia linfática crónica / linfoma linfocítico de célula pequeña (LLC/LLCP).^{1-3,6,7}

1.2. Identificación de linfocitos B clonales en sangre periférica de sujetos con LBM

El uso de técnicas de citometría de flujo multiparamétrica ha permitido la detección de pequeñas poblaciones de linfocitos B monoclonales circulantes en la SP de sujetos aparentemente sanos desde finales de los años 90. Los criterios establecidos para definir estos linfocitos B circulantes en SP como “clonales” se basan en la detección de patrones inmunofenotípicos aberrantes (similares mayoritariamente al fenotipo de la LLC/LLCP, aunque pueden encontrarse patrones similares a otros SLPC-B, los cuales se describen en el siguiente apartado), junto con una restricción en la expresión de la cadena ligera de las inmunoglobulinas (Ig) Kappa (κ) o Lambda (λ), o bien un desequilibrio en su distribución respecto a su expresión en los linfocitos B normales, es decir, con una ratio $\kappa:\lambda >3:1$ o $<0,3:1$.^{1,3} Desde que se identificó

por primera vez la LBM, las técnicas de citometría de flujo han avanzado de manera notable, alcanzando un mayor nivel de sensibilidad, debido a: i) el empleo de paneles de anticuerpos más amplios (en los primeros estudios se analizaban solo combinaciones de 2 anticuerpos en cada marcaje, mientras que en la actualidad se utilizan combinaciones de más de 10 anticuerpos), que permiten la identificación de los linfocitos B aberrantes de manera muy precisa y específica;⁸ y ii) al uso de protocolos de marcaje que aumentan la sensibilidad de la técnica, mediante los cuales es posible analizar más de 10×10^6 leucocitos/muestra),⁹ facilitando la detección en sangre de poblaciones de linfocitos B clonales de muy pequeño tamaño, incluso cuando su frecuencia en sangre es inferior a 1 linfocito B clonal/ μ L.

1.3. Clasificación de la LBM

Desde que se estableció como una entidad diagnóstica bien definida, la LBM se ha clasificado en diferentes subtipos en función de los siguientes criterios: i) el número absoluto de linfocitos B clonales circulantes; y ii) su perfil inmunofenotípico.² No obstante, en 2022 la nueva actualización de la clasificación de la OMS de las neoplasias linfoides propone una clasificación integrada de la LBM que combina ambos criterios previamente mencionados.³

1.3.1. Clasificación de la LBM de acuerdo con el número absoluto de linfocitos B clonales

En el año 2017, la OMS estableció criterios para diferenciar la LBM en dos grandes grupos, basándose en el número absoluto de linfocitos B circulantes en SP: i) LBM de “bajo recuento” (LBM^{lo}), cuando el número de células B clonales detectadas es inferior a $0,5 \times 10^9/L$; y ii) LBM de “alto recuento” (LBM^{hi}), cuando se identifican $\geq 0,5 \times 10^9$ y $< 5 \times 10^9$ células B clonales/L.^{2,10} La LBM^{lo} suele detectarse en sujetos de la población general (que tienen un recuento normal de linfocitos), con una elevada prevalencia en la población adulta. Por otro lado, la LBM^{hi} se identifica habitualmente en sujetos que generalmente ya presentan una linfocitosis absoluta en una analítica de rutina ($> 3,5 \times 10^9$ linfocitos/L), pero sin llegar a cumplir los criterios necesarios (numéricos y/o clínicos) para considerarse una LLC.^{1,2,10-12} Cabe mencionar que el punto de corte establecido para diferenciar la LBM^{lo} de la LBM^{hi} ($0,5 \times 10^9$ células B clonales/L) es un valor arbitrario, basado en la distribución del número de linfocitos B clonales circulantes en

los sujetos analizados en estudios poblacionales comparativamente con el de cohortes hospitalarias/clínicas.¹⁰

1.3.2. Clasificación de la LBM según el perfil fenotípico de las células B clonales

La LBM también puede clasificarse en tres subtipos diferentes, de acuerdo con el perfil fenotípico de los linfocitos B aberrantes circulantes: i) LBM de tipo LLC típica, ii) LBM de tipo LLC atípica y iii) LBM con fenotipo no-LLC.²

La LBM de tipo LLC típica es la más frecuente en los países occidentales (Europa y Estados Unidos) correspondiendo aproximadamente al 75% de las LBM identificadas.^{2,6,7} Los linfocitos B clonales presentan un inmunofenotipo indistinguible del de las células tumorales de la LLC/LLCP, caracterizado por la coexpresión de los marcadores de membrana CD19, CD5 y CD23, asociado a una expresión débil de CD20 y a la restricción de la cadena ligera de la Ig κ o λ del receptor de la célula B (BCR), expresada también de forma débil.^{1,2,13-15} Además de estos marcadores, las células de la LBM de tipo LLC típica presentan patrones fenotípicos similares a los de la LLC/LLCP para otras proteínas de membrana, como la expresión fuerte de CD27, CD43 y CD200, junto a la positividad débil de moléculas relacionadas con las cadenas pesadas del BCR como IgM, IgD y CD79b.¹³⁻¹⁵

La LBM de tipo LLC atípica representa aproximadamente el 5% de todas las LBM en nuestro medio y presenta un patrón inmunofenotípico similar al de la LLC/LLCP, pero con algunas diferencias. Así, este subgrupo de LBM suele presentar una expresión fuerte de marcadores como CD5, CD20 (cuya expresión es débil en la LBM tipo LLC típica) y/o de la inmunoglobulina de superficie (slg), asociado o no a la pérdida de expresión de CD23. Si bien en la mayoría de estos casos el fenotipo es similar al de la LLC atípica, en algunos casos CD5⁺ (pero que por ejemplo expresan CD20 y slg de forma intensa, en ausencia de expresión fuerte de CD200) el patrón fenotípico sería superponible al de las células tumorales del linfoma de células del manto (LCM), en cuyo caso la LBM se clasificaría en el tercer subgrupo que describimos a continuación.²

Finalmente, la LBM de tipo no-LLC (que representa el 20% del total de las LBM en países occidentales)^{2,6} engloba todas aquellas poblaciones de linfocitos B monoclonales con patrones inmunofenotípicos diferentes al de la LLC típica o atípica, siendo lo más frecuente que se trate

de células que no expresan CD5, a excepción de una pequeña proporción de casos CD5⁺ con fenotipo similar al LCM, tal como se ha referido en el párrafo anterior. A su vez, la mayor parte de las LBM de tipo no-LLC CD5⁻ presentan un fenotipo similar al de las células tumorales de un linfoma B de zona marginal (LZM), aunque también se han descrito casos con fenotipos asociados a tricoleucemia (TL), linfoma folicular (LF), linfoma B difuso de células grandes (LBDCG), linfoma linfoplasmocítico (LLP), o incluso fenotipos que no pueden asociarse a ninguna categoría concreta de neoplasia de célula B madura (LBM de tipo no-LLC “inclasificables”).^{2,16-19}

1.3.3. Clasificación actual de la LBM

En el año 2022, la OMS propuso una nueva actualización de la clasificación de las neoplasias linfoides en la que se incluye por primera vez una clasificación integrada de la LBM en la que se combinan los dos criterios utilizados anteriormente para clasificar las LBM, de manera que ahora solo se tiene en cuenta el criterio numérico en el caso de las LBM con fenotipo de LLC/LLCP. Así, actualmente la LBM se agrupa en tres categorías diagnósticas: i) LBM^{lo} o expansión de linfocitos B clonales, ii) LBM de tipo LLC/LLCP y iii) LBM de tipo no-LLC/LLCP.³

La LBM^{lo} o expansión de linfocitos B clonales se define por la presencia en SP de linfocitos B monoclonales con un fenotipo idéntico al de la LLC/LLCP en número inferior a $0,5 \times 10^9$ células B clonales/ μ L, y siempre en ausencia de otros criterios diagnósticos de SLPC-B.

La LBM tipo LLC/LLCP, correspondiente a la tradicionalmente denominada LBM^{hi}, engloba a aquellas expansiones clonales de linfocitos B con un fenotipo idéntico al de la LLC/LLCP y un recuento absoluto comprendido entre $0,5 \times 10^9$ y 5×10^9 células B clonales/ μ L, en ausencia de otros criterios diagnósticos de LLC/LLCP. En contraposición, la LBM tipo no-LLC/LLCP ahora comprende cualquier expansión monoclonal de linfocitos B con un fenotipo diferente al de la LLC/LLCP, sin evidencia de otros criterios diagnósticos de SLPC-B, independientemente del número absoluto de células clonales circulantes en sangre que presente el sujeto, siendo mayoritarias aquellas que muestran un fenotipo compatible con LZM.

1.4. Prevalencia de la LBM^o

En la actualidad, sabemos que la prevalencia de la LBM^o en la población general adulta es muy elevada, aunque varía ampliamente entre los distintos estudios publicados, entre menos del 1% y un 16% de los sujetos evaluados. Esta diferencia en la proporción de casos detectados puede deberse a varios factores derivados del diseño del estudio y que influyen de forma determinante en el cálculo de la prevalencia de la LBM, como son: i) el tipo de población analizada (población general, población hospitalaria, familiares de pacientes con LLC familiar), ii) las características de la cohorte estudiada (edad, sexo o etnia de los individuos); y iii) la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada para la detección en sangre de linfocitos B monoclonales.

Desde que en 1997 se describió por primera vez la presencia de pequeños clones de linfocitos B circulantes en individuos aparentemente sanos,^{4,20} han sido numerosos los estudios que han tratado de determinar la prevalencia de la LBM^o en la población general de diferentes áreas geográficas.^{18,21-32} Tal como hemos mencionado anteriormente, la frecuencia de LBM^o varía enormemente entre los distintos estudios referidos en la bibliografía, aun cuando se trata de poblaciones con características similares y, a priori, comparables (Tabla 1). Así, en los primeros estudios de prevalencia realizados a finales del siglo XX y principios del XXI, la detección de linfocitos B monoclonales en individuos sanos de la población general era relativamente baja, situándose entre un 0,12% y un 6,4%.^{4,20,21,25,26} Sin embargo, en los trabajos posteriores se observa un incremento significativo en la frecuencia de LBM^o, en los que el porcentaje de sujetos que presentan LBM^o oscila entre un 7,1% y un 16%.^{18,23,24,27-29,32} Este aumento en la prevalencia de LBM^o ocurre en paralelo con el desarrollo progresivo de las técnicas de citometría de flujo, y su mayor sensibilidad asociada al empleo de paneles optimizados que incluyen un mayor número de anticuerpos con capacidad de detectar números progresivamente menores de células B clonales entre una gran mayoría de otros leucocitos. Así, se calcula que de una sensibilidad inferior a 5×10^{-4} de los estudios iniciales, hoy se ha pasado a sensibilidades de hasta 2×10^{-6} .^{9,18,27}

Además de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada para la detección de pequeños clones de linfocitos B circulantes en sangre, se han identificado otros factores relacionados con las características de la población de estudio que también se asocian con una

mayor prevalencia de LBM^{lo}. Así, en prácticamente todos los trabajos en los que se realiza una estratificación por edad se observa que la frecuencia de LBM^{lo} aumenta progresivamente a medida que avanza la edad de los sujetos analizados, independientemente de la sensibilidad analítica de la técnica utilizada, siendo este hallazgo ya evidente en los primeros trabajos publicados (Tabla 1). A modo de ejemplo, en el estudio de prevalencia más reciente se describe una frecuencia de LBM del 17% en el conjunto de la población analizada -la inmensa mayoría de los casos correspondientes a LBM^{lo} (16% de la serie total)-, que aumenta significativamente con la edad, detectándose sólo en el 4% de los sujetos de entre 40 – 49 años, mientras que más del 40% de los sujetos mayores de 90 años presentaban linfocitos B clonales en sangre.²⁴ Por el contrario, la presencia de LBM^{lo} en individuos menores de 40 años resulta anecdótica, si bien es cierto que los trabajos que han investigado la prevalencia de LBM^{lo} en sujetos por debajo de esta franja de edad son escasos, y las series de estudio mucho más limitadas.^{22,26,28,30} Además de una edad más avanzada, otro factor que parece estar asociado a una mayor prevalencia de LBM^{lo} es el sexo de los sujetos, afectando en mayor proporción a hombres, si bien sólo en una minoría de los trabajos se encuentran diferencias significativas entre ambos sexos (Tabla 1).^{21,23} Estos datos que apoyan el predominio de LBM^{lo} en hombres siguen la misma tendencia que la descrita en la LLC clínicamente manifiesta, que afecta entre 1,5 y 2 veces más a hombres que a mujeres.^{33,34}

La mayor parte de los individuos con LBM^{lo} estudiados en los países occidentales presentan linfocitos B clonales con un fenotipo idéntico al de la LLC/LLCP típica (aproximadamente un 75% de los casos), tal y como se describe en los trabajos realizados en la población general de Reino Unido, Italia, España y Estados Unidos.^{21,24–29} En esta misma línea, en un estudio que se llevó a cabo sobre la población japonesa (sin mezcla racial) residente en un medio ambiente occidental (Brasil), se evidenció una prevalencia de LBM^{lo} similar (10,5%) a la descrita en los trabajos anteriores, observándose un predominio absoluto de la LBM^{lo} de tipo LLC/LLCP,²³ lo cual puede resultar sorprendente, teniendo en cuenta la baja prevalencia de LLC descrita en la población asiática.^{34–36} Por el contrario, esta distribución característica de los países occidentales en cuanto al fenotipo de las células B clonales no se reproduce en las poblaciones analizadas de otros países como Uganda, Emiratos Árabes Unidos, Eslovenia y China, en los que se observó un mayor predominio de la LBM^{lo} de tipo no-LLC, a pesar de que

la prevalencia total de LBM^o es similar a la descrita en el resto de los estudios (Tabla 1).^{30-32,37} En su conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto la influencia de la región geográfica analizada, no tanto en la prevalencia global de la LBM^o (que es similar en los distintos trabajos), sino en el fenotipo de los linfocitos B clonales detectados en los sujetos con LBM^o, lo que sugiere la existencia de otros factores relacionados con el medio ambiente en el que viven los individuos, y no factores relacionados con la etnia (como se confirma en la población de ascendencia japonesa residente en Brasil), que podrían estar influyendo de manera determinante en el fenotipo de los clones de células B de la LBM^o.

Tabla 1. Características principales de los estudios de prevalencia de LBM^o más relevantes realizados en la población general.

Estudio	Características de la población de estudio	Técnica de CMF aplicada	Prevalencia de LBM^o
Sarasua y Marti et.al. (1997) ²⁰	Residentes en zonas expuestas a residuos tóxicos vs. zonas alejadas. EEUU Edad: ≥ 45 años Tamaño de la cohorte: 1.499	Nº colores: 2 Sensibilidad: 5x10 ⁻⁴	Total: 11/1.499 (0,7%)
Rawstron et al. (2002) ²¹	Pacientes ambulatorios con valores normales del hemograma y sin enfermedad hematológica aparente. Reino Unido Edad: ≥ 40 años Tamaño de la cohorte: 910	Nº colores: 4 Sensibilidad: 5x10 ⁻⁵	Total: 41/910 (4,5%) Tipo LLC: 32/910 (3,5%) 40 – 49 años: 1,9% 50 – 59 años: 2,4% 60 – 69 años: 3,2% 70 – 79 años: 7,7% 80 – 89 años: 4,5% Ratio Hombre/Mujer: 2,1 Tipo no-LLC: 9/910 (1%)
Ghia et al. (2004) ²⁵	Pacientes ambulatorios con valores normales del hemograma y sin sospecha de enfermedad hematológica. Italia Edad: 65 - 98 años Tamaño de la cohorte: 500	Nº colores: 4 Sensibilidad: 5x10 ⁻⁵	Total: 32/500 (6,4%) Tipo LLC: 22/500 (4,4%) 65 – 74 años: 3,4% ≥ 75 años: 5,7% Ratio Hombre/Mujer: 1,2 Tipo no-LLC: 7/500 (1,4%)
Rachel et al. (2007) ²⁶	Donantes de sangre. EEUU Edad: ≥ 18 años Tamaño de la cohorte: 5.141	Nº colores: 2 Sensibilidad: 7x10 ⁻⁵	Total: 6/5141 (0,12%) < 65 años: 0,04% ≥ 65 años: 0,08% Tipo LLC: 4/5.141 (0,08%) Tipo no-LLC: 2/5.141 (0,04%)

Continuación de la Tabla 1

Estudio	Características de la población de estudio	Técnica de CMF aplicada	Prevalencia de LBM ^{lo}
Nieto et al. (2009) ^{18,27}	Población general sana con valores normales del hemograma y en ausencia de enfermedad hematológica. España Edad: ≥ 40 años Tamaño de la cohorte: 639	Nº colores: 8 Sensibilidad: 2x10 ⁻⁶	Total: 95/639 (15%) Tipo LLC: 82/639 (13%) 40 – 49 años: 5,1% 50 – 59 años: 5,3% 60 – 69 años: 18% 70 – 79 años: 22% 80 – 89 años: 27% Ratio Hombre/Mujer: 1,3 Tipo no-LLC: 13/639 (2%)
Dagklis et al. (2009) ²⁸	Donantes sanos con valores normales del hemograma. Italia Edad: 18 - 102 años Tamaño de la cohorte: 1.725	Nº colores: 5 Sensibilidad: 2x10 ⁻⁵	Total: 128/1.725 (7,4%) <40 años: 1,7% 40 – 49 años: 2,5% 50 – 59 años: 6% 60 – 69 años: 10% 70 – 79 años: 13% ≥ 80 años: 17% Ratio Hombre/Mujer: 1,8 Tipo LLC: 89/1.725 (5,2%) Tipo no-LLC: 39/1.725 (2,3%)
Shim et al. (2014) ²⁹	Donantes de sangre. EEUU Edad: ≥ 45 años Tamaño de la cohorte: 2.098	Nº colores: 6 Sensibilidad: 2x10 ⁻⁵	Total: 149/2.098 (7,1%)* 45 – 54 años: 3,9% 55 – 64 años: 8,1% ≥ 65 años: 11% Ratio Hombre/Mujer: 1,6 Tipo LLC: 124/2.098 (5,9%) Tipo no-LLC: 21/2.098 (1,2%)
Bajuk et al. (2016) ³⁰	Donantes sanos y en ausencia de enfermedad hematológica. Eslovenia Edad: 23 - 88 años Tamaño de la cohorte: 162	Nº colores: 5 Sensibilidad: 2x10 ⁻⁵	Total: 7/162 (4,3%)** < 45 años: 1,4% 45 – 59 años: 4% 60 – 74 años: 13% ≥ 75 años: 22% Ratio Hombre/Mujer: 1,7 Tipo LLC: 2/162 (1,2%) Tipo no-LLC: 5/162 (3,1%)
Aljurf et al. (2016) ³¹	Donantes sanos. Emiratos Árabes Unidos Edad: ≥ 50 años Tamaño de la cohorte: 365	Nº colores: 8 Sensibilidad: 10 ⁻⁵	Total: 21/365 (5,8%) Tipo LLC: 10/365 (2,7%) Tipo no-LLC: 11/365 (3%)
Rawstron et al. (2017) ³²	Población hospitalaria. Uganda y Reino Unido Edad: ≥ 45 años Tamaño de la cohorte: 302 de Uganda 302 de Reino Unido	Nº colores: 8 Sensibilidad: 2x10 ⁻⁵	Total: 42/302 (14%) en Uganda 25/302 (8%) en Reino Unido Tipo LLC: 3/302 (1%) en Uganda 21/302 (7%) en Reino Unido Tipo no-LLC: 41/302 (13%) en Uganda 6/302 (2%) en Reino Unido

Continuación de la Tabla 1

Estudio	Características de la población de estudio	Técnica de CMF aplicada	Prevalencia de LBM ^{lo}
Yağci et al. (2017) ²²	Donantes de sangre. Turquía Edad: 18 - 78 años Tamaño de la cohorte: 999	Nº colores: 4 Sensibilidad: 5×10^{-5}	Total: 18/999 (1,8%) < 40 años: 1,1% 40 – 60 años: 0,6% > 60 años: 0,1% Tipo LLC: 16/999 (1,6%) Tipo no-LLC: 2/999 (0,2%)
de Faria-Moss et al. (2020) ²³	Donantes sanos descendientes de japoneses. Brasil Edad: 40 - 96 años Tamaño de la cohorte: 258	Nº colores: 8 Sensibilidad: 2×10^{-6}	Total: 27/258 (10,5%) 40 – 59 años: 4% 60 – 79 años: 12% ≥ 60 años: 22% Hombre/Mujer: 2,1 Tipo LLC: 27/258 (10,5%) Tipo no-LLC: 0/258 (0%)
Slager et al. (2022) ²⁴	Pacientes reclutados en el Sistema de Atención Primaria ausencia de enfermedad hematológica. EEUU Edad: ≥ 40 años Tamaño de la cohorte: 10.139	Nº colores: 8 Sensibilidad: 2×10^{-5} (CMN)	Total: 1.712/10.139 (17%) ^{***} 40 – 49 años: 3,9% 50 – 59 años: 10% 60 – 69 años: 16% 70 – 79 años: 24% 80 – 89 años: 28% ≥ 90 años: 42% Ratio Hombre/Mujer: 1 Tipo LLC: 1.543/10.139 (15%) Tipo no-LLC: 257/10.139 (2%)

*Se incluyen tres sujetos con LBM^{hi}.

**Se incluye un sujeto con LBM^{hi}.

***Se incluyen 93 sujetos con LBM^{hi}, siendo la frecuencia real de LBM^{lo} del 16%.

La semejanza inmunofenotípica entre las células clonales de la LBM^{lo} con fenotipo de LLC/LLCP y las de la propia LLC ha conducido inevitablemente a varios intentos por establecer la relación existente entre ambas entidades. Uno de los factores que predisponen para el desarrollo de la LLC es tener un historial familiar de enfermedades hematológicas; en este sentido, es conocido el impacto de la susceptibilidad genética en casos de LLC familiar (definida por la presencia de al menos dos familiares de primer grado diagnosticados de LLC).^{34,38,39} Varios grupos han analizado la prevalencia de LBM^{lo} en familiares de primer grado de pacientes con LLC familiar, siendo la frecuencia de LBM^{lo} en este grupo de generalmente mayor que la observada en la población general, ya que oscila según los trabajos referidos en la bibliografía entre un 14% y un 22%.^{30,40–45} Por el contrario, en un estudio realizado en familiares de primer grado de pacientes con LLC esporádica, se observó una prevalencia de LBM^{lo} del 4%,⁴⁶ similar a la referida para la población general cuando se emplearon técnicas con una sensibilidad

comparable (Tabla 1). Estos hallazgos confirman la existencia de factores genéticos asociados a una mayor prevalencia de LBM^{lo} asociados a polimorfismos recurrentes en algunos genes (*FARP2*, *IRF4*, *HLADR-B5*, entre otros),⁴⁷⁻⁴⁹ aunque los mecanismos concretos mediante los cuáles surgirían los clones de linfocitos B en estos sujetos siguen sin conocerse de momento.

1.5. Relación ontogénica entre la LBM^{lo}, la LBM^{hi} y la LLC

En la actualidad, sabemos que prácticamente todas las LLC están precedidas de un estadio previo de LBM.^{50,51} En este sentido, se podría considerar a la LBM como la fase “pre-leucémica” de la LLC. No obstante, aunque a día de hoy se ha descrito ampliamente que la LBM^{hi} evoluciona a LLC, como se detalla más adelante, seguimos sin tener evidencias definitivas de progresión desde la LBM^{lo} a LLC (excepto en familiares de pacientes con LLC familiar, en los que sí se han descrito varios casos de progresión a la leucemia desde una LBM^{lo}).^{45,51} Por tanto, la respuesta a la cuestión de si la LBM^{lo} representa la etapa más temprana de la historia natural de la LLC, sigue sin conocerse (y si es el caso, también se desconoce a través de qué mecanismos o factores se favorecería la transformación), pese a las semejanzas fenotípicas y genéticas de las células clonales de la LBM^{lo}, las de la LBM^{hi} y las de la LLC, y la demostración de la presencia en sangre de pequeños clones B de tipo LLC en pacientes con LLC incluso varios años antes del diagnóstico de la leucemia.⁵⁰

1.5.1. Progresión de LBM^{lo} a LBM^{hi} y LLC

Hoy se conoce que la práctica totalidad de las LLC se desarrollan desde un estadio previo de LBM, pudiendo identificarse la presencia de linfocitos B clonales hasta 8 años antes del diagnóstico de la leucemia.^{45,50,51} Pese a tratarse de una condición indispensable para el desarrollo de la LLC, la LBM se comporta en general como una entidad estable en el tiempo, que raramente progresa, siendo la tasa de transformación anual de la LBM^{hi} a una LLC que requiere tratamiento de entre 1% y 4% al año.^{12,15,50-54} Por el contrario, no se ha descrito ningún caso de LBM^{lo} identificada en un “screening” sobre la población general que haya progresado a LLC tras un seguimiento desde el diagnóstico de la LBM^{lo} de entre 3 y 10 años.^{24,55,56} No obstante, en un estudio reciente en familiares de primer grado de pacientes con LLC familiar, Slager et al. demostraron que la transformación de LBM^{lo} a LLC puede ocurrir, con una tasa de progresión

del 1,1% al año.⁴⁵ Esto confirma la relevancia de determinados factores genéticos en la progresión desde LBM^{lo} a una LLC familiar clínicamente manifiesta.^{34,38,39} Además, existen evidencias que demuestran la progresión de LBM^{lo} a LBM^{hi} en individuos de la población general (sin asociación familiar), confirmada en uno de los 65 sujetos con LBM^{lo} (que progresó a LBM^{hi}) que se reevaluaron tras una mediana de seguimiento de 7 años, lo cual supondría una tasa anual de progresión de LBM^{lo} a LBM^{hi} de solo un 0,2%.⁵⁶ Por tanto, aunque los estudios en los que se ha evaluado la dinámica de las poblaciones de linfocitos B clonales en sujetos con LBM^{lo} son escasos,^{24,45,55,56} todos coinciden en que esta condición es muy estable a lo largo del periodo de seguimiento realizado, describiéndose cierta heterogeneidad en cuanto a la variación del tamaño del clon entre los distintos sujetos, en la mayoría de los cuales (70% de los casos) se observa un ligero aumento en el número absoluto de células clonales con el paso del tiempo, aunque aún muy alejado del umbral a partir del cual se consideraría una LBM^{hi}.^{24,56}

Una vez establecida la progresión potencial de la LBM a una LLC, resulta esencial identificar qué factores influyen en un mayor riesgo de transformación leucémica, lo cual a su vez ayudaría a predecir qué sujetos con LBM van a desarrollar una LLC que requiera tratamiento. Con este objetivo, varios estudios se han centrado en identificar las características clínicas y biológicas asociadas a un mayor riesgo de transformación desde la LBM^{hi} a LLC con necesidad de tratamiento,^{10,12,51,57-62} destacando entre ellas el tamaño clonal como el factor que mejor predice el riesgo de progresión. Además, se ha estudiado el posible impacto de variables clásicamente asociadas a un peor pronóstico en la LLC, como son el estado mutacional del receptor de célula B (BCR), concretamente de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV, del inglés: "*immunoglobulin heavy chain V segment*") (IGHV no mutado vs. mutado), la expresión de CD38 y CD49d en los linfocitos B clonales, niveles séricos elevados de β_2 -microglobulina, y la presencia y tipo de alteraciones citogenéticas, entre otros.^{12,57,60,62} No obstante, estos marcadores no ayudan a predecir el riesgo de progresión entre los sujetos con LBM^{lo},^{51,56,59} por lo que parece clave profundizar por un lado, en las características citogenéticas y moleculares de las células clonales de estos sujetos (y compararlas con las de las células tumorales de los pacientes con LBM^{hi} y LLC), y por otro lado en los factores dependientes del micromedioambiente (especialmente en el sistema inmune) y su interacción con las células B clonales.

1.5.2. Características citogenéticas y moleculares de la LBM^{lo} vs. LBM^{hi} y LLC

Numerosos estudios han descrito que en sujetos con LBM pueden encontrarse alteraciones citogenéticas típicas de la LLC.⁶³⁻⁶⁶ Mientras que la frecuencia y el tipo de alteraciones citogenéticas en la LBM^{hi} y la LLC (sobre todo las de tipo indolente) son muy similares,^{12,51,67} el porcentaje de casos con LBM^{lo} en los que las células clonales presentan alteraciones citogenéticas es significativamente menor (30-40% en la LBM^{lo} frente al 60% de las LBM^{hi} y 80% de las LLC).^{12,51,55,56,63,68,69} Además, el porcentaje de células clonales portadoras de alteraciones es también menor en la LBM^{lo} respecto a la LBM^{hi} y la LLC (50% vs. 70% y 80%, respectivamente)⁶⁸, siendo las alteraciones detectadas en la LBM^{lo} aquellas alteraciones citogenéticas asociadas a buen pronóstico en la LLC, como la del(13q14) (*D13S25*), y la trisomía del cromosoma 12.^{7,51,55,56,68} Por el contrario, las alteraciones citogenéticas asociadas a peor pronóstico en la LLC, como la del(11q) (*ATM*) y la del(17p) (*TP53*), no suelen identificarse en la LBM^{lo}.^{51,55,56,68} No obstante lo anteriormente expuesto, cabe señalar que los sujetos con LBM^{lo} van adquiriendo progresivamente estas alteraciones de buen pronóstico, que tras una mediana de seguimiento de 7 años llegan a estar presente en más de la mitad (62%) de los casos.⁵⁶

Desde el punto de vista molecular, el análisis de las secuencias de nucleótidos (y aminoácidos) del BCR ha revelado diferencias sustanciales en el perfil inmunogenético de la LBM^{lo} comparado con el de la LBM^{hi} y la LLC. Mientras que en la LBM^{hi} y la LLC (en estadio Rai 0)⁷⁰ se observa un uso preferencial de los genes IGHV4-34 e IGHV1-69,^{12,71} en la LBM^{lo} se aprecia un uso mayoritario de los genes IGHV4-59 o IGHV4-61, entre otros.^{28,68,72,73} Por otra parte, uno de los rasgos moleculares más característicos de la LLC es la existencia de una restricción en el repertorio de genes del BCR que expresan, habiéndose descrito que aproximadamente la mitad de los pacientes (sin relación alguna entre ellos) comparten secuencias prácticamente idénticas, lo que se conoce como BCRs "estereotipados".⁷⁴⁻⁷⁶ Se ha visto que la frecuencia y el tipo de BCRs estereotipados en los sujetos con LBM^{hi} es prácticamente superponible al de los pacientes con LLC en estadios tempranos de la enfermedad (relacionándose una frecuencia elevada de BCR estereotipado con un mayor tamaño clonal),⁷² mientras que en la LBM^{lo} la frecuencia de receptores estereotipados es mucho menor.^{12,71-73} Por otro lado, el análisis del estado mutacional del BCR, basado en la frecuencia de hipermutación somática del mismo, y que nos permite diferenciar entre BCR mutado y BCR no mutado (definido

por una homología de la secuencia del BCR superior al 98% respecto a las células de la línea germinal),^{77,78} ha revelado que la distribución de casos con BCR mutado vs. no mutado es similar en LBM^{lo}, LBM^{hi} y LLC en estadio Rai 0,^{51,72} con una frecuencia aproximada de casos con el BCR mutado del 75%. Sin embargo, los tres grupos muestran una distribución significativamente diferente al compararlo con una cohorte de pacientes de LLC en todos los estadios de la enfermedad, al estar este último grupo enriquecido en casos con un BCR no mutado (debido a la frecuencia más elevada de BCR no mutado entre los pacientes con LLC en estadios más avanzados de la enfermedad).⁷²

La presencia de mutaciones recurrentes en determinados genes en la LLC (como *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88* o *BIRC3*, entre otros) también se ha confirmado en fases previas a la leucemia. Así, en la LBM^{hi} se han descrito mutaciones en estos genes (sobre todo en los genes *NOTCH1* y *SF3B1*), aunque la frecuencia con la que aparecen es menor que en la LLC.^{71,79–82} A su vez, de momento no se ha identificado en la LBM^{lo} ninguna mutación en dichos genes, lo que sugiere que estas mutaciones estarían involucradas en la progresión a estadios más avanzados de la enfermedad, y por tanto se adquirirían posteriormente a la aparición de las células B clonales de la LBM^{lo}.⁸²

1.6. Alteraciones del sistema inmune en la LBM^{lo}

Los pacientes con LLC presentan diversas alteraciones del sistema inmune, que se van acentuando en los estadios más avanzados de la enfermedad, y que a su vez, se traducen en un riesgo aumentado de sufrir infecciones graves (sobre todo del tracto respiratorio y urinario), que constituyen la primera causa de morbilidad y mortalidad en la LLC.^{83,84} Desde hace años, se ha documentado que en los sujetos con LBM (tanto LBM^{lo} como LBM^{hi}) también se observa un riesgo incrementado de desarrollar infecciones que requieren hospitalización, asociado a defectos en el sistema inmune de estos individuos.^{85–87} Este hecho sugiere que las alteraciones en el sistema inmune se producen mucho antes del diagnóstico de la LLC. En lo que respecta a la LBM^{lo}, existen una serie de evidencias (clínicas, epidemiológicas y biológicas) que apoyan la hipótesis de que ya en esta fase tan temprana del espectro LBM-LLC existiría un estado de inmunodeficiencia subyacente, que a su vez podría condicionar el que los sujetos con LBM^{lo} sean más susceptibles a desarrollar infecciones graves.^{87–90}

1.6.1. Evidencias clínicas

La LBM es por definición, una condición indolente, y por tanto los sujetos afectados no presentan manifestaciones clínicas evidentes asociadas a la presencia de linfocitos B clonales circulantes en SP. No obstante, en los últimos años se ha descrito que ya en esta fase temprana de LBM^o, los sujetos portadores de clones B circulantes pueden sufrir una serie de complicaciones que implican un mayor riesgo para la salud respecto a los sujetos sanos sin LBM. Al igual que la LBM^{hi} y la LLC, la LBM^o se asocia a un mayor riesgo de sufrir infecciones graves, comparado con sujetos sanos sin LBM ajustados por edad, sexo y comorbilidades (incidencia acumulada tras 8 años de seguimiento de 18% vs. 12%, respectivamente; $p=0,004$), debido a una mayor frecuencia de infecciones del tracto respiratorio (neumonía) y sepsis.⁸⁷ Del mismo modo, la presencia de LBM^o también se ha asociado con un riesgo aumentado de desarrollar neoplasias hematológicas, especialmente linfoides, siendo la incidencia acumulada tras 10 años de seguimiento en los sujetos con LBM^o del 5,8% (vs. 1,1% en donantes sanos; $p<0,001$), y un riesgo relativo de desarrollar un tumor linfoide 4,3 veces superior al observado en los donantes sin LBM.²⁴ En esta misma línea de evidencias, en un estudio de seguimiento longitudinal, Criado et al. describieron una supervivencia global (SG) significativamente más corta en los sujetos con LBM^o respecto a sujetos sanos sin LBM de la misma área geográfica, ajustados por edad y sexo, siendo esto debido a una menor SG en mujeres.⁵⁶ Es interesante destacar que en este último estudio, las principales causas de mortalidad entre los sujetos con LBM^o fueron infecciones (del tracto respiratorio y sepsis, al igual que lo descrito posteriormente por Shanafelt et al.),⁸⁷ cáncer (tumores sólidos) y enfermedades cardiovasculares, siendo el riesgo de morir por infecciones significativamente mayor comparado con el de los sujetos sanos sin LBM (21% vs. 1,4%, respectivamente; $p\leq 0,001$).⁵⁶ A pesar de ello, en un estudio posterior realizado en una población de mayor tamaño, no se observó ninguna asociación significativa entre la LBM^o y una menor SG,²⁴ aunque hay que tener en cuenta la existencia de diferencias epidemiológicas y demográficas entre las poblaciones analizadas (en lo que respecta a su distribución por edad y sexo) en ambos estudios, donde los factores demográficos pueden estar influyendo de manera determinante en estos resultados.

Como se ha descrito para la LBM^o, los pacientes de LBM^{hi} y LLC también presentan un riesgo incrementado (y mucho mayor que el de la LBM^o) de desarrollar infecciones graves

(mayoritariamente del tracto respiratorio y urinario) y tumores secundarios (no hematológicos), siendo estas algunas de las principales causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.^{85,86} En ambos grupos, estas complicaciones clínicas se asocian a deficiencias del sistema inmune a varios niveles, que se traducen en una incapacidad de responder de manera eficiente a antígenos extraños (como patógenos o las propias células tumorales). En este contexto, las evidencias clínicas previamente descritas en la LBM^{lo}, asociadas a una mayor susceptibilidad de estos sujetos a padecer infecciones graves, sugieren que el sistema inmune ya estaría alterado desde la etapa tan temprana de LBM^{lo}.

1.6.2. Evidencias epidemiológicas

Se ha sugerido que la presencia de LBM^{lo} podría estar asociada a factores específicos del medio ambiente que pudieran favorecer la aparición de estos clones de linfocitos B.^{91,92} Esto, junto con la relación existente entre la LBM^{lo} y un riesgo incrementado de sufrir infecciones más graves, puede llevar a pensar que existirían factores relacionados con la exposición a agentes infecciosos muy concretos que influyan en la etiología de la LBM. En un estudio epidemiológico Casabonne et al. investigaron los factores de riesgo asociados a la LBM^{lo}, a partir de los datos de un amplio cuestionario epidemiológico sobre hábitos de vida y salud personal y familiar, que rellenaron los individuos incluidos en el estudio.⁹¹ Los resultados de este trabajo mostraron que los sujetos con clones B en sangre referían haber padecido infecciones más frecuentemente (en concreto neumonía, meningitis y gripe). En paralelo, estos sujetos notificaron un mayor número de enfermedades infecciosas en sus hijos y una mayor frecuencia de enfermedades respiratorias en sus hermanos.⁹¹ Estos hallazgos estarían de acuerdo con los de otro estudio en el que se describió una frecuencia más elevada de LBM^{lo} en individuos infectados por el virus de la hepatitis C.⁹² Además, Casabonne et al. también documentaron una tasa de vacunación más baja frente a agentes infecciosos como neumococo y virus de la gripe entre los sujetos con LBM^{lo} refirieron, lo que plantea la posibilidad de que la vacunación pudiera ejercer un efecto protector sobre el desarrollo de LBM^{lo}.⁹¹ No obstante, un estudio más reciente realizado en una población más numerosa, no ha encontrado ninguna asociación entre la vacunación frente a diversos patógenos o el historial previo de infecciones, y el riesgo de desarrollar LBM^{lo}.⁹³

1.6.3. Evidencias biológicas

Es bien conocido que los pacientes con LLC presentan una inmunodeficiencia, de mecanismo multifactorial y no bien conocido, que empeora a medida que progresa la enfermedad y afecta a componentes tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa.⁹⁴ En la actualidad, la información disponible acerca de los mecanismos mediante los cuales se producen estos defectos en el sistema inmune es limitada; igualmente se desconoce el momento exacto en el que aparecen estas alteraciones en el espectro de la enfermedad. La alteración inmunológica más común en la LLC es la hipogammaglobulinemia, que afecta entre 20% y 80% de los pacientes, y cuya frecuencia aumenta progresivamente con el estadio de la enfermedad.^{83,94-99} Desde hace unos años se conoce que los pacientes con LBM^{hi} también presentan un déficit global de anticuerpos séricos, aunque en estos sujetos la frecuencia y la gravedad de la hipogammaglobulinemia es menor.^{97,100,101} Sin embargo, los niveles de anticuerpos específicos frente a ciertos patógenos no siempre siguen este patrón, ni en la LBM^{hi} y ni en la LLC, habiéndose descrito un aumento progresivo en los niveles de anticuerpos específicos frente a patógenos asociados a infecciones latentes, como el virus de Epstein-Barr o el citomegalovirus, lo que podría reflejar una activación constitutiva del sistema inmune de estos pacientes frente a dichos patógenos.⁹⁷ Por el contrario, en los sujetos con LBM^{lo} no se han observado diferencias significativas al comparar los niveles de anticuerpos (ya sean totales o específicos de patógenos) con los de los sujetos sanos sin LBM.⁹⁷ Estos hallazgos confirman que las alteraciones en el sistema inmune aparecen años antes del diagnóstico de la LLC, aunque en las fases más tempranas de LBM^{lo} aún no se detectan defectos evidentes en la respuesta humoral (evaluada mediante la cuantificación en plasma de anticuerpos totales o específicos de ciertos microorganismos patógenos).

Las alteraciones previamente descritas en la respuesta mediada por anticuerpos en pacientes con LBM^{hi} y LLC son consecuencia de un defecto del compartimento celular linfóide B, que estaría limitando la producción de anticuerpos en estos pacientes.^{84,94} En este contexto, en los sujetos con LBM^{lo} se han descrito múltiples alteraciones en las diferentes poblaciones de células B, tanto en lo que a número como función se refiere, y que se acentúan en fases más avanzadas de la enfermedad. Así, los linfocitos B totales se encuentran disminuidos en los sujetos con LBM^{hi} y LLC,^{10,89} mientras que en la LBM^{lo} esto ocurre de manera más discreta,

observándose un descenso del número absoluto de linfocitos B totales sólo en hombres de entre 70 y 80 años,⁹⁰ además de una relación inversa entre el número de linfocitos B normales y el tamaño del clon B.¹⁰ Esta caída en los niveles de linfocitos B ocurre a expensas de los linfocitos B pre-centro germinal (CG), afectando tanto a las células B inmaduras como a los linfocitos B naive,^{88,89,102} haciéndose más pronunciada en estadios más avanzados de la enfermedad. Por otro lado, no se han observado diferencias significativas en los niveles de células B post-CG que han reconocido previamente a un antígeno, incluyendo tanto los linfocitos B de memoria como las células plasmáticas (CP), con la excepción de niveles más bajos de CP en los sujetos con LBM^{hi}.⁸⁹ No obstante, sí que se han descrito alteraciones en la distribución de estas últimas en función de la subclase de la inmunoglobulina expresada, aumentando estas alteraciones de manera progresiva desde LBM^{lo} a LBM^{hi} y LLC. En conjunto, estos estudios han puesto de manifiesto que los sujetos con LBM^{lo} ya tendrían una disminución en el número absoluto de CP de isotipo IgM⁺, mientras que los pacientes con LBM^{hi} tienen una reducción sistemática de todas las subclases de CP (lo cual se traduce en una disminución global del número de CP totales circulantes en SP), además de niveles más bajos de linfocitos B de memoria IgG3⁺ e IgG4⁺. En la LLC es donde se observaron las alteraciones inmunológicas más acusadas en el compartimento de CP circulantes, entre las que merece destacar cifras muy disminuidas de CP IgM⁺, IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, junto con un descenso en el número de linfocitos B de memoria IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, lo cual evidencia el deterioro progresivo de la respuesta B (humoral) conforme avanza la enfermedad.⁸⁹

Aunque las alteraciones del compartimento de los linfocitos B parecen ejercer un impacto significativo en las complicaciones asociadas a la LLC, los linfocitos T también se encuentran desregulados en estos pacientes, tanto en número como funcionalmente.^{84,94} Así, multitud de trabajos han sugerido que las alteraciones en el compartimento linfoide T contribuirían a generar un micromedioambiente tumoral específico de la LLC, que favorecería la supervivencia y la expansión de los linfocitos B clonales.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Desde hace tiempo sabemos que en la sangre de los pacientes con LLC el número absoluto de linfocitos T está incrementado, afectando este aumento tanto a las células T CD4⁺ como T CD8⁺, sobre todo a expensas de las poblaciones con fenotipo efector.^{84,103,104,106} Además, se han descrito alteraciones funcionales en los linfocitos T, como una expresión aumentada de moléculas inhibitoras (como PD-1/CD279 o CD160),¹⁰⁷ y

otras características asociadas a un fenotipo de célula “exhausta”.^{107,108} Como consecuencia de esta desregulación, los linfocitos T ven mermada su capacidad de llevar a cabo una sinapsis inmunológica eficiente con las células presentadoras de antígeno, lo cual dificulta el desarrollo de una respuesta adaptativa eficiente frente a antígenos específicos.^{84,109} Por otro lado, el repertorio de genes del receptor de célula T (TCR) está restringido en la LLC, siendo frecuente encontrar expansiones oligo/monoclonales de linfocitos T en estos pacientes.¹¹⁰ En los sujetos con LBM^{hi} se observa un perfil similar al de la LLC respecto a las alteraciones asociadas a los linfocitos T, habiéndose descrito niveles aumentados de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ asociados a expansiones clonales de linfocitos T (aunque menos frecuentes que en la LLC), lo cual ha llevado a sugerir que la restricción del repertorio del TCR podría verse influenciada por el tamaño del clon de linfocitos B.^{102,111,112} En los sujetos con LBM^{lo} también se han descrito alteraciones en los linfocitos T, ya que se ha observado un aumento en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y T CD4⁺CD8⁻ en individuos de entre 50 y 70 años⁹⁰, además de expansiones de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ grande granulares.^{55,113} Además, se ha visto que en las LBM^{lo} en las que el tamaño del clon aumenta con el tiempo, el número de linfocitos T totales (tanto T CD4⁺ como T CD8⁺) y de células NK aumenta en paralelo de manera significativa.⁵⁶ Desde el punto de vista del TCR, en la LBM^{lo} se ha descrito también la existencia de un repertorio restringido de los genes del TCR,^{112,114} y expansiones oligo/monoclonales de linfocitos T. Al igual que se ha referido para la LLC, se ha sugerido que en los sujetos con LBM^{lo}, los linfocitos T estarían incrementados y presentarían un fenotipo “exhausto” de perfil citotóxico CD8⁺CD160⁺,^{87,107} lo cual indica que en fases muy tempranas de la enfermedad ya se observarían alteraciones en la LBM^{lo}, similares (aunque mucho más leves) a las encontradas en la LLC.

2. Infección por el virus SARS-CoV-2

En diciembre de 2019 se produjo en Wuhan (China) un brote de casos de neumonía de etiología desconocida. A las pocas semanas, varios equipos chinos identificaron de manera independiente el agente causante de este síndrome respiratorio agudo,¹¹⁵⁻¹¹⁷ un nuevo coronavirus al que se denominó SARS-CoV-2 (del inglés: “*severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2*”).¹¹⁸ Poco después, la OMS designó a la enfermedad producida por el virus SARS-CoV-2 como COVID-19 (del inglés: *coronavirus disease 2019*).¹¹⁹ En pocos meses, el SARS-

CoV-2 se propagó rápidamente a nivel mundial, causando un inmenso número de contagios y fallecimientos en distintos países.^{120,121} Ante la gravedad de la situación, el 11 de marzo de 2020 la OMS declaró oficialmente el brote de COVID-19 como pandemia.¹²² A fecha de la redacción de esta tesis doctoral (22 de octubre de 2023) se han contabilizado más de 771.407.825 contagios y se han registrado más de 6.972.152 muertes causadas de manera directa por la infección.¹²³ Con el rápido desarrollo de vacunas que confieren protección inmunológica frente a la infección por SARS-CoV-2,^{124,125} añadido al hecho de que una parte importante de la población mundial adquirió inmunidad natural tras el contagio por el virus, y a la emergencia de variantes dominantes del virus (como la variante Ómicron)¹²⁶⁻¹²⁸ asociadas a formas más leves de la infección, el 5 de mayo de 2022 la OMS declaró el fin de la emergencia de salud pública a nivel internacional causada por la pandemia por SARS-CoV-2.¹²⁹

La COVID-19 debutó como una enfermedad muy heterogénea; si bien afecta principalmente al tracto respiratorio, causando la neumonía bilateral característica de esta infección,^{120,130} los pacientes presentan una amplia variedad de síntomas, habiéndose descrito desde casos con una sintomatología muy leve, e incluso asintomáticos, hasta casos que cursan con una enfermedad muy grave, que requieren apoyo en unidades de cuidados intensivos y que, en el peor de los casos, llevan a la muerte del paciente.¹³⁰ Al igual que en otras infecciones, el desarrollo de una respuesta inmune eficaz resulta esencial para el control de la enfermedad y la posterior eliminación del virus,^{131,132} asociándose los casos más graves de la enfermedad a una respuesta inmune profundamente alterada.^{131,133,134} En este contexto, la COVID-19 supuso un modelo idóneo para el estudio de la respuesta inmune en humanos frente a antígenos con los que no se ha tenido contacto previo (infección “de novo”), gracias a la gran cantidad de muestras disponibles (sobre todo en las primeras olas de la pandemia) y a la relativa facilidad en diagnosticar la enfermedad de manera rápida mediante diversos métodos de detección desarrollados de forma rápida a lo largo de los primeros meses de 2020.¹³⁵

2.1. Características genéticas y moleculares del virus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario positivo (sentido 5' – 3') clasificado dentro del género de los *Betacoronavirus*. El genoma de SARS-CoV-2 tiene una longitud de unos 30.000 pares de bases, con una secuencia que presenta una alta homología (>96%) con la de

otros coronavirus que infectan a diferentes vertebrados,^{116,136–138} lo que apoya el posible origen de SARS-CoV-2 a partir de un evento zoonótico. Este nuevo virus se ha relacionado con otros coronavirus que han afectado previamente a humanos, como SARS-CoV o MERS-CoV, con los que presenta una homología del 79% y del 50%, respectivamente.¹³⁷ El material genético de SARS-CoV-2 consta de 14 marcos abiertos de lectura (ORF) funcionales que codifican proteínas no estructurales, como la replicasa (ORF1a / ORF1b), y proteínas estructurales esenciales para el ensamblaje de la partícula viral, como la proteína *spike* (S), la proteína de la envuelta (E), la proteína de membrana (M) y de la nucleocápside (N) (Figura 1). Estas cuatro proteínas estructurales presentan un alto grado de homología con las de SARS-CoV (>90% de identidad de aminoácidos), a excepción de la proteína S, en la que se observan diferencias sustanciales, que han supuesto una ventaja evolutiva de SARS-CoV-2 respecto a sus predecesores.^{116,130,136,137} A continuación, describiremos las diferentes proteínas estructurales del virus SARS-CoV-2 y sus funciones, para comprender mejor los mecanismos asociados a la infección por este virus.

La proteína *spike* (S) es una glicoproteína transmembrana típica de los coronavirus, y que le da el nombre a esta familia de virus debido a su forma característica de corona al microscopio electrónico. La proteína S es esencial para el tropismo celular de SARS-CoV-2, ya que es la encargada de unirse a la célula diana y facilitar así la entrada del virus e infección de las células del huésped.¹³⁰ Esta proteína se encuentra anclada a la membrana del virus formando homotrímeros.^{139,140} Cada monómero está compuesto por dos subunidades funcionales: i) la subunidad S1, que reconoce y se une al receptor ACE2 (del inglés: “*angiotensin-converting enzyme 2*”) de las células del huésped; y ii) la subunidad S2, que cataliza la entrada del virus en la célula mediante la fusión de las membranas.^{139,140} A su vez, la subunidad S1 se divide en dos dominios (N-terminal y C-terminal) de los que el situado hacia la región C-terminal contiene el dominio RBD (del inglés: “*receptor binding domain*”), responsable de la unión de SARS-CoV-2 a la célula del huésped a través del receptor ACE2.^{139–141} De todas las proteínas de SARS-CoV-2, la proteína S es la menos conservada respecto a otros coronavirus previos (77% de homología de la secuencia con SARS-CoV).^{130,139} En concreto, la región RBD de SARS-CoV-2 presenta diferencias en varios residuos de aminoácidos que le confieren una mayor afinidad a la unión entre el dominio RBD y el receptor ACE2, debido a que adopta una conformación más compacta,

lo cual explicaría la mayor infectividad y transmisibilidad de SARS-CoV-2.^{140,142,143} De manera similar a otros coronavirus, SARS-CoV-2 necesita activar mecanismos de endocitosis asociados al procesamiento proteolítico de la proteína S para entrar en la célula del huésped. Así, esta proteína presenta un punto de corte entre S1 y S2 reconocido principalmente por la enzima TMPRSS2 (del inglés: “*transmembrane serine protease 2*”),¹⁴⁴ aunque en ausencia de esta pueden actuar también otras proteasas del huésped, como la furina, tripsina o catepsinas.^{145,146} TMPRSS2 se coexpresa junto al receptor ACE2 en las células del epitelio nasal, en los pulmones y en las ramificaciones bronquiales, lo que proporciona y explica el tropismo celular característico de SARS-CoV-2 en las vías respiratorias.^{147,148} Teniendo en cuenta el papel fundamental de la proteína S y en particular de la región RBD en la patogenia de la infección, la proteína S, además de ser la diana principal de los anticuerpos neutralizantes frente al virus,^{149,150} ha adquirido una gran relevancia en el desarrollo de vacunas frente a SARS-CoV-2, la mayoría de las cuales están dirigidas frente a esta proteína.^{124,125,151,152}

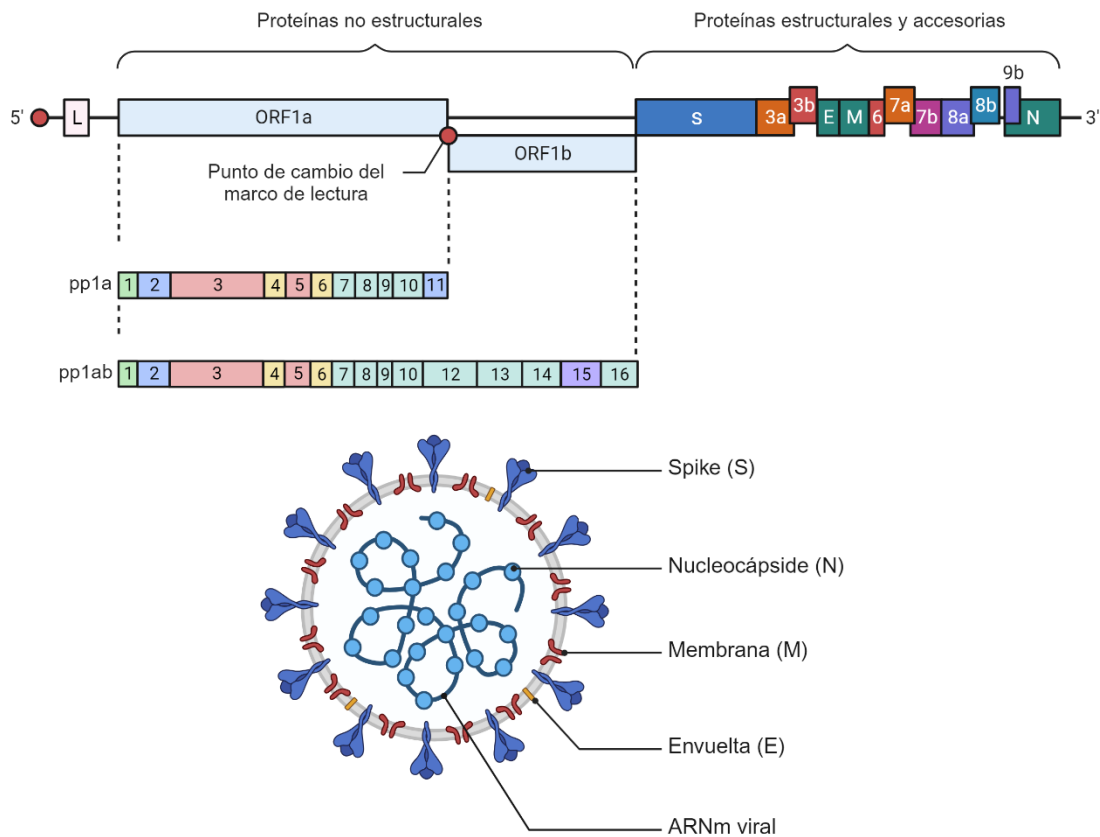


Figura 1. Estructura y organización del genoma de SARS-CoV-2. Figura adaptada de Sahu et al.¹⁵³

De todas las proteínas estructurales de SARS-CoV-2, la proteína de la envuelta (E) es la proteína más pequeña con tan solo 75 aminoácidos.^{152,154} La proteína E regula la lisis viral y la liberación del genoma del virus dentro del citosol de la célula infectada, haciendo que esta proteína pase a localizarse en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, desde donde participa en el ensamblaje de la partícula viral.^{152,155} Una vez se forma el virión, la proteína E se localiza en la envuelta del virus formando homopentámeros, que actúan como canales iónicos que parecen estar involucrados en la activación del “inflamósoma” del huésped.¹⁵⁶

La proteína de membrana (M) es la proteína estructural más abundante de SARS-CoV-2 y desempeña una función esencial en el ensamblaje y formación del virión, al interactuar consigo misma y con las otras tres proteínas estructurales.¹⁵⁷ Además, la proteína M es reconocida por el sistema inmune del huésped, e induce una respuesta inmune frente al virus. A pesar de esta gran capacidad inmunogénica, la proteína M también parece actuar como un modulador negativo de la respuesta inmune innata, al inhibir la vía de activación a través de las proteínas mitocondriales de señalización antiviral (MAVS, del inglés: “*mitochondrial antiviral signaling protein*”),^{158,159} implicadas en la activación de la respuesta inmune al promover la transcripción de los genes que codifican los interferones (IFN) antivirales de tipo I y III.^{131,160}

La proteína de la nucleocápside (N) es la única proteína estructural que se localiza dentro del virus. Su función principal es unirse al ARN del virus, protegiendo así el genoma viral y empaquetándolo mediante la formación de complejos de “ribonucleoproteínas”, indispensables para la síntesis de nuevo ARN viral.^{141,152} La proteína N interactúa con la proteína M, anclándose a la envuelta y haciendo que gran parte del ARN viral se sitúe muy cerca de la envuelta del virus. La proteína N también es una proteína muy inmunogénica, habiéndose postulado por un lado, como una posible diana para el desarrollo de vacunas y, por otra parte, como una diana especialmente útil a la hora de identificar la presencia del virus en ensayos serológicos de diagnóstico.^{124,152,161}

2.2. Características clínicas de la COVID-19

La COVID-19 se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica, tanto en la forma de presentación de los síntomas, como en su pronóstico y desenlace. Desde el inicio la pandemia, se ha constatado que un número significativo de individuos infectados no desarrollan ningún

síntoma durante el transcurso de la infección, siendo esto especialmente frecuente en niños y adultos jóvenes.^{162–164} Se estima que entre 20 – 30% de los individuos infectados por SARS-CoV-2 serían asintomáticos, aunque es difícil conocer la cifra exacta, ya que en muchos estudios no es posible diferenciar a los individuos “presintomáticos” de los realmente asintomáticos.^{165–167} Desde los estudios iniciales, es bien conocido que en los pacientes sintomáticos la forma de presentación de los síntomas es muy diversa y variable entre distintos entornos. En la inmensa mayoría de los pacientes con COVID-19, los síntomas son de carácter leve, aunque aproximadamente el 15% desarrollan una enfermedad grave que requiere de ventilación mecánica e ingreso en la UCI (unidad de cuidados intensivos); alrededor del 5% progresan a un estado muy grave/crítico, asociado una elevada tasa de mortalidad.^{120,130,164,167–173}

2.2.1. Manifestaciones clínicas de la COVID-19

Los pacientes con COVID-19 presentan una gran diversidad de signos y síntomas, que no son específicos de la enfermedad; por tanto, es necesaria la aplicación de técnicas de detección específicas del virus para el diagnóstico de la COVID-19 y así, diferenciarla de otras enfermedades infecciosas.¹³⁵ En la mayoría de los pacientes sintomáticos, el período de incubación se sitúa entre 2 y 7 días, con una media de unos 5 días y un tiempo máximo de entre 10 – 12 días tras la exposición al virus.^{164,174} Los síntomas más frecuentes asociados a la COVID-19 (al menos durante las primeras olas de la pandemia, producidas por las variantes Alfa y Beta de SARS-CoV-2)^{126–128} incluyen: fiebre, tos seca y astenia.^{164,168–172} Otros síntomas de carácter general muy recurrentes incluyen dolor de garganta/odinofagia, mialgia, rinorrea, expectoración, malestar general y disnea.^{164,167–169,171,172} Además, los pacientes suelen presentar síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y anorexia, que pueden aparecer de forma aislada, en ausencia de otra sintomatología.^{167–172,175,176} Un porcentaje significativo de pacientes también refiere síntomas neurológicos como cefalea, mareo inespecífico y especialmente, anosmia y ageusia, sobre todo en pacientes con enfermedad leve, asociada a buen pronóstico.^{177–180} Más allá de esta sintomatología típica de los pacientes con COVID-19, en varios estudios se ha descrito la afectación de otros órganos como la piel, el miocardio, el riñón, el sistema vascular o el tejido muscular que, aunque menos frecuentes, pueden derivar en complicaciones asociadas a una elevada morbi-mortalidad.^{167–169,172,181–184} Entre todos los síntomas anteriormente descritos,

adquiere especial relevancia la disnea, cuya presencia se asocia a un peor pronóstico de la infección.^{164,168,170} En pacientes con COVID-19 hospitalizados, la disnea suele aparecer tras una mediana de 8 días desde el inicio de los síntomas; un elevado porcentaje de estos casos evolucionan de manera progresiva hacia una insuficiencia respiratoria, siendo esta la causa más frecuente de ingreso en la UCI, al requerir estos pacientes oxigenoterapia mediante ventilación mecánica.^{167,168,170,171} En este contexto, los pacientes pueden desarrollar síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA, del inglés: “*acute respiratory distress syndrome*”), asociado en muchos casos a fallo multiorgánico debido a daño hepático y/o renal agudo, lesiones cardíacas, y/o coagulopatía asociada a eventos tromboembólicos y shock (séptico), entre otros.^{120,167-169,172,176,185}

2.2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de COVID-19 grave

Desde el inicio de la pandemia, se han identificado una serie de factores de riesgo asociados al desarrollo de COVID-19 grave. El conocimiento de estos factores de riesgo supuso un avance en nuestra comprensión de la enfermedad y sobre todo en el manejo clínico de los pacientes, ya que ayudaban a predecir quienes tenían más riesgo de desarrollar una infección grave. Entre los factores de riesgo más relevantes que se identificaron desde las primeras olas de la pandemia se incluyeron, por un lado, factores demográficos como la edad y el sexo, y por otro, la presencia de comorbilidades previas al momento de la exposición al virus.

La edad avanzada constituye uno de los factores más relevantes en relación al riesgo de progresión a una enfermedad grave y mortalidad por COVID-19.^{168-173,186-188} En prácticamente todos los estudios en los que se realiza una estratificación de pacientes según la gravedad de la enfermedad, se ha constatado que los pacientes con enfermedad más grave tienen una edad media significativamente más elevada (edad media de 65 vs. 50 años en pacientes hospitalizados con COVID-19 grave vs. más leve, respectivamente).^{168,170-173,188} Aunque el riesgo de padecer una forma más agresiva de la COVID-19 aumenta progresivamente con la edad,^{171,189,190} los individuos mayores de 50 y sobre todo los mayores de 60 años, son los que presentan un riesgo significativamente más elevado de desarrollar una infección (más) grave,^{169,171,187} siendo dicho riesgo particularmente elevado a partir de los 70 años.^{120,171,172,187,191} Por el contrario, en las cohortes pediátricas y entre los adolescentes, la probabilidad de

desarrollar una COVID-19 grave es baja.^{120,171,173,190,192} En general, esto se traduce en tasas de ingreso en la UCI y de mortalidad mucho más elevadas entre los pacientes más mayores.^{168,170,172,190,191} La susceptibilidad de los pacientes de edad más avanzada para desarrollar formas graves de la COVID-19 se ha atribuido en parte al hecho de que las personas mayores presentan una frecuencia de comorbilidades incrementada, respecto a los jóvenes.^{186,187} No obstante, la mayor gravedad y letalidad de la COVID-19 en adultos de edad avanzada no depende solo de la presencia de comorbilidades, constituyendo la edad avanzada por sí misma un factor de riesgo para desarrollar enfermedad grave, independientemente de las comorbilidades que pudieran asociarse a la misma. A su vez, el fundamento biológico de esta evidencia se ha atribuido al propio “envejecimiento del sistema inmune” o estado de inmunosenescencia,^{193,194} que condicionaría que en muchas ocasiones estos pacientes no sean capaces de poner en marcha una respuesta inmune eficaz y a tiempo frente al virus. En estos casos, el desarrollo de respuestas completamente desreguladas se asocia a un aumento significativo de citoquinas y marcadores proinflamatorios, responsables de una respuesta inflamatoria exacerbada, característica de una infección grave.^{195–197} No obstante, actualmente desconocemos cuales son los mecanismos subyacentes a este “sistema inmune envejecido” que determinan el comportamiento más adverso de la infección, ya que no todos los pacientes mayores desarrollan sistemáticamente una COVID-19 más grave.

Respecto al sexo, los hombres presentan mayor riesgo de desarrollo de COVID-19 más grave. En varios estudios se ha descrito que aproximadamente el 60% de los pacientes que requieren ingreso en la UCI son hombres;^{169,171,186,187,191,198} además, se ha visto que los varones tienen un mayor riesgo de fallecer a causa de la infección,^{172,187,191,198} mientras que, en los pacientes con una enfermedad leve, la ratio hombre/mujer tiende a igualarse. Si bien no se conocen de forma precisa los mecanismos responsables del impacto del sexo en la gravedad de la COVID-19 (independiente de la edad y de otras comorbilidades), son varios los factores que se ha sugerido que podrían influir en las diferencias en el pronóstico de la infección por SARS-CoV-2 entre ambos sexos. Entre estos se incluyen, por un lado, factores biológicos como los distintos niveles y perfiles hormonales -que podrían ejercer un efecto protector en las mujeres, cuya respuesta inmune innata y adaptativa es más eficaz frente a las infecciones-^{199,200} y, por otro lado, diferencias en el estilo de vida, que influirían en el riesgo incrementado en hombres,

ya que estos suelen fumar con más frecuencia (aunque no está claro si el tabaquismo por sí mismo es un factor de riesgo)²⁰¹ y algunas de sus consecuencias directas, como el desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que se han relacionado con un peor pronóstico de la infección.^{186,187,201,202}

Por último, la presencia de comorbilidades previas a la infección también se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad, independientemente de la edad y sexo de los pacientes, al favorecer la progresión hacia formas más graves de la COVID-19, debido al riesgo aumentado de sufrir complicaciones derivadas de la enfermedad. Entre otras, las comorbilidades asociadas a un peor pronóstico de la COVID-19 incluyeron la hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares en general, la diabetes, la obesidad, la EPOC, las inmunodeficiencias, enfermedades renales y/o hepáticas crónicas y el cáncer.^{168,169,171–173,186,187} La presencia de hipertensión arterial se ha descrito como la comorbilidad más frecuente en los pacientes graves que, junto a la presencia de otras enfermedades cardiovasculares, se encuentran especialmente relacionados con una COVID-19 grave debido a la afectación del tejido cardíaco descrita en muchos de los pacientes infectados por el virus SARS-CoV-2.^{168,203–206} Por otro lado, destacan particularmente las comorbilidades que dificultan la correcta función respiratoria durante la infección, ya sea por la afectación directa del tejido pulmonar, como en el caso de la EPOC,^{187,202} o por el efecto perjudicial en la ventilación pulmonar de la grasa abdominal en pacientes con obesidad.^{187,207} La presencia de defectos en el sistema inmune también ejerce un efecto determinante en el desarrollo de una enfermedad más grave, como en el caso de individuos con inmunodeficiencia (primaria o adquirida)^{208,209}, diabetes,²¹⁰ y cáncer, especialmente entre aquellos que se encuentran bajo tratamiento inmunosupresor.^{211,212}

2.2.3. Parámetros de laboratorio

Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en los parámetros de laboratorio en el momento del ingreso hospitalario, que se mantienen durante la fase aguda de la enfermedad, siendo estos cambios más evidentes y marcados en los pacientes que evolucionan a una enfermedad más grave.^{167,168,170,172,186,187} Los parámetros de laboratorio que aparecen de forma más recurrente en los distintos trabajos publicados en pacientes con COVID-19 y su asociación con la gravedad de la enfermedad se recogen de forma resumida en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de laboratorio alterados en pacientes con COVID-19 en el momento del ingreso hospitalario y su asociación con la gravedad de la enfermedad.

Parámetros de laboratorio	Asociación con gravedad
Hemograma	
Leucocitos totales	↑
Linfocitos totales	↓
Hemoglobina	↓
Plaquetas	↓
Marcadores de coagulación	
Dímeros D	↑
Fibrinógeno	↑
Tiempo de protrombina	↑
Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)	↑
Marcadores bioquímicos en suero/plasma	
Creatinina	↑
Bilirrubina	↑
Alanina aminotransferasa (ALT)	↑
Aspartato aminotransferasa (AST)	↑
Gamma-glutamilttransferasa (GGT)	↑
Fosfatasa alcalina	↑
Ferritina	↑
Lactato deshidrogenasa (LDH)	↑
Proteína C reactiva	↑
IL-6	↑
Procalcitonina	↑
Proteínas totales	↑
Albumina	↑
Saturación de oxígeno	↓

Las flechas indican la alteración (disminución o incremento) respecto a los valores normales de referencia, asociada con una mayor gravedad de la COVID-19.

Los cambios que afectan a la distribución de las células sanguíneas son frecuentes, sobre todo en lo que se refiere al recuento de las poblaciones mayoritarias de leucocitos en SP. Así, se observa un incremento en el número de leucocitos, a expensas de un aumento en los niveles de granulocitos neutrófilos, que se encuentran significativamente más elevados al ingreso en el hospital en los pacientes con COVID-19 grave, respecto a los que presentan una enfermedad más leve (Tabla 2).^{168,186,213,214} Este aumento de los granulocitos neutrófilos se acompaña de un descenso muy marcado en las cifras de linfocitos y eosinófilos,^{167,168,170} que se

ha atribuido a la migración de estas células a los órganos linfoides secundarios y al tejido pulmonar, respectivamente, donde van a desempeñar su función dentro de la respuesta inmune (Tabla 2).^{133,215} Como consecuencia de estos cambios ya detectables en el hemograma realizado en un contador hematológico automatizado, la ratio neutrófilo/linfocito aumenta considerablemente en comparación con los sujetos sanos, y de hecho, dado que los cambios son más profundos en los pacientes graves, se identificó la ratio neutrófilo/linfocito como uno de los principales marcadores con valor predictivo de la gravedad de la COVID-19 ya en los primeros estudios publicados.^{213,216} Otras alteraciones en el hemograma de los pacientes ingresados por COVID-19 incluyen trombopenia, y más raramente anemia, particularmente acusadas en las formas más graves de la COVID-19 (Tabla 2).^{172,217-219}

Por otro lado, se han documentado una serie de cambios en los marcadores de la coagulación sanguínea durante la COVID-19, que estarían asociados con un aumento del riesgo de sufrir eventos tromboembólicos y una mayor mortalidad de los pacientes. Además de la trombopenia a la que se hemos hecho referencia anteriormente, se ha descrito, entre otros parámetros, un aumento en los niveles de los dímeros D y del fibrinógeno, más acusado en los pacientes más graves (Tabla 2).^{186,217,220}

Por otra parte, los niveles de diferentes marcadores bioquímicos que se analizan de manera rutinaria también se encuentran alterados (aumentados, excepto los parámetros relacionados con la función respiratoria como la saturación de oxígeno, que estaría disminuida) respecto a los valores normales en prácticamente todos los pacientes COVID-19 hospitalizados, existiendo de nuevo una estrecha asociación entre el grado de desviación respecto a la normalidad y una mayor gravedad de la enfermedad (Tabla 2).^{186,187} En concreto, los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y de la proteína C reactiva han demostrado tener un gran valor predictivo en la mayor gravedad y mortalidad de la enfermedad, ya que los niveles séricos aumentados de ambas proteínas son indicativos del daño tisular que sufren los pacientes a nivel sistémico.^{168,221,222} Asimismo, los niveles séricos de enzimas hepáticas como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST), también resultan de gran valor clínico en la valoración pronóstica de la enfermedad, ya que niveles elevados de las mismas se relacionan con el daño del tejido hepático en respuesta a la inflamación sistémica de los pacientes COVID-19.^{223,224} A su vez, los niveles séricos de la interleuquina (IL)-6, junto con otras

citoquinas, se ha relacionado con una enfermedad de carácter más grave, debido a su papel proinflamatorio en la respuesta inmune, siendo una de las citoquinas proinflamatorias que desempeñan un papel fundamental a la hora de desencadenar la llamada “tormenta de citoquinas” que suele producirse en los pacientes con infección muy grave, o en estado crítico.^{223,224}

2.3. Respuesta inmune frente a SARS-CoV-2

La gran heterogeneidad clínica descrita en los pacientes con COVID-19 se relaciona con múltiples factores cuya interacción influye de manera determinante en el curso clínico de la infección. Por ello, resulta esencial conocer, además de estos factores, los mecanismos involucrados en la evolución hacia una COVID-19 grave. En este sentido, sabemos que el sistema inmune ejerce un papel fundamental en el control y resolución de la infección, así como en la generación de memoria inmunológica frente a un nuevo contacto y reinfección por SARS-CoV-2.^{131,132} Multitud de grupos de investigación han tratado de analizar las particularidades de la respuesta inmune frente a SARS-CoV-2 y su implicación en la patogenia de la enfermedad, siendo este un prerequisite indispensable para el desarrollo de terapias eficaces frente a la COVID-19, y para el diseño de vacunas que prevengan las formas más graves de la enfermedad. Tal como ocurre frente a otras infecciones, y en general, frente a cualquier estímulo que activa por primera vez el sistema inmunitario, una respuesta inmune eficaz requiere de la interacción precisa y coordinada en el tiempo entre las dos ramas principales de la respuesta inmune: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo.^{131,132}

La respuesta inmune innata supone la primera línea de defensa frente a la infección por cualquier patógeno, incluyendo el virus SARS-CoV-2.^{131,134,160} Los componentes del sistema inmune innato van a reconocer el virus a través de receptores celulares de membrana no específicos, resultando en la activación de vías de señalización proinflamatorias que generan un “ambiente antiviral” en el tejido infectado, cuya finalidad es dificultar la replicación de las partículas virales y favorecer el reclutamiento de las células efectoras de la respuesta innata.^{132,160} Cuando el SARS-CoV-2 infecta las células epiteliales del tracto respiratorio a través de los receptores ACE2, este es reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés: “*pattern recognition receptors*”) presentes en la membrana, los endosomas y

el citoplasma de la célula infectada y de forma más amplia, también de las células de la respuesta innata presentes en el tejido.²²⁵⁻²²⁷ Las familias de PRRs que se han identificado como de mayor relevancia en el reconocimiento de SARS-CoV-2 son los receptores de tipo *Toll* (TLR, del inglés: “*Toll-like receptors*”), los receptores de tipo RIG-I (RLR, del inglés: “*retinoic acid-inducible gene 1-like receptor*”) y finalmente, los receptores de tipo NOD (NLR, del inglés: “*nucleotid-binding oligomerization domain-like receptor*”), que forman parte del complejo del inflamosoma (Figura 2).^{131,160,226,227} Estas proteínas son capaces de identificar patrones moleculares asociados a patógenos, denominados PAMPs (del inglés: “*pathogen associated molecular patterns*”), tales como el ARN de cadena simple viral (Figura 2).²²⁵ Una vez que el material genético del virus SARS-CoV-2 es detectado por los diferentes PRRs, se desencadena la activación de cascadas de señalización que inducen la producción y secreción inmediata de IFN antivirales de tipo I (IFN- α y β) y de tipo III (IFN- λ), que a su vez activan la transcripción de patrones de genes específicos (Figura 2). Finalmente, esto se traduce en una potenciación de la acción antiviral de las células de la inmunidad innata (por ejemplo, las células *natural killer* -NK- y los linfocitos T innatos) y en la activación de diversos componentes de la inmunidad adaptativa.²²⁸⁻²³¹ Simultáneamente, los PRRs también promueven la activación transcripcional de diversas citoquinas proinflamatorias, como como la IL-1, la IL-6, o el TNF (del inglés: “*tumor necrosis factor*”), entre otras (Figura 2).^{131,195,227,232} Desde el inicio de la pandemia se demostró que el SARS-CoV-2 es capaz de limitar las respuestas inducidas por IFN antiviral mediante la actividad de sus proteínas no estructurales, que actúan como antagonistas en varios puntos de la cascada de señalización del IFN (Figura 2).^{131,160,195,196,226} Este mecanismo de evasión inmune resulta en una respuesta mediada por IFN de tipo I defectuosa en las etapas más tempranas de la infección e interfiere de manera determinante, tanto en la actividad antiviral de la respuesta innata, como en los mecanismos de activación de la respuesta adaptativa. Todo ello, termina por tanto, favoreciendo la replicación de SARS-CoV-2 y la progresión hacia estadios más avanzados de la COVID-19.^{195,196,233}

Una vez que las células de la mucosa del tracto respiratorio han reconocido a SARS-CoV-2, estas secretan localmente una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles, que inducen el reclutamiento de células de la inmunidad innata al tejido infectado, iniciándose así un proceso cuya finalidad es la eliminación del virus.^{131,195,231,232,234} Hoy sabemos que las primeras células en llegar a la mucosa del tracto respiratorio son los neutrófilos

y los monocitos que, gracias a su actividad fagocítica, eliminan (conjuntamente con los macrófagos proinflamatorios de la mucosa) las células infectadas por SARS-CoV-2, además de los restos celulares y de la matriz extracelular generados en las fases iniciales de la infección.^{231,234,235} Además, las células fagocíticas también secretan mediadores solubles citotóxicos y proinflamatorios, incrementando el reclutamiento de más células inflamatorias al foco de la infección.^{131,231,232,234} Otro componente importante de la respuesta innata son las células NK y los linfocitos T innatos (como linfocitos T TCR $\gamma\delta$, linfocitos T invariantes asociados a mucosa -MAIT-, o células NKT), que también se encuentran aumentadas en el tracto respiratorio, contribuyendo a la producción de citoquinas (como IFN- γ y TNF- α) además de a la destrucción de las células infectadas mediante su actividad citotóxica.^{131,231,236} Por último, el reclutamiento de las células dendríticas (CDs) al foco infeccioso resulta fundamental ya que, a pesar de ser una población minoritaria de leucocitos, participan en la activación de la respuesta inmune adaptativa gracias a su función como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T.^{231,237}

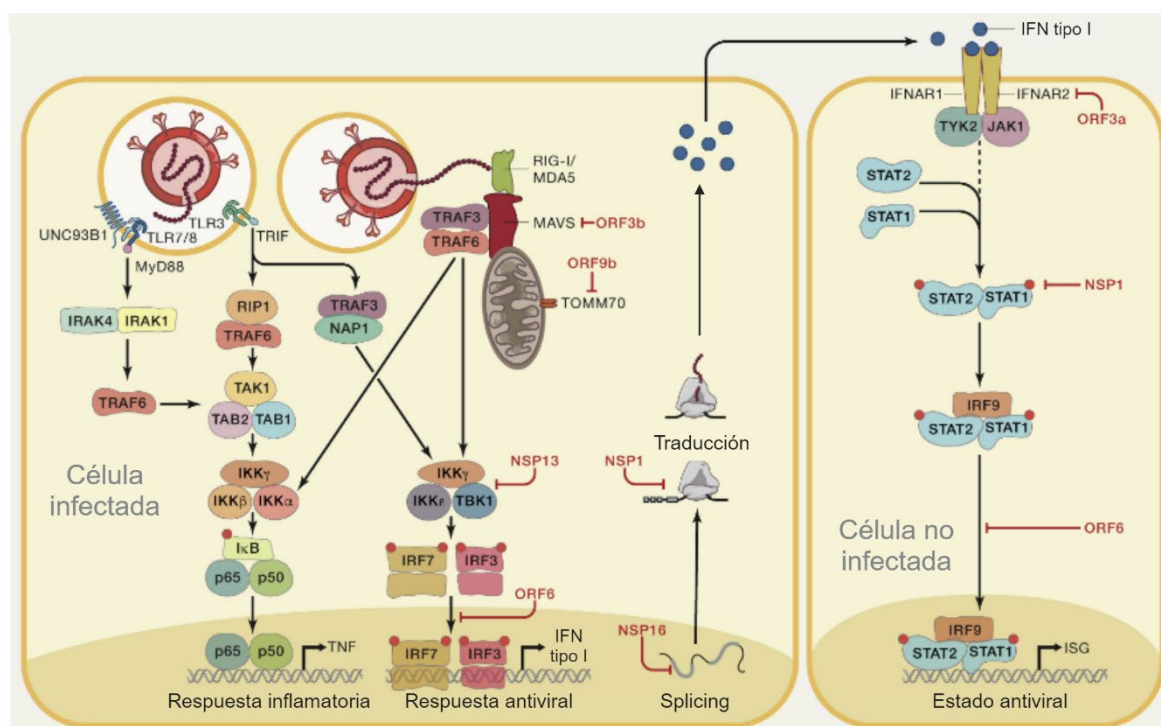


Figura 2. Cascada de señalización intracelular implicada en la producción de IFN virales y TNF asociadas al reconocimiento de SARS-CoV-2 y mecanismos de antagonismo del virus.

La activación del sistema inmune adaptativo es esencial para la eliminación rápida y específica del virus, además de conferir al individuo memoria inmunológica que lo proteja frente

a una futura reinfección por SARS-CoV-2.¹³² En este sentido, los distintos componentes de la respuesta adaptativa interactúan entre sí de manera coordinada para acabar con la infección. Aunque la gran mayoría de los estudios se han centrado en la respuesta humoral mediada por anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2, la respuesta celular, ejecutada principalmente por los linfocitos T, adquiere una gran relevancia en la eliminación de las células infectadas y en la generación de células de memoria que respondan más rápidamente y de manera más eficaz frente a una reinfección por el virus.^{238,239} En la respuesta adaptativa participan principalmente tres grandes grupos de linfocitos con funciones bien diferenciadas: i) los linfocitos T CD4⁺, ii) los linfocitos T CD8⁺ y otros linfocitos T citotóxicos y iii) los linfocitos B, cuyas células efectoras (las CP) son las encargadas de la producción de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2.¹³²

Los linfocitos T CD4⁺ naive pueden diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares diferentes en respuesta a cualquier patógeno, lo que le confiere funciones muy diversas.^{132,240,241} No obstante esta diversidad, la función principal de los linfocitos T CD4⁺ consiste en ayudar a otras células del sistema inmune, motivo por el cual se denominan genéricamente como linfocitos T colaboradores (linfocitos Th, del inglés: “*helper*”). A su vez, los linfocitos Th se clasifican en diversas subpoblaciones funcionales, de acuerdo con el patrón predominante de citoquinas que secretan (Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th22 y Th9).^{242–244} En el contexto de infecciones producidas por virus, como es el caso de la COVID-19 (o, en general, de infecciones por patógenos de replicación intracelular), la polarización Th predominante es hacia células Th1 que producen un patrón de citoquinas típico, entre las que destacan el IFN- γ , la IL-2 y el TNF, cuya finalidad es promover la activación de células citotóxicas (como las células NK, los linfocitos T CD8⁺ y otros linfocitos T citotóxicos) encargados de reconocer y eliminar las células infectadas por el virus.^{132,245,246} Además de los linfocitos Th clásicos, se han descrito otras poblaciones de linfocitos T CD4⁺, como los distintos subtipos de linfocitos Th foliculares (Tfh): linfocitos Tfh de tipo Th1, productores de IL-21 junto a IFN- γ ; linfocitos Tfh de tipo Th2, que secretan IL-4; y linfocitos Tfh de tipo Th17, que producen IL-17.^{247,248} En el contexto de la COVID-19, la interacción de los Tfh, y de forma particular de los Tfh de tipo Th17 y, en menor medida de tipo Th2,^{249,250} con los linfocitos B en los ganglios linfáticos es esencial para la generación de CP productoras de anticuerpos y de linfocitos B de memoria específicos frente a SARS-CoV-2.^{249–}
²⁵¹ Además de la presencia de células Th1 y Tfh específicas frente a SARS-CoV-2, en los

pacientes con COVID-19 también se ha observado un aumento de los linfocitos T CD4⁺ con actividad citotóxica propia (que en condiciones normales representan una población muy minoritaria dentro del conjunto de los linfocitos T CD4⁺), cuya finalidad es la eliminación de las células infectadas por SARS-CoV-2 mediante citotoxicidad mediada por la liberación de granzima B y otras citolisinas.^{132,251} A su vez, los linfocitos T CD8⁺ también responden rápidamente a la infección por SARS-CoV-2, con el objetivo de eliminar las células infectadas por el virus de manera específica gracias al reconocimiento específico de las células portadoras de virus y su actividad citotóxica mediada por citolisinas.^{132,134,240} Por otro lado, existen otras poblaciones de linfocitos T minoritarias, como los linfocitos T TCRγδ, los TCRαβ CD4-CD8⁻ y los linfocitos T innatos tipo MAIT que residen mayoritariamente en las mucosas y en la piel, y desempeñan un papel importante en las respuestas antivirales gracias a su función citotóxica local en el foco de la infección.²⁵²⁻²⁵⁴ Tal como referimos anteriormente, estas células T predominantes en las mucosas y tejido periférico, en realidad tienen una función a caballo entre la respuesta inmune innata y adaptativa, en el sentido de que comparten muchas características con la forma de actuar de las células innatas con receptores de antígeno poliespecíficos.²⁵³⁻²⁵⁵ En el contexto de la infección por SARS-CoV-2, se ha descrito que estas poblaciones celulares se encuentran disminuidas en la SP de los pacientes, sobre todo en aquellos sujetos que desarrollan una COVID-19 más grave, debido al mayor reclutamiento y migración de estas células al pulmón.^{256,257}

En paralelo con la respuesta T, la COVID-19 también induce la rápida activación de los linfocitos B, a partir de los cuales se van a generar CP productoras de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 y linfocitos B de memoria que median la inmunidad protectora a medio y largo plazo.^{132,258-260} De manera similar a lo que ocurre en respuesta a otras infecciones víricas, los linfocitos B producidos en la médula ósea (linfocitos B naive IgMD⁺) migran a través de la SP a los folículos linfoides de los órganos linfoides secundarios donde reconocen a los antígenos (específicos) de SARS-CoV-2 que llegan desde el tejido infectado vía linfática, una respuesta en los centros germinales (CG).^{258,261} Durante la respuesta B en el CG, los linfocitos B naive sufren un proceso de maduración dependiente de antígeno con ayuda de los linfocitos Tfh de tipo Th2 y de tipo Th17.^{241,249,250,262} Así, los linfocitos B se activan, proliferan y sufren un proceso de diferenciación, que gracias a los procesos de hipermutación somática (HMS) y de cambio

isotípico, les confiere una mayor afinidad por el antígeno y funciones efectoras determinadas, respectivamente.²⁵⁹ Las CP son las células efectoras resultantes de la diferenciación de los linfocitos B, constituyéndose en las principales células productoras de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2, elementos esenciales, por un lado, para neutralizar y opsonizar las partículas virales que se encuentran en la matriz extracelular y, por otro lado, para promover las respuestas citotóxica y fagocítica dependientes de anticuerpos.^{263,264} Aunque se han identificado anticuerpos dirigidos frente a prácticamente todas las proteínas del virus SARS-CoV-2, la mayoría de ellos se unen a las proteínas S y N, siendo particularmente relevantes aquellos que reconocen de manera específica el dominio RBD de la proteína S, ya que se comportan generalmente como anticuerpos neutralizantes del virus al impedir que este interactúe e infecte nuevas células.^{150,259,265,266} La activación de la respuesta linfocítica B efectora se refleja en que las CP circulantes aumentan en SP de manera transitoria durante la COVID-19, siendo detectables desde la primera semana tras el ingreso hospitalario.^{214,267,268} Además de la diferenciación a CP, tras el primer contacto con SARS-CoV-2 se generan también células B de memoria con BCR con mayor afinidad por el virus y con cambio isotípico, mayoritariamente de isotipo y subclase IgG1 e IgA1.^{269,270}

2.3.1. Inmunopatología de la COVID-19 grave

En la mayoría de los casos, el sistema inmune es capaz de resolver la infección de manera rápida y eficaz. Sin embargo, en los pacientes con COVID-19 grave se observa una notable desregulación de la respuesta inmune, que a su vez es la responsable de la generación de lesiones graves en el tejido pulmonar, llegando a tener repercusión sistémica en un número significativo de casos.¹³⁴ Tal como hemos descrito previamente, SARS-CoV-2 es capaz de evadir la acción del sistema inmune innato debido al efecto antagónico que ejerce sobre la respuesta mediada por IFN antivirales de tipo I y III (Figura 2).^{131,133,160,233} Esto se traduce en una producción anormalmente baja de IFN-I y III durante los primeros días de la infección, detectable tanto a nivel del tejido pulmonar como en la SP, que se mantiene disminuida durante toda la enfermedad en los pacientes leves/moderados (Figura 3).^{195,196,226,233} Sin embargo, en los pacientes que desarrollan una forma grave de la enfermedad, se observa un aumento significativo en los niveles de IFN antiviral en las etapas más tardías de la fase aguda, lo cual se relaciona con un peor

pronóstico de la COVID-19 (Figura 3).^{133,195,232} La asociación entre una respuesta mediada por IFN desregulada y la gravedad de la COVID-19 se ha confirmado en varios trabajos, en los que la presencia de defectos genéticos en la producción y señalización de IFN, o la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a IFN-I, se asocian con formas más graves de la enfermedad.^{209,271,272}

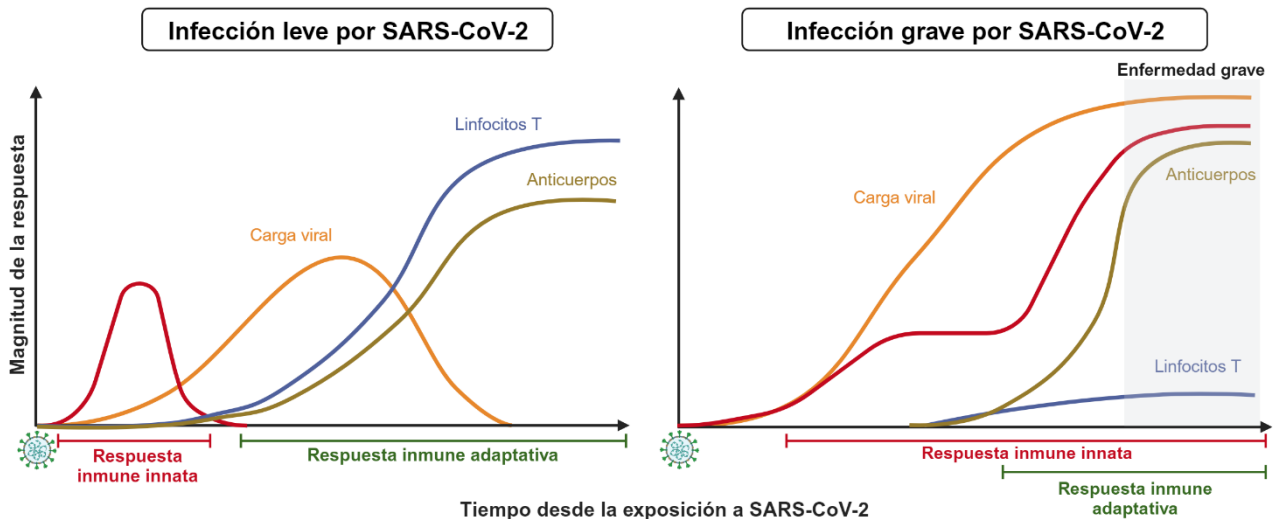


Figura 3. Cinética en sangre/suero de distintos componentes del sistema inmune en respuesta a la infección por SARS-CoV-2 en función de la gravedad de la enfermedad. Esquema adaptado de Sette et al.¹³²

En pacientes con COVID-19 grave, el retraso en la respuesta mediada por los IFN antivirales permite la replicación rápida del virus SARS-CoV-2, lo que se traduce en un aumento progresivo de la carga viral en el tracto respiratorio, que a su vez, promueve una producción excesiva de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas por parte de las células del sistema inmune innato de la mucosa, que además de un efecto local inducen un reclutamiento anormalmente aumentado de (más) células de la inmunidad innata al foco infeccioso/inflamatorio (Figura 3).^{131,232} En consecuencia, la sobreexpresión de estos marcadores solubles proinflamatorios provoca una acumulación patológica de granulocitos neutrófilos, monocitos (proinflamatorios) y células NK en el tejido afectado. A su vez, estas producen y secretan más citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12, entre otras) localmente, causando una respuesta inflamatoria tisular exacerbada en el pulmón (Figura 4).^{195-197,232,235,273} La migración e infiltración incontrolada de las células inflamatorias en el foco de la infección va a desencadenar procesos de muerte celular en los tejidos afectados, que derivan en último término, en el SRDA,

mientras que la acumulación de citoquinas proinflamatorias va a causar una “tormenta de citoquinas”, que conduce finalmente al fallo multiorgánico característico de los pacientes en estado muy grave/crítico (Figura 4).^{274–276} Como reflejo de todo esto, el incremento en el número de granulocitos neutrófilos, tanto en el pulmón como en la SP, se ha considerado como un marcador de mayor gravedad de la COVID-19.^{234,235,277} Varios estudios sugieren que el mecanismo por el que los granulocitos neutrófilos provocan daño tisular se debe a la liberación excesiva de proteasas y especies reactivas de oxígeno y a un proceso conocido como NETosis (del inglés: “*neutrophil extracellular trap*”),^{278,279} lo que explica además, en parte, los eventos tromboembólicos y la coagulopatía que afectan frecuentemente a los pacientes en estado crítico.²⁸⁰ Además, en estos pacientes con COVID-19 más grave se han descrito alteraciones en diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune innata, asociadas a la desaparición en sangre de los monocitos no clásicos CD14-CD16⁺ y el incremento de monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺ activados, con una potente actividad proinflamatoria.^{232,267,268,277,281} De manera similar, en los pacientes graves se observa una reducción en el número de CDs totales circulantes en SP, sobre todo a expensas de un descenso en el número (y también en la función) de las CDs plasmocitoides (CDp), reconocidas como las principales productoras de IFN-I. Todo ello agrava aún más si cabe, el déficit de la vía de señalización del IFN antiviral característico de la COVID-19 grave.^{267,277,281–283}

En estos años se han recopilado numerosas evidencias que sostienen que la patogénesis de la COVID-19 grave se debe a una respuesta inmune “hiperinflamatoria” frente a SARS-CoV-2. Sin embargo, varios grupos de investigación han señalado que el mecanismo por el cual los pacientes con COVID-19 progresan a una enfermedad más avanzada podría estar relacionado con defectos en el sistema inmune que permiten la diseminación del virus.^{284,285} En este sentido, el déficit de IFN antivirales observado en las etapas tempranas de la COVID-19 podría condicionar una activación adecuada y eficaz de la respuesta inmune adaptativa (Figura 3). Uno de los rasgos más comunes de la COVID-19 es la linfopenia que presentan la práctica totalidad de los pacientes, y que es especialmente marcada en las formas más graves de la enfermedad.^{214,286–288} Esta disminución en los niveles de linfocitos circulantes se debe principalmente al descenso en el número de linfocitos T en SP (Figura 3).^{213,214,287,288} Aunque los mecanismos concretos responsables de la linfopenia T no se conocen aún de forma precisa, se

ha sugerido que la linfopenia T podría ser consecuencia de la migración linfocitaria a los tejidos infectados o a apoptosis inducida por TNF.^{133,215,282,289,290} Además de reducidos en número, los linfocitos T pueden ver afectadas sus funciones, ya que se ha descrito un aumento en la expresión de marcadores asociados a un estado “exhausto” como PD-1/CD279 o TIM3/CD366, en pacientes que desarrollan una infección grave.^{291–293}

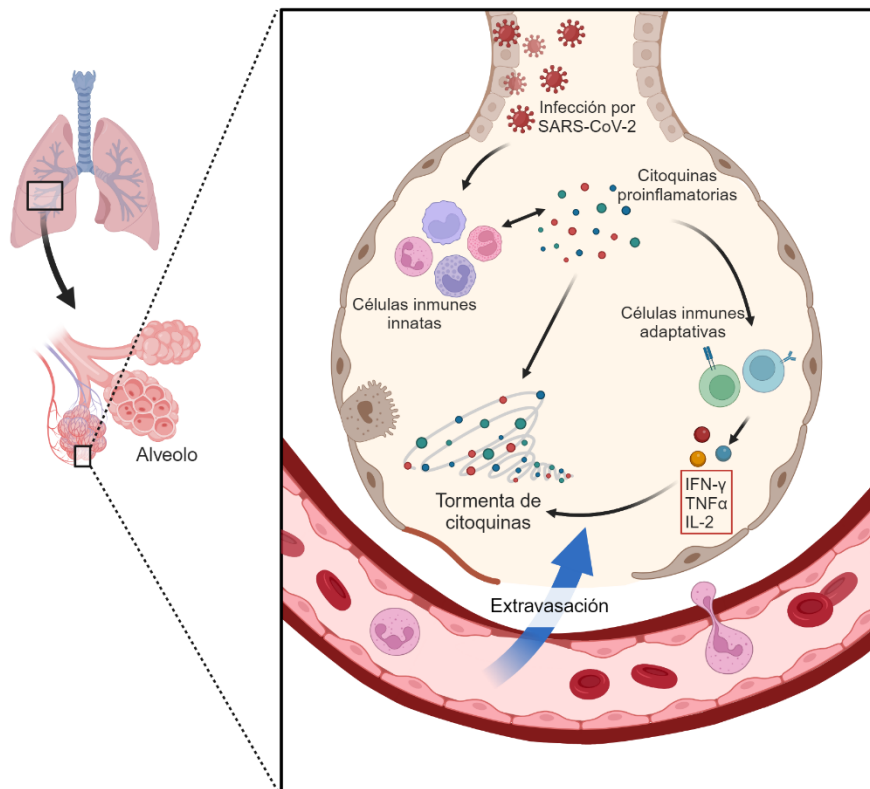


Figura 4. Representación esquemática de los procesos implicados en la inducción de la tormenta de citoquinas a nivel de tejido pulmonar característica de los pacientes con COVID-19 grave.

Por otro lado, también se han descrito diferentes alteraciones en la respuesta B entre los pacientes con COVID-19 grave, con afectación de su capacidad para generar una respuesta humoral eficaz. En este sentido, la mayoría de los trabajos coinciden en que la COVID-19 grave se asocia a niveles significativamente más elevados de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 y una mayor respuesta B de memoria, respecto a lo observado en pacientes con una enfermedad leve.^{265,294–296} A pesar de los niveles más elevados de anticuerpos, los linfocitos B activados de pacientes con enfermedad grave presentan niveles inferiores de HMS asociada a la producción de anticuerpos de menor afinidad, incapaces de neutralizar de forma eficaz el virus.^{133,258} Estos hallazgos podrían estar relacionados con un defecto en la formación de los CG

funcionales en pacientes en estado crítico, asociado también al descenso del número y de la función de los linfocitos Tfh en los órganos linfoides secundarios.^{251,297} En su conjunto, estas alteraciones se traducen en un retraso en la generación de CP que produzcan anticuerpos con capacidad neutralizante, con el consiguiente acúmulo de una mayor carga viral en los pacientes graves, contribuyendo así, a la progresión de la COVID-19 hacia formas aún más graves de la enfermedad (Figura 3).^{133,294,295} Además, una vez que la lesión del tejido afectado (principalmente el pulmón) ha progresado considerablemente como consecuencia de la actividad inflamatoria exacerbada, la llegada de grandes cantidades de anticuerpos, condiciona una lesión tisular aún mayor, al activarse los mecanismos de citotoxicidad y fagocitosis mediada por anticuerpos, típica de los pacientes que sufren las formas más graves de COVID-19.^{263,264}

De acuerdo con lo expuesto previamente, la capacidad de generar una respuesta inmune específica y eficaz es de vital importancia para la resolución de la infección. Por tanto, resulta evidente que los individuos inmunocomprometidos tienen un riesgo más elevado de desarrollar una forma grave de la enfermedad.²⁹⁸ En este sentido, los pacientes con cáncer activo serían un caso extremo de inmunodeficiencia, en los que se han referido unas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a COVID-19 muy elevadas. A modo de ejemplo, en la LLC (y otros tumores hematológicos) la letalidad por COVID-19 durante las primeras olas de la pandemia fue de aproximadamente el 30% de los infectados.^{299,300} En general, esto sería debido a que los individuos con cáncer presentan un sistema inmune disfuncional, especialmente en el caso los pacientes hematológicos, que puede verse incluso agravado cuando se encuentran bajo tratamiento de quimioterapia y/o inmunosupresor.³⁰¹⁻³⁰³ No obstante, aquellos sujetos que presentan una inmunodeficiencia de carácter más leve (por ej., en la diabetes, enfermedades autoinmunes y las enfermedades metabólicas crónicas), también tienen una mayor susceptibilidad para desarrollar formas de COVID-19 más graves,^{210,298,304-306} poniendo de manifiesto la especial relevancia de una respuesta inmune coordinada y eficaz en la resolución de la enfermedad.

2.3.2. Cinética de los componentes del sistema inmune en SP durante la COVID-19

Los cambios que se producen en los distintos componentes del sistema inmune a nivel local en el foco infeccioso, en respuesta a la infección por SARS-CoV-2, pueden verse reflejados

también en la distribución de las poblaciones celulares circulantes en SP. Esto permite monitorizar la infección a través de los cambios observados en las diferentes poblaciones de leucocitos y en los componentes solubles de la respuesta inmune, gracias a la mayor accesibilidad a la hora de disponer de muestras de SP de los pacientes, en comparación con muestras procedentes del tejido infectado o de los órganos linfoides secundarios, donde ocurren la gran mayoría de los cambios en la respuesta inmune, pero de una accesibilidad muy limitada a lo largo del curso de la enfermedad. Por este motivo, multitud de estudios relacionados con el análisis de la respuesta inmune en la COVID-19 se han centrado en el análisis de la cinética de las distintas poblaciones de leucocitos y de los anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en la SP de los pacientes, con el objetivo de poder identificar perfiles inmunológicos asociados a determinados grupos de pacientes, que permitieran, por ejemplo, predecir la gravedad de la enfermedad, tanto en la fase aguda de la COVID-19 como en el periodo de convalecencia. Pese a los numerosos estudios publicados hasta la fecha sobre la cinética de las diferentes poblaciones de células inmunes en sangre de los pacientes con COVID-19, la mayoría de ellos no se han centrado en los cambios longitudinales que ocurren a lo largo del tiempo, respecto al día de comienzo de los síntomas. Además, en muchos de estos estudios no se han incluido controles adecuados, ajustados por edad con la cohorte de pacientes con COVID-19 analizados, pese a la relevancia de la edad como factor determinante a tener en cuenta a la hora de investigar los cambios en la distribución de las poblaciones leucocitarias en sangre durante la infección.^{90,307-309}

En términos generales, los cambios más importantes, tanto en el número como en la función de las diferentes poblaciones de células del sistema inmune circulantes en sangre, ocurren durante la fase aguda de la COVID-19, siendo estas alteraciones ya evidentes en los primeros días tras el inicio de los síntomas asociados a la COVID-19. Así, la práctica totalidad de los pacientes presentan un descenso temprano en el número de linfocitos, eosinófilos y basófilos, independientemente de la gravedad de la enfermedad,^{213,287,310} siendo sin embargo estas alteraciones mucho más pronunciadas entre en los pacientes con formas más graves de la enfermedad.^{213,214,287,288,310} Por el contrario, el número de neutrófilos circulantes en SP aumenta de forma muy marcada y temprana en los pacientes graves, debido a la movilización masiva desde la médula ósea a sangre, y de esta hacia el foco de la infección, mientras que en

pacientes asintomáticos y leves los niveles se mantienen prácticamente normales.^{213,214,287,289,311} Por otro lado, existe cierta disparidad en los datos disponibles en la bibliografía acerca de los monocitos, ya que mientras que en un gran número de estudios no se refieren cambios significativos en sus niveles en sangre,^{213,287,289,310,312} en otros los resultados obtenidos apuntan a un incremento en el número de estas células, sobre todo en pacientes con COVID-19 grave.^{232,267,268} Pese a estas discordancias, la mayoría de los trabajos coinciden en que en los pacientes con enfermedad grave se produce una marcada disminución de la subpoblación de monocitos no clásicos CD14-CD16⁺, acompañada de un incremento en los niveles en sangre de los monocitos con fenotipo intermedio CD14⁺CD16⁺ y actividad proinflamatoria.^{232,267,268,277,281,312} Por último, el número de CD_s en SP también se ve reducido desde los primeros días de la enfermedad, siendo este descenso particularmente pronunciado en la población de CD_p.^{214,267,283,312,313}

El estudio en profundidad del compartimento de linfocitos circulantes en la sangre de los pacientes con COVID-19 ha mostrado que la depleción de linfocitos totales en SP es causada por un descenso en el número de linfocitos T.^{213,214,267,287,289} Esta disminución en los niveles de linfocitos T circulantes es especialmente evidente en los pacientes graves, afectando sobre todo a los linfocitos T CD8⁺, y en menor medida también a los linfocitos T CD4⁺ y las células T TCRγδ.^{213,232,256,287-289,312} No obstante, en los pacientes con COVID-19 se observa un aumento de linfocitos T activados, principalmente de linfocitos T CD8⁺, con expresión de HLA-DR y CD38, junto a una mayor expresión de marcadores indicativos de un estado funcional “exhausto”.^{268,289,312,314} En este sentido, la existencia de una respuesta citotóxica temprana y robusta, mediada por los linfocitos T CD8⁺ activados, se ha asociado en la COVID-19 a una eliminación eficaz del virus, resultando en una enfermedad de carácter leve;^{240,312,315} por el contrario, en los pacientes con COVID-19 grave, la respuesta T CD8⁺ es mucho más tardía y mantenida a lo largo del transcurso de la fase aguda.^{312,315} Por su parte, las células NK tienden a disminuir muy pronto en SP de los pacientes graves, debido a la migración de estas células al tracto respiratorio, donde van a ejercer su función citotóxica.^{267,287,312}

En esta misma línea, el número de linfocitos B también se encuentra especialmente reducido en los pacientes con infección grave,^{268,289,315} a expensas de la disminución del número de linfocitos B que no han sufrido todavía el proceso de maduración dependiente de antígeno,

es decir, de los linfocitos B pre-CG, y en concreto de los linfocitos B naive CD5⁺ y de los transicionales o inmaduros.^{268,288,312,316} En contraposición, las cifras de linfocitos B de memoria se mantienen dentro de los niveles normales durante la fase aguda de la COVID-19,³¹⁵ si bien en algunos trabajos se describe una ligera disminución de estas células B en algunos pacientes.^{289,312} Cabe destacar que dentro de los linfocitos B de memoria se ha descrito la existencia de una expansión de dos poblaciones minoritarias: i) los linfocitos B con cambio de isotipo (IgM⁻) CD27⁻ y ii) los linfocitos B de memoria CD27⁻CD21⁻.^{260,267,289,315} El aumento de células IgM⁻CD27⁻ se ha atribuido a la generación de respuestas B independientes de los linfocitos T (fuera del CG), debido a una alteración funcional de los linfocitos T_{fh} y a la pérdida de los CG descrita en los pacientes con formas más graves de la COVID-19,^{289,297,317} mientras que la pérdida de expresión concomitante de CD27 y CD21 se asocia con un estado de “anergia” del linfocito B, que al ver impedida su función, contribuiría a la progresión de la enfermedad al menos en algunos casos.^{267,318,319} Por el contrario, en los pacientes con COVID-19 se produce una expansión sustancial de CP en la circulación sanguínea, que es ya muy evidente desde la primera semana tras el inicio de los síntomas.^{214,267,268,288,289,315,316} En los pacientes con una enfermedad leve, este aumento en el número de CP es menos notorio, mientras que en aquellos que presentan una enfermedad grave, el incremento de CP es mucho más marcado y persiste durante más tiempo.^{267,288,289,312} Además, un porcentaje significativo de las CP circulantes en SP expresan CD138,³²⁰ marcador que se expresa en los estadios de maduración más avanzados de las CP.³²¹ En cuanto a la distribución de las CP según isotipo y subclase de la cadena pesada la inmunoglobulina, los pacientes con COVID-19 muestran una respuesta dominada por CP de isotipo IgG⁺ e IgA⁺, con un número limitado de células IgM⁺, siendo el aumento de las CP IgG⁺ e IgA⁺ debido principalmente al incremento de las CP IgG1⁺ e IgA1⁺, y en menor medida de las CP IgG3⁺.^{269,270,315,320,322}

Todas estas alteraciones descritas en la distribución de las distintas poblaciones de leucocitos en SP persisten a lo largo de la fase aguda de la COVID-19. Una vez que el sistema inmune ha sido capaz de controlar la infección, estos cambios comienzan a revertir de forma progresiva hasta recuperar los niveles normales, una vez se ha resuelto la infección.^{213,214,312} La vuelta a la normalidad de los diferentes parámetros hematológicos ocurre más rápido en pacientes con enfermedad leve y moderada,^{213,214,310,312} mientras que los pacientes con infección

grave tardan más tiempo en normalizar las cifras, lo que habitualmente coincide normalmente con el momento del alta hospitalaria.^{213,312} Estos distintos perfiles en las cinéticas, en función de la gravedad de la infección, son especialmente notables en aquellos pacientes que fallecen a causa de la infección, en los que la mayoría de las alteraciones presentes en las poblaciones celulares circulantes en SP siguen siendo detectables en el momento del deceso.²¹³ Pese a la tendencia generalizada a recuperar los niveles normales de células inmunes en SP tras la infección, varios autores han señalado la existencia de múltiples alteraciones que persisten más allá de la enfermedad, lo que evidencia una desregulación, incluso a largo plazo, del sistema inmune asociada a la COVID-19.^{214,260,312,315,323–325} Así, tras la COVID-19 pueden observarse alteraciones en el compartimento de células mieloides circulantes, entre las que destaca un aumento de monocitos clásicos CD14⁺CD16⁻ y de monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺ con una expresión elevada de genes inflamatorios.^{316,323,324} A pesar del aumento progresivo en la frecuencia de CDs circulantes en SP,^{214,325} durante la etapa más temprana de convalecencia estas siguen estando reducidas, siendo especialmente evidente la disminución de CDp.^{312,324} No obstante, es en el compartimento linfóide donde se han descrito más alteraciones a largo plazo, asociadas a la generación de memoria inmunológica.^{260,326,327} Así, durante las primeras semanas del periodo de convalecencia, varias subpoblaciones de linfocitos T siguen mostrando cambios similares a los descritos durante la fase aguda de la enfermedad grave, lo que pone de manifiesto el retraso en la recuperación de estos pacientes.³¹² Respecto a los linfocitos B, se ha observado también un descenso transitorio de los linfocitos B naive en torno a la semana 8 tras el inicio de los síntomas,³¹² mientras que la expansión de linfocitos B de memoria IgM⁻ CD27⁻ descrita en los pacientes con una enfermedad grave continúa siendo evidente incluso 6 meses después de la infección.³¹⁵ A largo plazo también se han detectado alteraciones numéricas y funcionales en algunas poblaciones de linfocitos circulantes, entre las que se incluyen un incremento en el número de linfocitos T con actividad citotóxica, que siguen expresando marcadores de activación y propios de un estado “exhausto” hasta 8 meses tras la infección por SARS-CoV-2.^{315,324–326} Por otro lado, se ha identificado la presencia de linfocitos T de memoria con una vida media de entre 3 y 5 meses,³²⁷ mientras que los linfocitos B de memoria son detectables desde el primer mes tras la COVID-19 y continúan incrementándose hasta 8 meses después de la infección.^{259,260,326,327} En general, todos estos cambios no se ven reflejados en las poblaciones

linfoides mayoritarias, ya que las subpoblaciones afectadas representan un porcentaje relativamente muy bajo de las mismas.³¹⁵ A pesar de esto, algunos estudios muestran diferencias significativas en sujetos convalecientes respecto a individuos que no han sido infectados por el virus, tales como un incremento en el número de linfocitos T CD4⁺ o en los linfocitos B totales.^{323,325}

Simultáneamente con los estudios realizados a nivel celular, en muchos trabajos se ha analizado la cinética de los anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en suero o plasma, con el objetivo de definir la duración y calidad de la inmunidad humoral a largo plazo. Estos estudios han puesto de manifiesto que en un número elevado de sujetos infectados por SARS-CoV-2 se detectan anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N del del virus ya en etapas muy tempranas de la enfermedad, presentando ya aproximadamente el 90% de los pacientes signos de seroconversión a los 10 días del inicio de los síntomas asociados a la COVID-19.^{246,294,296,322,328} Sin embargo, parece que los anticuerpos con actividad neutralizante (dirigidos principalmente frente al dominio RBD de la proteína S) tienden a detectarse más tarde, a lo largo de la segunda semana tras el inicio de la enfermedad.^{294,328,329} Al contrario de lo que ocurre en una respuesta humoral “clásica”, donde primero se secretan anticuerpos de tipo IgM, seguidos de la producción de anticuerpos de tipo IgA e IgG, en la infección por SARS-CoV-2 se observa una producción simultánea de anticuerpos de los tres isotipos (IgG, IgA, e IgM).^{266,294,296,328} Los títulos de anticuerpos aumentan progresivamente hasta alcanzar su máximo nivel a las 4 semanas tras el inicio de los síntomas,²⁹⁶ observándose niveles significativamente más elevados de todos los anticuerpos en pacientes hospitalizados, mientras que los niveles son mucho más bajos en pacientes con una enfermedad leve, llegando a ser indetectables en un elevado número de casos asintomáticos.^{266,268,294,296,330} A partir de este momento, los niveles de anticuerpos comienzan a decaer, especialmente los de isotipo IgM, que dejan de ser detectables en un gran porcentaje de pacientes alrededor de 50 días tras el inicio de los síntomas.^{328,331,332} Los niveles de anticuerpos de isotipo IgA también disminuyen tras un periodo de tiempo un poco más prolongado que para la IgM, con una mediana de seroreversión de unos 100 días,^{328,333} si bien en algunos estudios se han detectado anticuerpos de isotipo IgA específicos de SARS-CoV-2 tras un tiempo de seguimiento más largo.²⁶⁵ Por el contrario, los niveles de anticuerpos de tipo IgG persisten en el plasma de los pacientes durante mucho tiempo tras la resolución de la

infección, detectándose hasta un año después de la misma.^{332,334,335} Cabe mencionar que entre estos anticuerpos IgG predominan los de subclase IgG1, mientras que los de subclase IgG3 desaparecen de forma mucho más rápida.³²³ En su conjunto, estos hallazgos sugieren que la infección por SARS-CoV-2 es capaz de generar CP de vida larga de isotipo IgG que residen en la médula ósea y que continúan produciendo anticuerpos durante mucho tiempo después de la infección. No obstante, es difícil evaluar a largo plazo el tiempo que persisten los anticuerpos (principalmente IgG) en el plasma de los pacientes, ya que cabe la posibilidad de que en los estudios longitudinales el virus haya vuelto a infectar a algunos de los sujetos estudiados, aumentando de nuevo los niveles de anticuerpos y sobreestimando así el efecto protector de los mismos en el tiempo.³³⁶ En este sentido, también hemos de señalar que la introducción de los protocolos de vacunación en la población general, dificulta aún más si cabe el estudio de la cinética de los anticuerpos en periodos superiores a un año desde el inicio de la pandemia, momento en el que se inició la administración de las primeras dosis de las vacunas frente a SARS-CoV-2.³³⁶

2.4. Vacunación frente a SARS-CoV-2

Desde mediados del siglo XX, la vacunación ha sido el método más efectivo para prevenir las enfermedades infecciosas causadas por diversos agentes patógenos. Desde que en enero de 2020 se secuenció el genoma del virus SARS-CoV-2,¹¹⁶ se puso también en marcha el desarrollo de vacunas que fuera capaces de prevenir la infección por este nuevo virus.^{124,125} A lo largo del año 2020, varias vacunas candidatas progresaron en las sucesivas etapas de ensayos preclínicos y clínicos.¹²⁴ Debido a la dramática situación provocada por el elevado número de infectados y fallecidos por la COVID-19, las autoridades competentes aprobaron el “uso de emergencia” de algunas de estas vacunas a finales de 2020, a pesar de que todas las vacunas seguían (y siguen estando en la actualidad) en fase de desarrollo experimental.^{337,338} Así, la administración masiva de vacunas frente al SARS-CoV-2 a nivel mundial ha supuesto una reducción drástica en el número de casos graves de COVID-19 y de muertes derivadas de esta infección.^{339,340}

En la actualidad, se han diseñado alrededor de unas 400 vacunas frente a SARS-CoV-2, que se encuentran en distintas fases de desarrollo y evaluación.³³⁸ La práctica totalidad de las

vacunas van dirigidas frente a la proteína S del virus SARS-CoV-2,^{124,125} ya que los anticuerpos que se unen a esta proteína y, en concreto al dominio RBD de la misma, van a ser aquellos que con mayor probabilidad serán capaces de neutralizar el potencial infeccioso del virus al prevenir su unión a las células del huésped.¹⁴⁹ Uno de los factores más relevantes a la hora de diseñar una vacuna frente a SARS-CoV-2 (u otro microorganismo) lo constituye la forma de administración de la proteína S, en función de lo cual las vacunas pueden agruparse en: vacunas basadas en virus inactivados o atenuados,^{341,342} vacunas basadas en la inoculación de proteínas recombinantes o vectores virales,³⁴³⁻³⁴⁵ y vacunas de ácidos nucleicos en las que se introduce material genético como ARN o ADN, entre otras.³⁴⁶⁻³⁴⁸ De todos estos formatos, merece destacar las vacunas basadas en la tecnología de ARN mensajero (ARNm), en las cuales se lleva trabajando desde la década de 1990 para desarrollar protección frente a diferentes agentes infecciosos.³⁴⁹ Cuando surgió la nueva infección por SARS-CoV-2, estas vacunas de ARNm estaban confinadas al campo de las vacunas experimentales, ya que no había sido aprobada ninguna vacuna fabricada mediante esta tecnología hasta el desarrollo de las vacunas de ARNm frente al SARS-CoV-2: la vacuna BNT162b2 (producida por Pfizer-BioNTech)^{346,347} y la vacuna mRNA-1273 (producida por Moderna).³⁴⁸ Además de estas dos vacunas basadas en tecnología de ARNm, otras vacunas que adquirieron especial importancia en este periodo fueron las vacunas basadas en vectores adenovirales ChAdOx1 (AstraZeneca)³⁴⁴ o Ad26.COV2.S (Janssen),³⁴⁵ que se aprobaron también rápidamente para su uso en la población general tanto en Europa como en Estados Unidos. Otras vacunas producidas en este periodo como la vacuna Gam-COVID-Vac (producida por el Instituto de Investigación de Gamaleya),³⁵⁰ desarrollada y suministrada mayoritariamente en Rusia, o la BBIBP-CorV (Sinopharm)³⁵¹ producida en China fueron también empleadas de forma precoz en este periodo en otras áreas geográficas. A excepción de la vacuna Ad26.COV2.S, prácticamente todas las demás vacunas son vacunas bivalentes, que requieren la administración de al menos dos dosis para generar una respuesta inmune protectora óptima.^{125,338} Además, en muchos países se han administrado dosis adicionales y sucesivas de la vacuna con el fin de mantener la inmunidad frente a SARS-CoV-2 a más largo plazo, lo que resulta especialmente relevante en los grupos de riesgo.^{352,353}

2.4.1. Respuesta inmune en individuos vacunados frente a SARS-CoV-2

La vacunación específica frente a SARS-CoV-2, y en general frente a cualquier agente patógeno, se basa principalmente en la capacidad de generar una respuesta inmune eficaz frente al virus, capaz de prevenir la infección por SARS-CoV-2 en futuras exposiciones al virus, y de generar memoria inmunológica que proteja a los sujetos vacunados a (más) largo plazo.²³⁸ En este sentido, se ha descrito una clara asociación entre la producción de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 y la capacidad protectora de las vacunas frente a la infección por este virus,^{354,355} siendo esta correlación especialmente elevada para los anticuerpos con actividad neutralizante.³⁵⁶ Por este motivo, se han realizado innumerables trabajos en todo el mundo dirigidos a evaluar la respuesta humoral en diferentes cohortes de individuos vacunados frente a SARS-CoV-2. Así, en los estudios realizados sobre la población general, se ha descrito que en la práctica totalidad de los sujetos vacunados se detectan anticuerpos específicos frente a la proteína S de SARS-CoV-2 ya tras la administración de la primera dosis de la vacuna e independientemente del tipo vacuna administrada.³⁵⁵ Asimismo, se ha demostrado que los niveles de estos anticuerpos aumentan significativamente tras la administración de la segunda dosis.³⁵⁷⁻³⁵⁹ La respuesta humoral a la vacunación está dominada por anticuerpos específicos de isotipo IgG,^{357,359,360} y concretamente de las subclases IgG1, y en menor medida, IgG3, si bien es cierto que tras la administración de la segunda dosis de la vacuna también pueden detectarse anticuerpos de isotipo IgG2.^{360,361} Además, se observa un aumento de los anticuerpos específicos de isotipo IgA (en concreto de la subclase IgA1), mientras que la respuesta de anticuerpos de isotipo IgM suele ser bastante débil en los sujetos vacunados frente a SARS-CoV-2.^{259,357,359,360}

Uno de los factores que más influye en la cinética de los anticuerpos específicos frente a la proteína S en la respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2, es la existencia de una exposición al virus de forma previa a la administración de la vacuna. Así, en aquellos individuos que no han tenido contacto previo con el virus, los anticuerpos específicos frente a la proteína S comienzan a ser detectables a partir del día 10 tras la administración de la primera dosis de la vacuna, aumentando progresivamente, pero sin alcanzar los niveles máximos hasta el momento de la inoculación de la segunda dosis.^{359,362} Tras la segunda dosis de la vacuna, los niveles de anticuerpos específicos frente a la proteína S aumentan de nuevo a los 7 días de la

administración de la misma, alcanzando entonces su nivel máximo en plasma.^{357–359,362–364} En contraposición, en aquellos sujetos que han pasado la COVID-19 en algún momento antes de ser vacunados, los niveles de anticuerpos en plasma aumentan rápidamente, alcanzando su valor máximo 7 días después de recibir la primera dosis de la vacuna, sin que se observe un aumento significativo de los mismos con la segunda dosis.^{357,358,360,365} Además, en estos sujetos se alcanzan niveles máximos de anticuerpos significativamente más elevados que en aquellos individuos vacunados que no han tenido contacto previo con el virus.^{363–365} Una vez que los anticuerpos específicos han alcanzado los títulos máximos tras la vacunación, sus niveles comienzan a decaer, siguiendo diferentes cinéticas en función del isotipo, de manera similar a lo descrito en la infección natural por SARS-CoV-2.^{328,332} De este modo, en aquellos individuos en los que se producen niveles detectables de anticuerpos de isotipo IgM en respuesta a la vacunación, sus niveles en plasma decaen de forma muy rápida, seguido del descenso de los títulos de los anticuerpos de isotipo IgA.^{357,359,360} Por el contrario, el descenso de los niveles plasmáticos de los anticuerpos de isotipo IgG ocurre de manera más lenta y gradual, siendo estos anticuerpos detectables incluso 8 meses tras la administración de la vacuna.^{358,365–368}

Además de una respuesta humoral robusta, las vacunas frente a SARS-CoV-2 generan una respuesta celular (linfocito T), que sin embargo ha sido menos estudiada. En concreto, las vacunas frente a SARS-CoV-2 inducen una respuesta T específica muy temprana, detectable incluso 4 días después de la administración de la primera dosis de la vacuna.^{369–371} Así, tras la primera dosis de la vacuna se observa un aumento de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ específicos frente a la proteína S en prácticamente todos los individuos vacunados, produciendo y secretando estas células T IFN- γ , IL-2 y TNF- α .^{370,372,373} De manera similar a lo que ocurre en la infección natural, los linfocitos T CD4⁺ se diferencian hacia linfocitos con fenotipo efector de tipo Th1 y Tfh.^{370,372,373} Por otro lado, la vacunación frente a SARS-CoV-2 también promueve respuestas dependientes del CG.^{258,357,365} En este sentido, se ha descrito un incremento transitorio de CP, detectable 10 días después de la primera vacunación (debido a un incremento de CP de isotipo IgG), aumento que se repite de nuevo a los 7 días después de la administración de la segunda dosis.^{357,359,372} Sin embargo, en aquellos individuos que han estado expuestos a SARS-CoV-2 de forma previa a la vacunación, el aumento de CP tras la primera dosis ocurre de forma más temprana a los 7 días de la administración de la vacuna, mientras que no se evidencia

ningún cambio detectable en los niveles de CP circulantes en sangre tras la segunda dosis de la vacuna.³⁷⁴ Además de inducir la producción de células efectoras, la vacunación frente a SARS-CoV-2 también promueve la producción de linfocitos B y T de memoria específicos frente a la proteína S del virus, persistiendo estas células durante al menos 6 meses tras la inoculación de la vacuna,^{355,357,365,375,376} siendo estas células de memoria las principales responsables de elaborar respuestas inmunológicas (mucho) más rápidas y eficientes frente a una nueva exposición al virus.³⁷⁴

2.4.2. Respuesta a vacunación frente a SARS-CoV-2 en pacientes con LBM^{hi} y LLC

Uno de los principales grupos de riesgo para el desarrollo de COVID-19 grave son los pacientes con cáncer, y especialmente aquellos con tumores hematológicos.^{211,299} En concreto, en los pacientes con LLC se ha descrito que el 79% de los sujetos infectados desarrollan una COVID-19 grave que durante las primeras olas de la pandemia se ha asociado a una elevada tasa de mortalidad (de entre el 31% y el 33% de los casos).^{300,377} La elevada mortalidad de los pacientes con LLC infectados por SARS-CoV-2, junto con la inmunodeficiencia que presentan,^{84,94} han promovido el estudio de la respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 de forma específica en esta enfermedad, con el objetivo de determinar si la administración de las vacunas en estos pacientes es capaz de generar una respuesta inmune lo suficientemente eficaz como para proteger de manera efectiva frente a una posible reinfección por el virus.^{340,347,348}

Varios estudios dirigidos a analizar la respuesta humoral en los pacientes con LLC han descrito que el porcentaje de pacientes sometidos a la vacunación que presentan anticuerpos detectables frente a SARS-CoV-2 tras la primera dosis es muy bajo, oscilando entre el 20%-35% (vs. 95% en la población general), mientras que tras la segunda dosis el porcentaje de casos seropositivos asciende al 55%-75% (vs. 100% en la población general) de los pacientes vacunados.³⁷⁸⁻³⁸⁰ Además, los pacientes con LLC generan títulos más bajos de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en respuesta a la vacunación,³⁷⁹⁻³⁸² déficit que se ve aún más acentuado entre los pacientes que están bajo tratamiento activo frente a la LLC.^{378-380,382,383} Asimismo, la actividad neutralizante de los anticuerpos inducidos por la vacunación también está significativamente afectada en estos pacientes.^{379,381} No obstante todo lo anterior, en aquellos pacientes con LLC que sí generan anticuerpos, estos persisten durante al menos 6 meses tras

la vacunación.³⁸⁴ De acuerdo con estos hallazgos que confirman una respuesta humoral variable pero subóptima entre los pacientes con LLC, varios grupos han investigado si una respuesta celular alterada, principalmente la respuesta T, podría contribuir al déficit de la respuesta inmunológica observada en estos pacientes tras la vacunación. Así, se ha constatado que en estos pacientes con LLC existe un aumento en sangre del número de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ tras la vacunación, asociado a respuestas citotóxicas (mediadas por los linfocitos T CD8⁺)³⁸⁰ y de tipo Th1, con aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas como IFN- γ , IL-2 y TNF- α en aproximadamente de 70% a 80% de los pacientes.^{379,380,383} Aun así, esta respuesta parece ser mucho más limitada y débil que la respuesta T observada en la población general.³⁸¹ En conjunto, estos hallazgos confirman que el sistema inmune de los pacientes con LLC es incapaz de generar en la mayoría de los casos, una respuesta eficaz a la vacunación frente a SARS-CoV-2, lo que hace necesaria la administración de múltiples dosis sucesivas de la vacuna para alcanzar un nivel de protección similar al descrito en la población general.^{383,385}

En sujetos con LBM^{hi} también se ha observado una respuesta humoral deficitaria frente a la vacunación contra SARS-CoV-2, aunque este déficit no es tan acentuado como el referido para los pacientes con LLC. Así, únicamente el 50% de los sujetos con LBM^{hi} mostraron niveles detectables de anticuerpos de isotipo IgG específicos frente a la proteína S tras la primera dosis de la vacuna (frente al 95% de seropositivos en la población general), elevándose el número de casos positivos al 90% tras la segunda dosis.³⁷⁹ Pese a que el porcentaje de casos positivos tras la segunda dosis de la vacuna en sujetos con LBM^{hi} es equiparable al de la población general, un estudio realizado por el mismo grupo ha demostrado que los sujetos con LBM^{hi} se ven beneficiados por dosis adicionales de la vacuna, alcanzándose entonces el 100% de sujetos seropositivos tras la cuarta dosis de la vacuna.³⁸⁵ Pese a estos hallazgos, hasta la fecha seguimos sin conocer si aquellos individuos que presentan LBM^{lo} tienen también una respuesta inmune deficitaria a la vacunación frente a SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta las evidencias descritas en esta memoria sobre el estado de inmunodeficiencia subyacente que ya presentan estos sujetos, nos parece que sería importante determinar si en estas etapas tan tempranas del espectro de la LBM a la LLC, los individuos portadores de pequeños clones linfoides B circulantes se podrían ver beneficiados o no por la inoculación de dosis adicionales de la vacuna, al igual que ocurre tanto en los sujetos con LBM^{hi} y, en mayor medida, en los pacientes con LLC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de la baja tasa de progresión observada a corto y medio plazo desde LBM^{lo} a formas más avanzadas de la enfermedad (es decir, a LBM^{hi} y a LLC),⁵⁶ la presencia de pequeños clones de linfocitos B circulantes con fenotipo similar a la LLC en sujetos por lo demás sanos, podría tener por sí misma una repercusión clínica más allá de la progresión leucémica, que vendría condicionada por el estado de inmunodeficiencia subyacente a esta entidad.^{24,56,87-90} Si además tenemos en cuenta la alta prevalencia de LBM^{lo} descrita en la población general adulta (por encima de un 14% de los adultos mayores de 40 años, si se emplean métodos de citometría de flujo de alta sensibilidad),^{18,24,27} la inmunodeficiencia asociada a la LBM^{lo} podría tener un gran impacto en el campo de la de salud pública, dado que se ha descrito que estos sujetos padecen infecciones más graves (que precisan hospitalización), junto a una mayor prevalencia de tumores hematológicos, e incluso una supervivencia significativamente más corta que aquellos sujetos sanos de su misma edad, sexo y área geográfica que no presentan LBM^{lo}.^{24,56,87} En este sentido, se ha descrito que los sujetos con LBM^{lo} presentan varias alteraciones en el sistema inmune que podrían explicar su estado de inmunodeficiencia y la correspondiente repercusión clínica de la misma. Hoy sabemos que estos defectos afectan especialmente al compartimento linfoide B, y se traducen en un descenso en el número de linfocitos B totales, especialmente de la subpoblación de linfocitos B pre-CG.^{10,88-90} A su vez, la disminución de los niveles de linfocitos B pre-CG resultaría en un repertorio más restringido de los linfocitos B naive, que redundaría en una limitación de la capacidad de generar respuestas inmunes eficaces frente a nuevos antígenos, y por tanto la producción de células efectoras productoras de anticuerpos con la capacidad de controlar este tipo de infecciones de manera eficiente, y un número adecuado de células B de memoria funcionales.^{88,89} Para confirmar la hipótesis de que los sujetos con LBM^{lo} tienen mermada su capacidad de generar una respuesta inmune eficaz frente a agentes patógenos, asociado a una mayor susceptibilidad para desarrollar infecciones más graves, resultaría esencial estudiar su respuesta inmune en diferentes modelos de infección, que nos permitan conocer en (más) detalle los defectos de la respuesta inmune celular y humoral asociada a la presencia de pequeños clones de linfocitos B (LBM^{lo}).

En diciembre de 2019 se identificó un nuevo virus hoy conocido como SARS-CoV-2, responsable de la nueva enfermedad infecciosa en humanos denominada COVID-19, que se expandió rápidamente a nivel mundial.^{115,117} Desde el inicio de la pandemia, la COVID-19 se

reveló como una enfermedad infecciosa asociada a un comportamiento clínico muy heterogeneo,^{16,17} que hoy sabemos está condicionado por numerosos factores de riesgo para desarrollar una COVID-19 grave, entre los que destacan la edad avanzada, el sexo masculino y la presencia de comorbilidades previas.^{186,187} No obstante, en muchos casos estos factores no son capaces de predecir de forma precisa el curso clínico y la futura evolución de la enfermedad.

Además de los factores antes descritos, sabemos que el sistema inmune del huésped también desempeña un papel esencial en el curso clínico de la COVID-19. En este sentido, se ha demostrado la importancia que tiene el desarrollo de una respuesta inmune eficiente en el control de la infección y en la eliminación completa del virus.^{131,132} Así, en los pacientes con COVID-19 grave se ha observado que la respuesta inmune está completamente desregulada, contribuyendo esta alteración de forma decisiva en la patogenia de los casos más graves.¹³⁴ Por este motivo, los últimos años se han llevado a cabo multitud de estudios dirigidos a investigar los distintos aspectos de la respuesta inmune en pacientes con COVID-19. Pese a la ingente cantidad de artículos publicados y de información generada con este propósito, merece destacar que muchos de estos trabajos presentan importantes limitaciones, que podrían influir en la interpretación correcta de los resultados. Entre estas limitaciones posibles merece destacar: i) la falta de controles sanos adecuados, que proporcionen unos valores de referencia apropiados a la hora de comparar las diferentes variables de la respuesta inmune analizadas y que sabemos se ven en gran medida influidas por la edad;^{90,307-309} ii) el diseño transversal de la inmensa mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, basados en un único punto de análisis a lo largo de la infección y/o con un tamaño muestral reducido; y iii) la falta de estandarización en cuanto al momento en el que se investiga la enfermedad, ya que en muchos trabajos se contabilizan los días de la enfermedad a partir del momento del ingreso de los pacientes en el hospital, cuando sería más correcto establecer como momento inicial (ante la imposibilidad de conocer exactamente el momento de la exposición al virus) el día de inicio de los síntomas asociados a la COVID-19, cubriendo así las fases más tempranas de la enfermedad. Si bien es cierto que la introducción de la vacunación frente a SARS-CoV-2 a nivel global, ha permitido investigar la respuesta inmune frente al virus en un entorno mucho más controlado, con las ventajas que aporta el poder conocer con exactitud el momento de exposición a las partículas virales inoculadas a través de la vacunación, y por lo tanto, obtener información acerca de los

momentos iniciales de la respuesta inmune, que no pudieron estudiarse en profundidad hasta la fecha en la COVID-19, debido a la dificultad en conocer el momento exacto del primer contacto con el virus.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos la hipótesis de que los individuos con LBM^{lo}, portadores de un sistema inmune deficitario, podrían tener una capacidad (más) limitada de generar una respuesta inmune adecuada frente a SARS-CoV-2, lo cual redundaría en el desarrollo de una COVID-19 más grave y de una respuesta a la vacunación deficitaria respecto a los sujetos sanos de edad similar que no presentan LBM^{lo}. Sobre esta hipótesis, nos propusimos como **objetivo general** evaluar el estado del sistema inmune en su conjunto, y del compartimento de células B en particular, en la respuesta a la infección por SARS-CoV-2 en sujetos con LBM^{lo}, tomando a la COVID-19 como modelo de infección “de novo”. Para alcanzar este objetivo, nos planteamos tres **objetivos específicos**:

1. Determinar la prevalencia de LBM^{lo} en pacientes con COVID-19, y evaluar su posible impacto en la gravedad del curso clínico y la evolución de la enfermedad.
2. Analizar de forma detallada la cinética en sangre de las diferentes poblaciones de células del sistema inmune y de los niveles de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con LBM^{lo}, comparándola con la observada en sujetos sin LBM infectados por SARS-CoV-2, tanto durante la COVID-19 como tras la infección.
3. Investigar los cambios que se producen de forma temprana tras la vacunación frente al virus SARS-CoV-2 en la distribución de las distintas poblaciones de leucocitos y de los anticuerpos específicos frente a la proteína *spike* del SARS-CoV-2, en individuos sanos sin LBM, y compararlo con la cinética de la respuesta celular y humoral tras la vacunación de sujetos aparentemente sanos que presentan LBM^{lo}.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

En esta sección de la memoria se describen los pacientes, los materiales, y los métodos empleados, así como los resultados obtenidos, en relación con cada uno de los objetivos planteados en este trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos científicos originales publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos está precedido de un breve resumen en castellano, con el objetivo de facilitar una rápida revisión del contenido de los mismos.

ARTÍCULO 1

“Elevada frecuencia de linfocitosis B monoclonal de bajo recuento en pacientes hospitalizados por COVID-19”

Guillermo Oliva-Ariza^{#1,2}, Blanca Fuentes-Herrero^{#1,2}, Cristina Carbonell^{2,3}, Quentin Lecrevisse^{1,2,4}, Alba Pérez-Pons^{1,2}, Alba Torres-Valle^{1,2}, Julio Pozo^{1,2}, José Ángel Martín-Oterino^{2,3}, Óscar González-López^{1,2}, Amparo López-Bernús^{2,3,4}, Marta Bernal-Ribes¹, Moncef Belhassen-García^{2,3,4}, Oihane Pérez-Escorza^{1,2}, Martín Pérez-Andrés^{1,2,5}, Lourdes Vazquez^{2,6}, Guillermo Hernández-Pérez³, Francisco Javier García Palomo⁷, Pilar Leoz^{2,6}, Pilar Costa-Alba^{2,8}, Elena Pérez-Losada^{2,9}, Ana Yeguas^{2,6}, Miryam Santos Sánchez^{1,2}, Marta García-Blázquez⁶, F. Javier Morán-Plata^{1,2}, Daniela Damasceno^{1,2,5}, Vitor Botafogo^{1,2}, Noemí Muñoz-García^{1,2}, Rafael Fluxa¹⁰, Teresa Contreras-Sanfeliciano¹¹, Julia Almeida^{*1,2,5}, Miguel Marcos^{*2,3}, Alberto Orfao^{*1,2,5}

¹Programa de Investigación Clínica y Traslacional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC – Universidad de Salamanca); Servicio de Citometría, NUCLEUS; Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España.

³Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁴Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, España.

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

⁶Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁷Banco Nacional de ADN, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁸Servicio de Urgencias, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁹Servicio de Cuidados Intensivos, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹⁰Cytognos SL, Salamanca, España.

¹¹Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

#GO-A y BF-H han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor del mismo.

*JA, MM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor del mismo.

Blood, 19 de enero de 2023; 141 (3): 309–314.

DOI: 10.1182/blood.2022017439

PMID: 36399707

PMCID: PMC9906370

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I disponible al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento (LBM^{lo}) es una condición muy frecuente en la población general adulta, cuya prevalencia oscila entre un 4% y un 16%, dependiendo principalmente de la sensibilidad de la técnica de diagnóstico utilizada. En la mayoría de los casos, los linfocitos B clonales circulantes en la sangre periférica (SP) presentan un inmunofenotipo indistinguible del de las células B clonales de la leucemia linfática crónica (LLC); a pesar de estas semejanzas, actualmente se desconoce la relación precisa entre la LBM^{lo} y la LLC, habiéndose descrito en estudios de seguimiento longitudinal a medio/largo plazo una tasa anual de progresión de la LBM^{lo} a fases más avanzadas (LBM de alto recuento, LBM^{hi}) muy baja ($\approx 0,2\%$) en ausencia de transformación leucémica. No obstante, numerosas evidencias sugieren que, de forma similar a la LBM^{hi} y la LLC, los sujetos con LBM^{lo} presentan ya un riesgo (más) elevado de sufrir infecciones graves, asociado a una inmunodeficiencia secundaria (preferentemente de tipo humoral). Por tanto, la LBM^{lo} podría constituir por sí misma un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones graves.

En diciembre de 2019 se identificó por primera vez una nueva infección en humanos, la COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2 y que se expandió rápidamente afectando a millones de personas en todo el mundo. Desde el punto de vista clínico, la COVID-19 se caracteriza por mostrar una gran heterogeneidad, transcurriendo la infección de forma leve e incluso asintomática en algunos pacientes, en contraposición con otros en los que muestra un comportamiento muy grave, con requerimiento de soporte en unidades de cuidados intensivos (UCI), llegando incluso a la muerte del paciente. Desde entonces, numerosos estudios han identificado una serie de factores de riesgo asociados a una mayor gravedad de la COVID-19, entre los que se encuentran una edad más avanzada, el sexo masculino y la presencia de diferentes comorbilidades. Sin embargo, estos factores en su conjunto no predicen de forma precisa el curso clínico y la evolución de la enfermedad a nivel individual, especialmente en lo que respecta a la edad, ya que muchos de los pacientes más mayores sufren formas leves de la COVID-19, sin mayor relevancia clínica. Por otro lado, varios trabajos han puesto de manifiesto la importancia de generar una respuesta inmune específica frente al virus, adecuada para lograr el control de la enfermedad y la eliminación completa del SARS-CoV-2.

Objetivo. En esta sección del trabajo doctoral nos propusimos investigar la prevalencia de LBM^{lo} en pacientes con COVID-19 durante las dos primeras olas de la pandemia respecto a la frecuencia de LBM^{lo} encontrada en la población general adulta de la misma área geográfica, y analizar su posible impacto en la gravedad de la infección por SARS-CoV-2.

Pacientes, material y métodos. En este estudio se incluyeron un total de 249 pacientes (133 hombres / 116 mujeres; mediana de edad de 60 años [rango: 18 – 99 años]) que fueron atendidos por COVID-19 en el Hospital Universitario de Salamanca entre abril de 2020 y abril de 2021, ninguno de los cuales había sido vacunado previamente frente a SARS-CoV-2. Como grupo control, se incluyeron en el estudio 728 adultos sanos (333 hombres / 395 mujeres; mediana de edad de 61 años [rango: 25 – 97 años]) provenientes del área geográfica de Salamanca, y que habían sido reclutados y estudiados antes del inicio de la pandemia. En todos los pacientes y los controles se analizó la presencia de linfocitos B clonales circulantes en SP mediante el uso de citometría de flujo de alta sensibilidad, consistente en el marcaje de las muestras de SP con paneles de anticuerpos de 8 colores y su posterior medición (mínimo de 10×10^6 leucocitos/muestra) en un citómetro de flujo FACSCanto II y/o FACSLyric. La (semi)cuantificación de los niveles plasmáticos de anticuerpos de isotipos IgM, IgG e IgA frente a las proteínas *spike* (S) y nucleocápside (N) de SARS-CoV-2 se realizó mediante la técnica de ELISA convencional. El análisis del impacto de la LBM^{lo} en el riesgo de hospitalización por COVID-19 se llevó a cabo utilizando un modelo multivariante de regresión logística binaria.

Resultados. Globalmente, detectamos la presencia de LBM^{lo} en 73/249 (29%) pacientes con COVID-19, representando esta frecuencia más del doble de la observada previamente en la población general adulta de Salamanca (99/728; 14%; $P \leq 0,0001$). Además, al restringir el análisis de prevalencia únicamente a los pacientes con formas más graves de COVID-19 (aquellos que necesitaron hospitalización y/o ingreso en UCI), la frecuencia de LBM^{lo} observada era aún mayor (54/135, 40%; $P \leq 0,0001$). Al igual que se observa en la población general, la prevalencia de LBM^{lo} en los pacientes COVID-19 aumentó progresivamente con la edad, sobre todo a partir de los 50 años. El fenotipo de los linfocitos B clonales identificados en los pacientes con COVID-19 era mayoritariamente de tipo LLC (67/73, 92%), mientras que el resto de los casos presentaban

un fenotipo compatible con una LBM^{lo} de tipo no-LLC (6/73, 8%). En 40/73 pacientes con COVID-19, se llevó a cabo una reevaluación de estos sujetos un año después del diagnóstico, para confirmar la persistencia en SP en el tiempo de los linfocitos B clonales, observándose que en prácticamente todos los sujetos reevaluados (38/40, 95%) se confirmaba en la reevaluación la presencia de LBM^{lo}, con un tamaño y fenotipo del clon similar al detectado en el momento del diagnóstico.

Respecto a las características clínicas de la enfermedad, los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} presentaban con mayor frecuencia comorbilidades que los que no tenían LBM. Sin embargo, estas diferencias parecían estar relacionadas directamente con la edad, ya que, con la excepción del porcentaje de casos con enfermedades cardiovasculares (30% vs. 19%, $P=0,05$), todas las demás diferencias desaparecieron al restringir la comparación a los pacientes mayores de 50 años. Por otro lado, los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} refirieron un conjunto de síntomas asociados a una enfermedad más grave, entre los que destaca una frecuencia mayor de disnea, junto con una frecuencia más baja de mialgia, congestión nasal y náuseas. Asimismo, los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} presentaron en el momento del ingreso hospitalario unos parámetros de laboratorio más alterados que los pacientes sin LBM, como una ratio de saturación de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno (SaFi) inferior, y niveles séricos más elevados de fibrinógeno y creatinina. Como consecuencia de las alteraciones más acusadas observadas en los sujetos con LBM^{lo}, estos pacientes precisaron con más frecuencia de ingreso, tanto hospitalario como en la UCI, junto a un mayor requerimiento de oxigenoterapia, asociado a estancias hospitalarias más prolongadas. Globalmente, todo esto se tradujo en una mayor frecuencia de casos graves/muy graves de la COVID-19 entre los pacientes con LBM^{lo} respecto a los que no presentaban LBM.

La distribución en SP de las poblaciones leucocitarias estaba muy alterada en ambos grupos de pacientes (vs. controles sanos prepandemia), reflejando a su vez los cambios descritos de forma general en los pacientes con COVID-19. Ambos grupos de pacientes presentaban unos perfiles muy similares en la distribución de las poblaciones leucocitarias, observándose únicamente diferencias significativas entre ellos en el número absoluto de linfocitos B una vez pasada la fase activa de la enfermedad (más reducido en los pacientes con LBM^{lo} respecto a los que no tenían LBM: 143 [111 – 263] vs. 200 [155 – 300], respectivamente; $P=0,04$). Por el

contrario, los niveles plasmáticos de anticuerpos frente a las proteínas S y N de SARS-CoV-2 sí mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, consistentes en una frecuencia mayor de casos positivos para los tres isotipos de inmunoglobulina analizados en los pacientes con LBM^{lo} (vs. los que no tenían LBM); además, esta mayor tasa de seroconversión se asoció también con unos títulos de anticuerpos más elevados durante la fase activa de la infección en los pacientes COVID-19 con LBM^{lo}, entre los que permanecían más elevados los niveles de anticuerpos de isotipo IgA durante los primeros meses tras la infección.

Un análisis multivariante reveló que la presencia de LBM^{lo} tenía un impacto independiente en el riesgo de hospitalización por COVID-19, junto con la presencia de disnea y fiebre al ingreso, el sexo masculino, niveles bajos de eosinófilos, linfocitos B y células NK, y cifras más elevadas de granulocitos neutrófilos, además de la presencia de anticuerpos de isotipo IgA específicos frente a la proteína N del virus.

Conclusiones. La prevalencia de LBM^{lo} en los pacientes con COVID-19 es aproximadamente del doble de la observada previamente en la población general adulta de Salamanca, aumentando significativamente en los pacientes con COVID-19 más grave (hospitalizados e ingresados en UCI). Además, la LBM^{lo} se asocia con una mayor gravedad de la COVID-19. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la LBM^{lo} debiera considerarse como un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de una COVID-19 más grave. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la LBM^{lo} en la población general adulta, la presencia de esta entidad podría llegar a representar un problema de salud global, ya que los sujetos con LBM^{lo} serían más propensos a sufrir infecciones más graves, pudiendo incluso desarrollar respuestas deficientes frente a la vacunación.

TO THE EDITOR:

High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients

Guillermo Oliva-Ariza,^{1-3,*} Blanca Fuentes-Herrero,^{1-3,*} Cristina Carbonell,^{2,4} Quentin Lecrevisse,^{1-3,5} Alba Pérez-Pons,¹⁻³ Alba Torres-Valle,¹⁻³ Julio Pozo,¹⁻³ José Ángel Martín-Oterino,^{2,4} Óscar González-López,¹⁻³ Amparo López-Bernús,^{2,5} Marta Bernal-Ribes,^{1,3} Moncef Belhassen-García,^{2,5} Oihane Pérez-Escorza,¹⁻³ Martín Pérez-Andrés,^{1-3,6} Lourdes Vazquez,^{2,7} Guillermo Hernández-Pérez,^{3,4} Francisco Javier García Palomo,⁸ Pilar Leoz,^{2,7} Pilar Costa-Alba,^{2,9} Elena Pérez-Losada,^{2,10} Ana Yeguas,^{2,7} Miryam Santos Sánchez,¹⁻³ Marta García-Blázquez,⁷ Francisco Javier Morán-Plata,¹⁻³ Daniela Damasceno,^{1-3,6} Vitor Botafogo,¹⁻³ Noemí Muñoz-García,¹⁻³ Rafael Fluxa,¹¹ Teresa Contreras-Sanfeliciano,¹² Julia Almeida,^{1-3,6,†} Miguel Marcos,^{2-4,†} and Alberto Orfao^{1-3,6,†}

¹Translational and Clinical Research Program, Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), and University of Salamanca (Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain; ²Cytometry Service (NUCLEUS), Salamanca, Spain; ³Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ⁴Department of Medicine, University of Salamanca (Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain; ⁵Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁶Department of Infectious Diseases, University Hospital of Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, Spain; ⁷Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁸Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁹Spanish National DNA Bank Carlos III, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁰Emergency Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹¹Intensive Care department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹²Cytognos SL, Salamanca, Spain; and [†]Department of Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{lo}, <500 clonal B-cells/ μ L) is a highly prevalent condition in the general population (4% to 16% of otherwise healthy adults), which increases significantly with age.¹⁻⁷ In most cases, clonal B-cells share phenotypic and cytogenetic features with chronic lymphocytic leukemia (CLL), but only a small fraction (\approx 1.8%) progresses to high-count MBL (MBL^{hi}; \geq 500 and <5000 clonal B-cells/ μ L)³ in the medium-term.⁸ However, previous reports showed that MBL^{lo} subjects had an increased risk of severe infections in association with a (predominantly) secondary antibody deficiency,⁸⁻¹⁰ suggesting that MBL^{lo} might be a risk marker for developing more severe infections.

In December 2019, COVID-19 emerged as a new disease in humans, with a highly variable clinical course and outcome.^{11,12} Since then, myriad studies have shown an association between a more aggressive clinical behavior of the disease and both advanced age^{13,14} and the coexistence of particular comorbidities.¹²⁻¹⁵ In parallel, several studies have confirmed the relevance of an adequate and virus-specific immune response for the control of the disease.^{13,16} Despite these findings, all the above features alone fail to accurately predict the risk of more-severe COVID-19, particularly among older adults.

Here, we investigated the frequency of MBL^{lo} in COVID-19 patients in the first waves of the infection (prior to vaccination), compared to that in the general population of the same geographic region studied before the pandemic, and its potential association with disease severity. For this purpose, we studied 249 COVID-19 patients (133 men and 116 women; median age, 60 years [range: 18-99 years]) who were attended to at the University Hospital of Salamanca between April 2020 and April 2021, together with 728 healthy controls (333 men and 395 women; median age, 61 years [range: 25-97 years])

recruited from the same geographic area before the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic. Identification of clonal B-cells and leukocyte subpopulations in blood was performed using high-sensitivity flow cytometry. (Semi)quantitation of IgM, IgG, and IgA plasma levels against the spike (S) and nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2 was performed using enzyme-linked immunosorbent assay. Diagnostic and classification criteria for COVID-19 and disease severity, inclusion and exclusion criteria, and the clinical and biological characteristics of patients (according to the methods used), together with the flow-cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay protocols are detailed in the supplemental Methods, available on the *Blood* website; supplemental Tables 1-3. A multivariable regression model (binary logistic regression) was used to assess the independent contribution of MBL^{lo} to the risk of hospitalization for COVID-19 (supplemental Methods; supplemental Table 12).

Overall, the presence of MBL^{lo} was detected in 73 of 249 COVID-19 patients (29%), a frequency twice that observed in the general population (99 of 728, 14%; $P < .0001$; [Figure 1A](#)).⁶ Noteworthy, the prevalence of MBL^{lo} was even higher in patients admitted to the hospital (54 of 135, 40%; $P < .0001$; [Figure 1B](#)), including critically ill patients (12 of 31, 39%; $P = .0007$; [Figure 1C](#)). As expected, the frequency of MBL^{lo} among COVID-19 patients progressively increased with age ([Figure 1](#)),⁴⁻⁷ with a significantly higher prevalence of MBL^{lo} among patients aged \geq 50 years vs age-matched controls: 29 of 89 (33%) vs 39 of 312 (13%) in subjects aged 50 to 70 years ($P < .0001$); and 40 of 82 (49%) vs 51 of 227 (22%) among adults aged >70 years ($P < .0001$). Most MBL^{lo} patients displayed B-cell clones with a CLL-like phenotype (67 of 73, 92%), whereas non-CLL-like clonal B-cells were detected in 6 of 73 COVID-19 patients (8%). This incidence led to an overall

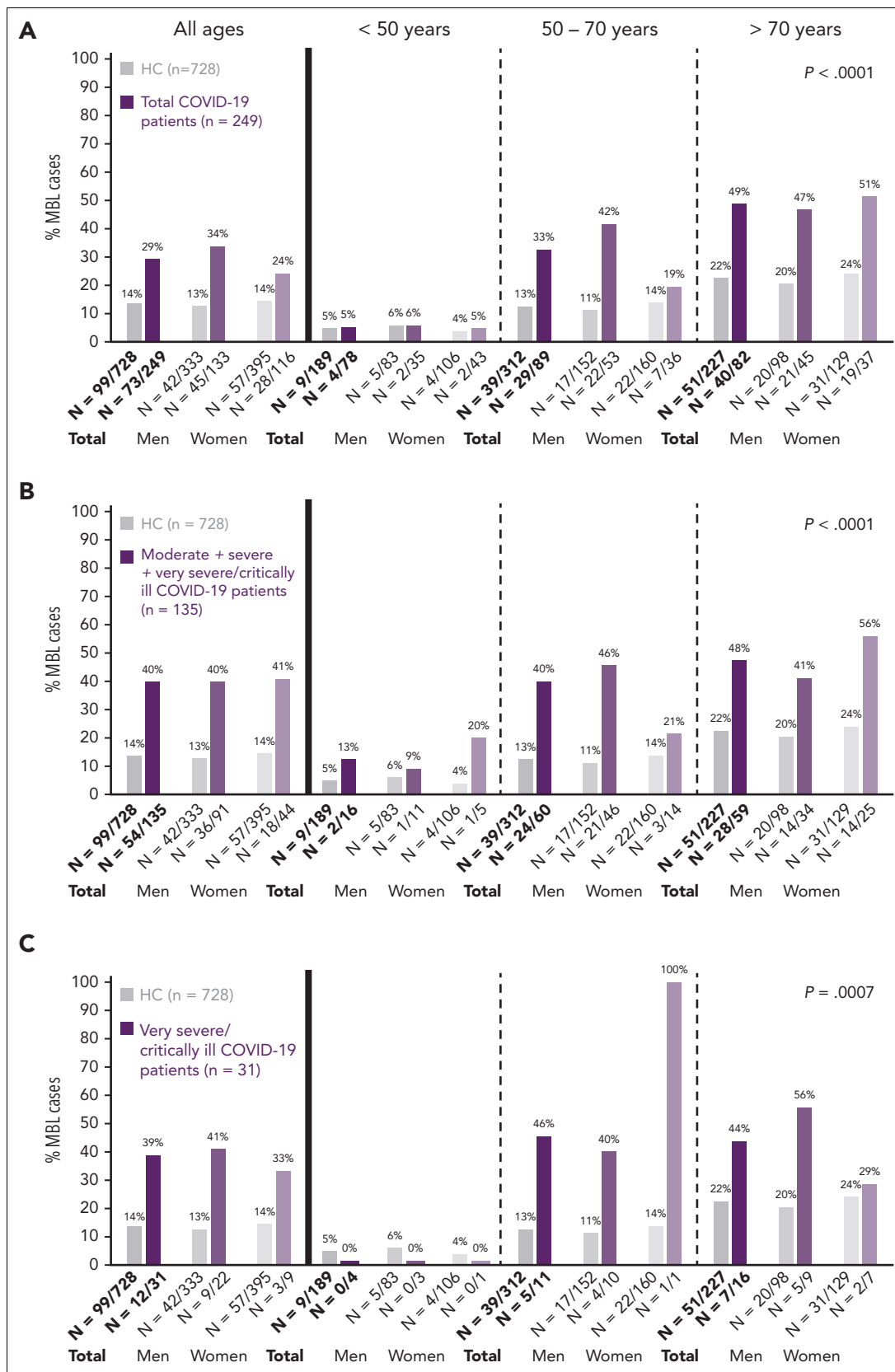


Figure 1. Frequency of MBL cases in COVID-19 patients vs the general population from the same geographic area studied before the SARS-CoV-2 pandemic. (A) Frequency of MBL among all COVID-19 patients, as well as (B) patients with moderate, severe, or very severe COVID-19, or (C) only very severe COVID-19, compared to healthy controls. (A-C) Further comparisons by sex and age groups. Gray bars represent the percentage of MBL cases in the general population, and dark bars represent the percentage of MBL cases among COVID-19 patients. Numbers over the bars are the percentage of MBL cases for each group. HC, healthy control.

prevalence of CLL-like MBL and non CLL-like MBL among COVID-19-infected patients of 27% (vs 12% in the general population aged >40 years, $P < .0001$)⁶ and 2% (vs 2%, $P = .59$),¹⁷ respectively. In all CLL-like MBL^{lo} cases, a diagnosis of small lymphocytic lymphoma was ruled out by a hematologist at post-COVID-19 reassessment (38 of 38, 100%), based on the absence of organomegalies and other symptoms/signs of an underlying chronic lymphoproliferative disorder. The median (interquartile range) clone size of the MBL^{lo} clones at diagnosis was 0.25 (0.07-3.83) cells/ μ L. Persistence of MBL^{lo} at 1 year after onset of the disease was studied in 40 of 73 MBL^{lo} patients, from which the vast majority (38 of 40; 95%) showed detectable clonal B-cells in blood at levels similar to those in the first analysis (median of 0.21 [0.1-1.6] cells/ μ L after 1 year, $P = .94$ vs the first analysis).

In line with these findings, MBL^{lo} COVID-19 patients showed features of more severe COVID-19, including a higher frequency of dyspnea (67% vs 49%; $P = .02$), and a lower frequency of myalgia (18% vs 41%, $P = .001$; and 19% vs 37%, $P = .01$), nasal congestion/rhinorrhea (4% vs 23%, $P = .002$; and 4% vs 22%, $P = .005$), and nausea and/or vomiting (6% vs 18%, $P = .009$; and 4% vs 21%, $P = .002$), both in the whole cohort and in patients aged ≥ 50 years (supplemental Tables 4 and 6). Furthermore, MBL^{lo} COVID-19 patients had lower oxygenation (oxygen saturation to fraction of inspired oxygen ratio [SpO₂/FiO₂] of 350 vs 443; $P = .001$), and higher serum levels of fibrinogen (600 vs 517 mg/dL; $P = .02$) and creatinine (1.05 vs 0.94 mg/dL; $P = .02$; supplemental Table 5). Consequently, MBL^{lo} COVID-19 patients showed an increased need for hospitalization (85% vs 60%, $P < .0001$), oxygen therapy (70% vs 39%, $P < .0001$), and intensive care unit support (15% vs 6%, $P = .02$), together with longer hospitalization periods (median: 14 vs 10 days, $P = .03$; hazard ratio = 1.34). Despite this, the 2 patient groups showed similarly low death rates directly related to COVID-19 (4 of 132 non-MBL, 3% vs 2 of 73 MBL^{lo}, 3%; $P = .95$; supplemental Table 4). Three of these 6 patients died during the active phase of the infection, none of them carrying MBL clones, meaning that the 2 MBL^{lo} subjects died after testing negative for SARS-CoV-2. CLL-like MBL^{lo} and non-CLL-like MBL^{lo} COVID-19 patients did not show differences in their clinical features, although the low number of non-CLL-like MBL^{lo} cases does not allow a definitive conclusion in this regard. Altogether, these results support recent evidence indicating that CLL and MBL^{hi} patients are at greater risk of severe COVID-19,¹⁸ and they have poorer antibody responses to SARS-CoV-2 (and other viral and bacterial) vaccination,¹⁹ which corroborates an increased risk for severe infections among MBL^{lo} subjects.¹⁰

Controversial results have been reported in the literature, as regards the prevalence of MBL^{lo} in men vs women in the general population.^{6,7,20} Here, we observed a similar prevalence of MBL^{lo} in the 2 groups of subjects from the general population (34% in men vs 24% in women, $P = .06$), in line with our previous observations (Figure 1).⁶ In contrast, a clear predominance of MBL^{lo} in men was found among COVID-19 patients within the 50- to 70-year age range (42% vs 19%, $P = .03$), in line with findings in previous reports.^{7,20} Several studies have unveiled a disproportionately high rate of severe COVID-19 among adult men, compared to the rate in women, particularly in the elderly,^{13,14} together with a greater prevalence of comorbidities,

which might partially explain the association with more severe disease in men aged ≥ 50 years.¹²⁻¹⁵ In our cohort, MBL^{lo} patients also exhibited more comorbidities than did non-MBL cases (70% vs 47%, $P = .001$; supplemental Table 4). However, except for the presence of cardiovascular disease (30% vs 19%; $P = .05$; supplemental Table 6), the greater frequency of all other comorbidities found in MBL^{lo} COVID-19 patients appeared to be related to more advanced age among the former patients, as differences disappeared in older adults (supplemental Table 6).

To identify potential differences in the distribution of immune cells in blood between MBL^{lo} and non-MBL COVID-19 patients that could be associated with the severity of the disease and reflect an immunodeficient state, we further investigated the distribution of major leukocyte (sub)populations in the blood of individuals with MBL^{lo} vs without MBL during the acute phase of infection and after recovery from COVID-19. Overall, highly similar immune-cell profiles were found in the 2 groups of patients, reflecting changes that have been reported on extensively in COVID-19 patients (supplemental Tables 8-11).^{16,21-23} In contrast, significant differences were observed in total B-cell counts of patients after recovery from COVID-19, associated with lower levels in blood among those who showed MBL^{lo} (vs non-MBL; 143 vs 200 B-cells/ μ L; $P = .04$; supplemental Table 9). This finding suggests that MBL^{lo} subjects have a defective ability to adequately recover B-cells after infection, which is consistent with our previous data suggesting that B-cell production is impaired, probably associated with a progressively reduced B-cell repertoire within the pre-germinal B-cell compartment in MBL^{lo}.²⁴ These findings prompted us to investigate the SARS-CoV-2-specific antibody responses in both group of patients.

Overall, most COVID-19 patients with or without MBL^{lo} had already produced IgM, IgA, and IgG SARS-CoV-2-specific antibodies against either N or S viral proteins during the acute phase of infection (141 of 153, 92%). Subsequently, IgM and IgA levels declined, whereas IgG plasma levels remained elevated in most cases for at least 3 months after infection, with a similar pattern for antibodies against S and N viral proteins in the whole series (Figure 2). Yet, we observed important differences in the serologic responses of MBL^{lo} vs non-MBL patients during the acute phase of infection that were independent of the specificity of the antibodies (anti-S or anti-N). These differences consisted of the following: a higher percentage of MBL^{lo} (vs non-MBL) cases with detectable anti-SARS-CoV-2 IgM (136 of 144 [94%] vs 170 of 198 [86%], $P = .01$ for anti-S IgM; and 88 of 145 [61%] vs 94 of 198 [47%], $P = .02$ for anti-N IgM), IgG (132 of 144 [92%] vs 148 of 198 [75%], $P < .0001$ for anti-S IgG; and 134 of 145 [92%] vs 152 of 198 [77%], $P < .0001$ for anti-N IgG), and anti-N IgA (130 of 144 [90%] vs 156 of 198 [79%], $P = .005$ for anti-S IgA; and 131 of 145 [92%] vs 148 of 198 [75%], $P < .0001$ for anti-N IgA) antibodies, together with higher titres of SARS-CoV-2-specific anti-S IgM (3813 AU/ml vs 2965 AU/ml; $P = .0002$), anti-S IgG (97 AU/ml vs 89 AU/ml; $P = .03$), and anti-N IgA (186 AU/ml vs 149 AU/ml; $P = .009$) during the acute phase of the infection, and higher levels of anti-S IgA (97 AU/ml vs 37 AU/ml; $P = .04$) early after recovery, but lower anti-S IgA titres (9 AU/ml vs 55 AU/ml, $P = .006$) after later [median: 253 days] time points; (Figure 2). Previous studies have found a direct relationship

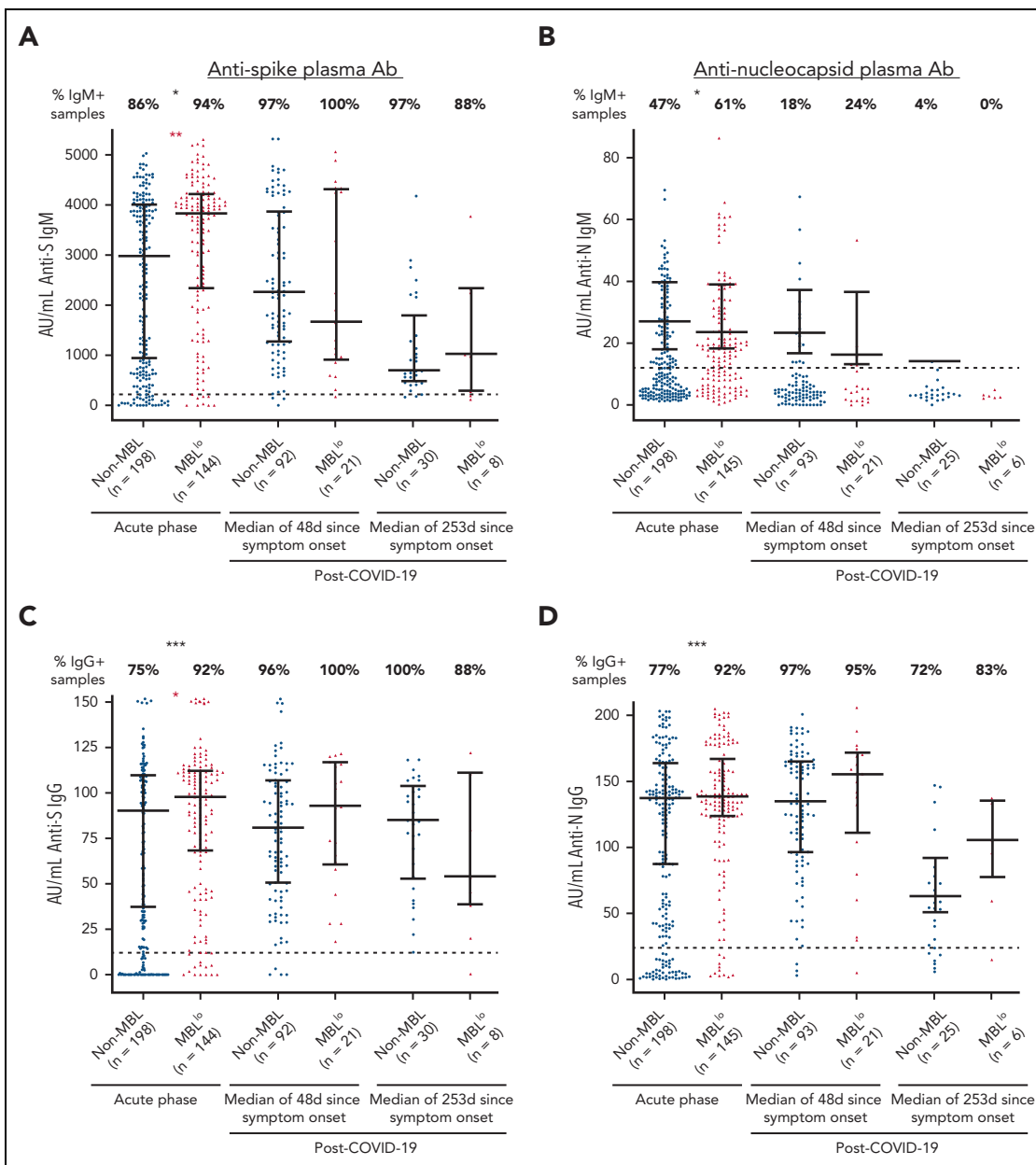


Figure 2. Levels of anti-SARS-CoV-2 antibodies (Abs) in plasma of COVID-19 patients according to the presence vs absence of MBL^{lo}. Levels (AU/mL) in plasma of COVID-19 patients of specific antibodies against the (left panels) spike and (right panels) nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2, classified by isotype: (A-B) IgM, (C-D) IgG, and (E-F) IgA. COVID-19 patients without MBL are represented by blue dots, and those with MBL^{lo} by red triangles, and they are grouped according to the stage of infection (active vs early post-COVID-19 vs late post-COVID-19). Numbers on the top of the graphs indicate the percentage of positive samples for each group. The top and bottom lines represent the 25th and 75th percentiles, and the line in the middle represents median values of positive samples. Dashed lines represent the positivity cut-off for each antibody isotype (220 AU/mL for IgM, 12 AU/mL for IgG, and 2 AU/mL for IgA against spike, and 12 AU/mL for IgM and 24 AU/mL for both IgG and IgA against nucleocapsid). * $P < .05$, ** $P < .005$, *** $P < .0005$ non-MBL vs MBL cases.

between the severity of the infection and higher levels of SARS-CoV-2-specific antibodies in serum/plasma, which might be required for complete clearance of the greater viral load in patients who are experiencing more severe disease, as observed in MBL^{lo} patients in this study.^{22,25} Despite this relationship, recent reports indicate that both MBL^{hi} and CLL patients display decreased responses to vaccination against SARS-CoV-2 and other viral/bacterial agents.¹⁹ Therefore, the higher levels of antibodies against SARS-CoV-2 found in our cohort of MBL^{lo} patients could reflect a delayed immune response to clear the virus in patients with more-severe

COVID-19. Altogether, these findings suggest that such impaired humoral responses might emerge at an earlier MBL^{lo} stage.

A multivariate analysis was subsequently performed to identify those clinical, laboratory, and biological variables that were independently associated with a higher risk of hospitalization for COVID-19. Thus, the presence of MBL^{lo} was selected as an independent marker associated with an adverse risk (odds ratio: 2.97; 95% confidence interval: 1.19-7.42; $P = .02$) of hospitalization, together with the presence of dyspnea ($P < .0001$) and

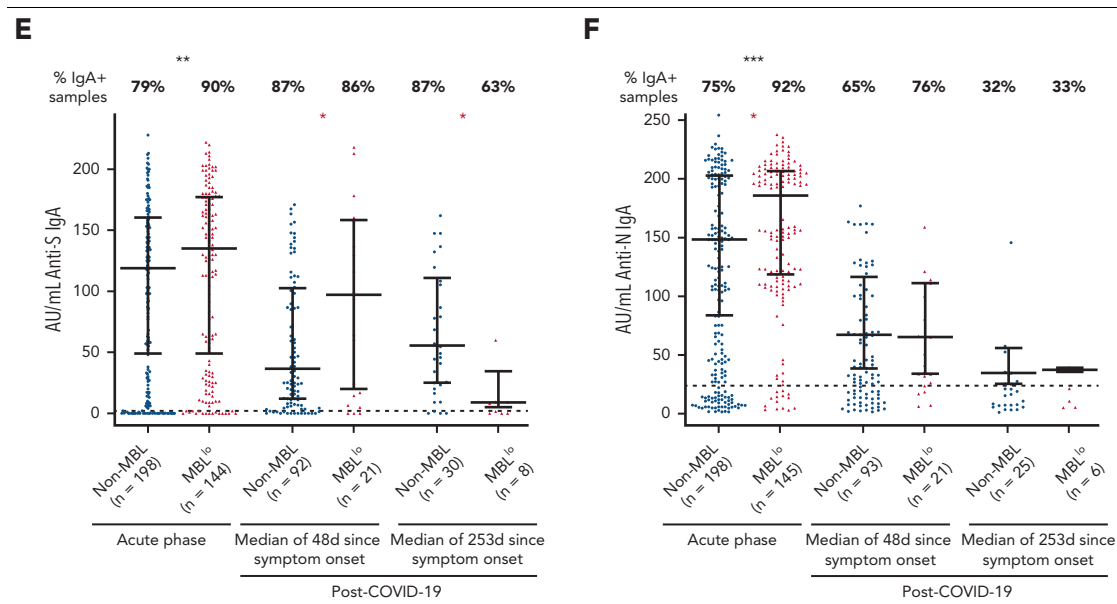


Figure 2 (continued)

fever ($P = .004$) at presentation, male sex ($P = .01$), more profound eosinopenia ($P < .0001$), and higher neutrophilia ($P = .007$), together with lower B-cell ($P = .01$) and NK cell ($P = .02$) levels, and a greater frequency of positivity for anti-N SARS-CoV-2 IgA ($P < .0001$) antibodies in plasma (supplemental Table 12). These results confirm the independent contribution of MBL^{lo} to the development of severe COVID-19.

In summary, here we report for the first time a higher frequency of MBL^{lo} among COVID-19 patients referred to a tertiary hospital during the first year of the SARS-CoV-2 pandemic, compared to that observed in the general population from the same geographic area, particularly among hospitalized patients with more-severe disease. Based on our results and previous data from the literature, MBL^{lo} emerges as a new independent risk marker for more-severe COVID-19, and therefore, it might represent a major public health concern, as subjects with an MBL^{lo}-associated impaired immunity are more likely to suffer from other (eg, respiratory) severe infections and to develop inadequate responses to vaccination.

Acknowledgments

The authors thank the patients and the Spanish National DNA Bank (Banco Nacional de ADN Carlos III, University of Salamanca, PT20/00085, integrated in the Biobanks and Biomodels Platform) for their support. The authors thank the following researchers, for their contribution to this study: María Laura Gutierrez, Jose Ignacio Sanchez Gallego, Cristina Teodosio, Ignacio Criado, Andrés García Montero, Carlos Pedreira, Rennan Gaio, and Pedro Luis Sánchez.

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain, and FONDOS FEDER (a way to build Europe) grants CB16/12/00400 (CIBERONC), COV20/00386, and P117/00399; the Consejería de Educación and the Gerencia Regional de Salud, Consejería de Sanidad from Junta de Castilla y León (Valladolid, Spain) grants SA109P20 and GRS-COVID-33/A/20; the European Regional Development Fund (INTERREG POCTEP Spain-Portugal) grant 0639-IDIAL-NET-3-3; and the CRUK (United Kingdom), Fundación AECC (Spain), and Associazione Italiana per la Ricerca Sul Cancro (Italy)

“Early Cancer Research Initiative Network on MBL (ECRINM3)” ACCELERATOR award. G.O.-A. is supported by a grant from the Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (Valladolid, Spain); B.F.-H. was supported by grant 0639-IDIAL-NET-3-3.

Authorship

Contribution: J.A., M.M., and A.O. contributed to the conceptualization, design, and supervision of the study, as well as to recruitment of funding; G.O.-A., B.F.-H., A.P.-P., A.T.-V., J.P., Ó.G.-L., M.B.-R., O.P.-E., F.J.G.P., M.S.S., and T.C.-S. performed the experiments; G.O.-A., B.F.-H., Q.L., A.P.-P., A.T.-V., M.B.-R., M.P.-A., F.J.M.-P., D.D., V.B., N.M.-G., R.F., J.A., and A.O. analyzed and interpreted data; C.C., J.Á.M.-O., A.L.-B., M.B.-G., L.V., G.H.-P., P.L., P.C.-A., E.P.-L., A.Y., M.G.-B., and M.M. selected cases for the study and collected their relevant clinical information; G.O.-A., B.F.-H., C.C., J.A., M.M., and A.O. coordinated the planning and execution of the experiments; G.O.-A., B.F.-H., J.A., and A.O. had full access to and verified the underlying data; G.O.-A., J.A., M.M., and A.O. wrote the paper; all authors critically reviewed the manuscript and approved the final version of the document.

Conflict-of-interest disclosure: A.O. and J.A. report being among the inventors of the EuroFlow-owned European patent 119646NL00 registered on November 2019 (“Means and methods for multiparameter flow cytometry-based leukocyte subsetting”) and are also authors of the PCT patent WO 2010/ 140885A1 (“Methods, reagents and kits for flow cytometric immunophenotyping”). The Infinicyt software is based on intellectual property of the University of Salamanca in Spain. All above mentioned intellectual property and related patents are licensed to Cytognos (Salamanca, Spain) and Becton/Dickinson Biosciences (San José, California), and these companies pay royalties to the EuroFlow Consortium. These royalties are exclusively used for continuation of the EuroFlow collaboration and sustainability of the EuroFlow Consortium. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: G.O.-A., 0000-0002-9653-9849; B.F.-H., 0000-0002-4038-8439; C.C., 0000-0002-6271-5111; Q.L., 0000-0001-8715-5846; A.P.-P., 0000-0002-5805-1391; J.Á.M.-O., 0000-0002-5598-5180; Ó.G.-L., 0000-0002-4169-4294; A.L.-B., 0000-0002-7524-4056; M.B.-G., 0000-0002-2230-1256; G.H.-P., 0000-0001-8610-5425; F.J.G.P., 0000-0003-3974-0308; P.C.-A., 0000-0001-5677-9066; E.P.-L., 0000-0001-8205-5344; M.S.S., 0000-0003-3129-1712; N.M.-G., 0000-0002-8381-301X; J.A., 0000-0003-3124-8917; M.M., 0000-0003-1269-4487.

Correspondence: Alberto Orfao, Cancer Research Center (IBMCC), Paseo de la Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain; email: orfao@usal.es.

Footnotes

Submitted 16 June 2022; accepted 8 November 2022; prepublished online on *Blood* First Edition 18 November 2022.

*G.O.-A. and B.F.-H. are joint first authors.

†J.A., M.M., and A.O. are senior authors.

For sharing data contact the corresponding author by email. Please note that data from the authors' cohort have been presented in Nieto et al⁶ and Criado et al.⁹

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

- Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325-332.
- Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575-583.
- Campo E, Ghia P, Montserrat E, et al. Mature B-cell neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017:220-221.
- Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002;100(2):635-639.
- Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*. 2004;103(6):2337-2342.
- Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009;114(1):33-37.
- Slager SL, Parikh SA, Achenbach SJ, et al. Progression and survival of monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a screening study of 10,139 individuals. *Blood*. 2022;140(15):1702-1709.
- Criado I, Rodríguez-Caballero A, Gutiérrez ML, et al. Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after seven years of follow up and is associated with a poorer outcome. *Haematologica*. 2018;103(7):1198-1208.
- Criado I, Muñoz-Criado S, Rodríguez-Caballero A, et al. Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression. *Haematologica*. 2017;102(7):1238-1246.
- Shanafelt TD, Kay NE, Parikh SA, et al. Risk of serious infection among individuals with and without low count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Leukemia*. 2021;35(1):239-244.
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574.
- 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):1239-1242.
- Kilic G, Bulut O, Jaeger M, et al. The immunological factors predisposing to severe covid-19 are already present in healthy elderly and men. *Front Immunol*. 2021;12:720090.
- Li X, Xu S, Yu M, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 in patients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):110-118.
- Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061-1069.
- Boechat JL, Chora I, Morais A, Delgado L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology—current perspectives. *Pulmonology*. 2021;27(5):423-437.
- Nieto WG, Teodosio C, López A, et al. Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78B(S1):S24-S34.
- Chatzikonstantinou T, Kapetanakis A, Scarfò L, et al. COVID-19 severity and mortality in patients with CLL: an update of the international ERIC and Campus CLL study. *Leukemia*. 2021;35(12):3444-3454.
- Shen Y, Freeman JA, Holland J, et al. COVID-19 vaccine failure in chronic lymphocytic leukaemia and monoclonal B-lymphocytosis; humoral and cellular immunity. *Br J Haematol*. 2022;197(1):41-51.
- de Faria-Moss M, Yamamoto M, Arrais-Rodrigues C, et al. High frequency of chronic lymphocytic leukemia-like low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in Japanese descendants living in Brazil. *Haematologica*. 2020;105(6):e298-301.
- Chen R, Sang L, Jiang M, et al. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):89-100.
- Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, et al. Different innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection of asymptomatic, mild, and severe cases. *Front Immunol*. 2020;11:610300.
- Rodríguez L, Pekkarinen PT, Lakshmi K, et al. Systems-level immunomonitoring from acute to recovery phase of severe COVID-19. *Cell Rep Med*. 2020;1(5):100078.
- Criado I, Blanco E, Rodríguez-Caballero A, et al. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(12):2701-2705.
- Huang Z, Chen H, Xue M, et al. Characteristics and roles of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibodies in patients with different severities of coronavirus 19. *Clin Exp Immunol*. 2020;202(2):210-219.

<https://doi.org/10.1182/blood.2022017439>

© 2023 by The American Society of Hematology. Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

ARTÍCULO 2

“Cinética de la respuesta inmune celular y humoral en pacientes COVID-19 con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”

Guillermo Oliva-Ariza^{#1,2,3}, Blanca Fuentes-Herrero^{#1,2,3}, Quentin Lecrevisse^{1,2,3,4}, Cristina Carbonell^{2,3,5}, Alba Pérez-Pons^{1,2,3}, Alba Torres-Valle^{1,2,3}, Julio Pozo^{1,2,3}, José Ángel Martín-Oterino^{2,3,5}, Óscar González-López^{1,2,3}, Amparo López-Bernús^{2,3,5,6}, Marta Bernal-Ribes^{1,2}, Moncef Belhassen-García^{2,3,5,6}, Oihane Pérez-Escorza^{1,2,3}, Martín Pérez-Andrés^{1,2,3,4}, Lourdes Vazquez^{3,7}, Guillermo Hernández-Pérez^{2,5}, Francisco Javier García Palomo⁸, Pilar Leoz^{3,7}, Pilar Costa-Alba^{3,9}, Elena Pérez-Losada^{3,10}, Ana Yeguas^{3,7}, Miryam Santos Sánchez^{1,2,3}, Marta García-Blázquez⁷, F. Javier Morán-Plata^{1,2,3}, Daniela Damasceno^{1,2,3,4}, Vitor Botafogo^{1,2,3}, Noemí Muñoz-García^{1,2,3}, Rafael Fluxa¹¹, Jacques J.M. van Dongen^{1,2}, Miguel Marcos^{*2,3,5}, Julia Almeida^{*1,2,3,4}, Alberto Orfao^{*1,2,3,4} en representación del Consorcio ECRIN-M3

¹Programa de Investigación Clínica y Traslacional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC – Universidad de Salamanca); Servicio de Citometría, NUCLEUS; Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

³Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

⁵Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, España.

⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁸Banco Nacional de ADN, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁹Servicio de Urgencias, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹⁰Servicio de Cuidados Intensivos, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹¹Cytognos SL, Salamanca, España.

#GO-A y BF-H han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor del mismo.

*JA, MM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor del mismo.

American Journal of Hematology, 4 de octubre de 2023; disponible sólo en versión on-line.

DOI: 10.1002/ajh.27119

PMID: 37792579

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I disponible al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. La linfocitosis B monoclonal de bajo recuento (LBM^{lo}) se define por la presencia en sangre periférica (SP) de <500 células B clonales/ μ L (de fenotipo similar a la leucemia linfática crónica -LLC-) en individuos aparentemente sanos. La LBM^{lo} es una condición muy frecuente en la población general adulta (entre un 4% y un 16%), y se asocia a un estado de inmunodeficiencia subyacente. Así, existen numerosas evidencias que demuestran que los sujetos con LBM^{lo} presentan un riesgo incrementado de desarrollar infecciones graves y tumores hematológicos. Además, en estos individuos se han descrito diferentes alteraciones en distintas poblaciones de células del sistema inmune, entre las que destaca un descenso en el número de linfocitos B circulantes, a expensas de los linfocitos B pre-centro germinal (CG), que podrían contribuir a explicar la mayor susceptibilidad para desarrollar infecciones graves observada en sujetos aparentemente sanos que presentan LBM^{lo}.

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19, se han identificado numerosos factores de riesgo asociados a una mayor gravedad de la enfermedad. Más recientemente, se ha descrito que la presencia de LBM^{lo} se relaciona con un riesgo incrementado de hospitalización por COVID-19. No obstante, seguimos sin conocer de forma precisa los mecanismos por los que los pacientes con LBM^{lo} desarrollan una enfermedad más grave. De acuerdo con estos antecedentes, es probable que los individuos con LBM^{lo} y, por tanto, con un sistema inmune deficitario, desarrollen una respuesta inmune incapaz de controlar adecuadamente la infección por SARS-CoV-2, lo cual favorecería la evolución a formas más graves de la COVID-19.

Objetivo. Este trabajo se centró en el análisis de la cinética de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune en SP y de los niveles de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en el plasma de los pacientes COVID-19 con LBM^{lo}, comparando estos resultados con los de pacientes infectados sin LBM.

Pacientes, material y métodos. En este estudio se incluyeron un total de 336 pacientes con COVID-19 (149 hombres / 187 mujeres; mediana de edad de 56 años [rango: 20 – 99 años]) referidos al Hospital Universitario de Salamanca entre marzo de 2020 y julio de 2021, ninguno de los cuales había sido vacunado previamente frente a SARS-CoV-2. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con la presencia de LBM^{lo} en: 74/336 (22%) pacientes COVID-19 con

LBM^o (41 hombres / 33 mujeres; mediana de edad de 69 años [rango: 38 – 95 años]) y 262/336 (78%) pacientes COVID-19 sin LBM (108 hombres / 154 mujeres; mediana de edad de 52 años [rango: 20 – 99 años]). Del conjunto de los pacientes se extrajeron 676 muestras de SP (179 de pacientes con LBM^o y 496 de pacientes sin LBM), en las que analizamos la distribución de las distintas poblaciones de células del sistema inmune (y con especial detalle de las poblaciones de células linfoides B) mediante el uso de citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad. La distribución de las distintas poblaciones celulares (en número absoluto de células/ μ L) se normalizó por edad respecto a un grupo de 656 controles sanos provenientes del área geográfica de Salamanca, reclutados de forma previa a la pandemia. La (semi)cuantificación de los niveles de anticuerpos de isotipo IgM, IgG e IgA frente a las proteínas *spike* (S) y nucleocápside (N) de SARS-CoV-2 se realizó mediante la técnica de ELISA empleando kits comerciales.

Resultados. En general, la distribución de las distintas poblaciones celulares en la SP de los pacientes COVID-19 con LBM^o ya estaba significativamente alterada en los primeros días tras el inicio de las manifestaciones clínicas de la infección. Concretamente, durante la primera semana tras el comienzo de los síntomas, los pacientes COVID-19 con LBM^o ya mostraban un aumento en el número de leucocitos totales (por encima de los valores normales en un 65% de los casos), debido a un incremento significativo en el número de los granulocitos neutrófilos, y en menor medida, de los monocitos. Por el contrario, más del 60% de los pacientes tenían en esta fase temprana de la infección recuentos muy bajos de eosinófilos, basófilos, células dendríticas y linfocitos. Estas alteraciones persistieron durante las primeras 4 semanas tras el inicio de los síntomas; a partir de entonces las cifras periféricas de estas poblaciones mayoritarias de leucocitos comenzaron a recuperarse hasta alcanzar valores normales. Sin embargo, en las fases más tardías del periodo de seguimiento (hasta 43 semanas tras el inicio de los síntomas), todas las poblaciones mayoritarias de leucocitos seguían estando alteradas respecto a los niveles normales, en un porcentaje variable de casos, si bien dichas alteraciones eran mucho menos acusadas que las observadas en la fase aguda de la COVID-19.

Un análisis más detallado del compartimento de células linfoides en la SP de los pacientes con LBM^o demostró que los linfocitos T seguían la misma cinética descrita previamente para los linfocitos totales, siendo especialmente pronunciado el descenso de linfocitos T TCR $\alpha\beta$ ⁺

CD4⁺CD8⁻. De manera similar, los niveles de células NK también descendieron, aunque de forma menos marcada. A su vez, los niveles de linfocitos B fluctuaron a lo largo del estudio, encontrándose en general significativamente disminuidos durante la primera semana tras el inicio de los síntomas, momento a partir del cual empezaban a recuperarse rápidamente hasta alcanzar niveles normales en la mayoría de los casos. Al estudiar con mayor detalle la distribución de las distintas subpoblaciones de linfocitos B, observamos que, tanto los linfocitos B pre-CG, como las células B de memoria, seguían la misma cinética descrita para los linfocitos B totales.

Respecto a la cinética de las células plasmáticas (CP) en la sangre de los pacientes COVID-19 con LBM^o, constatamos que estas estaban aumentadas desde la primera semana tras el inicio de los síntomas, alcanzaban un pico máximo en SP en las semanas 3-4, y a partir de ahí, iban disminuyendo progresivamente hasta niveles normales. Al contrario de lo observado con los linfocitos B de memoria, la expansión de CP mostraba diferencias significativas en función de la subclase de la cadena pesada de la inmunoglobulina expresada, con una expansión predominante de las CP IgG1⁺, IgG3⁺ e IgA1⁺. Merece destacar que el compartimento madurativo de CP más expandido en SP fue el de las CP con un patrón de expresión CD20⁺CD138⁺, que se corresponde con la subpoblación de CP más maduras en SP.

En cuanto a la respuesta humoral, observamos que los anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N de SARS-CoV-2 ya eran detectables en la primera semana tras el inicio de los síntomas en más del 50% de los pacientes COVID-19 con LBM^o, alcanzando niveles máximos en plasma durante las semanas 3-4 tras el inicio de los síntomas, al igual que ocurre con las CP. Una vez resuelta la infección, los niveles de anticuerpos IgM e IgA comenzaron a decaer hasta hacerse indetectables en la mayoría de los casos, mientras que los anticuerpos de isotipo IgG seguían detectándose durante todo el periodo de seguimiento del estudio.



Al comparar la cinética de las poblaciones celulares en la sangre de los pacientes COVID-19 con LBM^o y sin LBM, comprobamos como los primeros presentaban un número significativamente más elevado de granulocitos neutrófilos circulantes en SP durante la primera semana tras el inicio de los síntomas, acompañado de recuentos más bajos de linfocitos B pre-CG. Además, se observó que el descenso de células dendríticas, linfocitos T TCRαβ⁺ CD4⁺CD8⁻ y TCRγδ que ocurría durante las semanas 2-5 tras el inicio de los síntomas, era significativamente más marcado entre los pacientes con LBM^o. Por el contrario, en estos

pacientes los niveles de CP en las semanas 5-7 tras el inicio de los síntomas eran significativamente más altos que en los sujetos sin LBM, asociándose a un retraso en la recuperación de los valores normales. Además, los pacientes con LBM^{lo} presentaban niveles de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 significativamente más elevados durante las primeras cuatro semanas tras el inicio de los síntomas de la COVID-19.

Conclusiones. Los pacientes con COVID-19 portadores de clones LBM^{lo} presentan una distribución de las distintas poblaciones leucocitarias en SP y del perfil de los anticuerpos plasmáticos específicos frente a SARS-CoV-2 muy alterados durante la infección, más que los observados en pacientes COVID-19 sin LBM, y similares a los descritos previamente en pacientes con COVID-19 grave. Estas alteraciones observadas en los pacientes con LBM^{lo} reflejan un retraso en la producción de CP, junto con niveles más elevados de anticuerpos, y un mayor descenso en el recuento de células dendríticas y linfocitos T de tipo innato, respecto a lo observado en pacientes COVID-19 sin LBM.

RESEARCH ARTICLE

Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis

Guillermo Oliva-Ariza^{1,2,3}  | Blanca Fuentes-Herrero^{1,2,3} |
 Quentin Lecrevisse^{1,2,3,4} | Cristina Carbonell^{2,3,5} | Alba Pérez-Pons^{1,2,3} |
 Alba Torres-Valle^{1,2,3} | Julio Pozo^{1,2,3} | José Ángel Martín-Oterino^{2,3,5} |
 Óscar González-López^{1,2,3}  | Amparo López-Bernús^{2,3,5,6} | Marta Bernal-Ribes^{1,2} |
 Moncef Belhassen-García^{2,3,5,6} | Oihane Pérez-Escorza^{1,2,3} |
 Martín Pérez-Andrés^{1,2,3,4} | Lourdes Vazquez^{3,7} | Guillermo Hernández-Pérez^{2,5} |
 Francisco Javier García Palomo⁸ | Pilar Leoz^{3,7} | Pilar Costa-Alba^{3,9} |
 Elena Pérez-Losada^{3,10} | Ana Yeguas^{3,7} | Miryam Santos Sánchez^{1,2,3} |
 Marta García-Blázquez⁷ | F. Javier Morán-Plata^{1,2,3} | Daniela Damasceno^{1,2,3,4} |
 Vitor Botafogo^{1,2,3} | Noemí Muñoz-García^{1,2,3} | Rafael Fluxa¹¹ |
 Jacques J. M. van Dongen^{1,2} | Miguel Marcos^{2,3,5} | Julia Almeida^{1,2,3,4}  |
 Alberto Orfao^{1,2,3,4} | on behalf of the ECRIN-M3 Consortium

¹Translational and Clinical Research Program, Cancer Research Center (IBMCC, CSIC – University of Salamanca); Cytometry Service, NUCLEUS, University of Salamanca (Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain

²Department of Medicine, University of Salamanca (Universidad de Salamanca), Salamanca, Spain

³Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

⁴Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁵Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁶Department of Infectious Diseases, University Hospital of Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, Spain

⁷Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁸Spanish National DNA Bank Carlos III, NUCLEUS, University of Salamanca, Salamanca, Spain

⁹Emergency Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

¹⁰Intensive Care Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

¹¹Cytognos SL, Salamanca, Spain

Guillermo Oliva-Ariza and Blanca Fuentes-Herrero equally contributed to the manuscript, and they both should be considered as the first author.

Miguel Marcos, Julia Almeida and Alberto Orfao equally contributed to the manuscript, and they all should be considered as the senior author.

A complete list of the leader members of the ECRIN-M3 Consortium appears in the “Acknowledgements.”

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) 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.

© 2023 The Authors. *American Journal of Hematology* published by Wiley Periodicals LLC.

Correspondence

Alberto Orfao, Cancer Research Center (IBMCC), Paseo de la Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

Email: orfao@usal.es

Julia Almeida, Cancer Research Center (IBMCC), Paseo de la Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

Email: jalmeida@usal.es

Funding information

Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Grant/Award Number: CB16/12/00400; Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Grant/Award Numbers: PR-2019 487971, SA109P20; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Numbers: COV20/00386, FI20/00116, PI17/00399, PI22/00674; Interreg, Grant/Award Number: 0639-IDIAL-NET-3-3; Junta de Castilla y León, Grant/Award Number: GRS-COVID-33/A/20

Abstract

Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{lo}) has been associated with an underlying immunodeficiency and has recently emerged as a new risk factor for severe COVID-19. Here, we investigated the kinetics of immune cell and antibody responses in blood during COVID-19 of MBL^{lo} versus non-MBL patients. For this study, we analyzed the kinetics of immune cells in blood of 336 COVID-19 patients (74 MBL^{lo} and 262 non-MBL), who had not been vaccinated against SARS-CoV-2, over a period of 43 weeks since the onset of infection, using high-sensitivity flow cytometry. Plasma levels of anti-SARS-CoV-2 antibodies were measured in parallel by ELISA. Overall, early after the onset of symptoms, MBL^{lo} COVID-19 patients showed increased neutrophil, monocyte, and particularly, plasma cell (PC) counts, whereas eosinophil, dendritic cell, basophil, and lymphocyte counts were markedly decreased in blood of a variable percentage of samples, and with a tendency toward normal levels from week +5 of infection onward. Compared with non-MBL patients, MBL^{lo} COVID-19 patients presented higher neutrophil counts, together with decreased pre-GC B-cell, dendritic cell, and innate-like T-cell counts. Higher PC levels, together with a delayed PC peak and greater plasma levels of anti-SARS-CoV-2-specific antibodies (at week +2 to week +4) were also observed in MBL^{lo} patients. In summary, MBL^{lo} COVID-19 patients share immune profiles previously described for patients with severe SARS-CoV-2 infection, associated with a delayed but more pronounced PC and antibody humoral response once compared with non-MBL patients.

1 | INTRODUCTION

Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{lo}) is defined by the presence in blood of <500 clonal B cells/ μ L which usually display an immunophenotypic profile of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells, in the absence of other features of B-cell chronic lymphoproliferative disorder (B-CLPD).¹⁻⁴ Though MBL^{lo} is a highly prevalent condition in the general population (from 4% to 16% of otherwise healthy donors aged \geq 40 years),⁴⁻⁷ only a small fraction (\approx 1.8%) of MBL^{lo} cases develop high-count MBL (MBL^{hi}, \geq 500 and < 5000 CLL-type B cells/ μ L)² in the medium term,⁸ while no MBL^{lo} case has been described so far to evolve to CLL. In turn, MBL^{hi} shows a rate of progression to CLL-requiring treatment of 1.1% per year.³ Despite its low rate of progression to CLL, MBL^{lo} has been associated with an increased risk of severe infections,⁹ second lymphoid malignancies,⁷ and a shorter overall survival (OS) compared to non-MBL subjects.⁸ The poorer clinical outcome of MBL^{lo} individuals points toward an underlying immune dysregulation, mostly involving the B-cell compartment and antibody-mediated immune responses,¹⁰⁻¹³ that make MBL^{lo} subjects particularly susceptible to (more) severe infections.

Since December 2019, COVID-19 arose as a new infectious disease with a heterogenous clinical course in humans,¹⁴ ranging from asymptomatic to severe disease requiring admission to the hospital, and even to intensive care units (ICU), and ultimately death.¹⁵

Since then, several risk factors have been identified which contribute to explain the clinical heterogeneity of COVID-19. Among others, these include advanced age, male sex, and the presence of (certain) comorbidities.^{15,16} More recently, MBL^{lo} has also emerged as a risk factor for the development of more severe COVID-19, independently of other comorbidities and prognostic factors.¹⁷ Although many reports have extensively described the immune profiles associated with SARS-CoV-2 infection and demonstrated the clinical relevance of an adequate immune response for controlling SARS-CoV-2 infection and for clearance of the virus,¹⁸⁻²¹ the precise immune profiles that might contribute to explain the poorer outcome of COVID-19 in MBL^{lo} versus non-MBL patients still remain to be identified. In this regard, previous cross-sectional studies have reported on the immune cell and humoral responses in the blood of MBL^{lo} COVID-19 patients at the acute phase of infection and after recovery from COVID-19,¹⁷ but more detailed longitudinal analyses of the kinetics of immune cells and antibody responses in blood are still missing.

Here, we report on the longitudinal kinetics of the different populations of immune cells and of SARS-CoV-2-specific antibody levels in blood of a large cohort of MBL^{lo} subjects who had COVID-19 during the first and second waves of the pandemic, both during and after the infection, compared with age- and sex-matched non-MBL COVID-19 patients and healthy donors.

2 | METHODS

2.1 | Patients, controls, and samples

A total of 336 COVID-19 adult patients (149 men and 187 women; median age of 56 years [range: 20–99 years]) who were referred to the University Hospital of Salamanca between March 2020 and July 2021 (prior to vaccination against SARS-CoV-2), were studied. COVID-19 diagnosis was confirmed by the presence of SARS-CoV-2 by RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) in a nasopharyngeal swab and/or a positive serology for anti-nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2 IgM and/or IgG antibodies when a PCR-assay was not available. A small subgroup of COVID-19 patients (23/336, 7%) had received anti-viral therapy (either lopinavir/ritonavir or remdesivir) prior to sample collection at recruitment. All COVID-19 patients were screened for the presence of MBL and classified as follows:^{1,2} (i) COVID-19 MBL patients (74/336 [22%], 41 men and 33 women, median age of 69 years [range: 38–95 years]), and (ii) COVID-19 non-MBL patients (262/336 [78%], 108 men and 154 women; median age of 52 years [range: 20–99 years]). Two out of 74 (3%) MBL^{lo} COVID-19 patients had been previously diagnosed with MBL^{lo} before the pandemic, in the context of a population-based screening. A total of 656 non-MBL healthy donors (HD) (301 men and 355 women; median age of 58 years [range: 19–97 years]) from the same geographical area who had been recruited and evaluated for the presence of MBL before the SARS-CoV-2 pandemic were studied as controls. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca/IBSAL (approval codes: CEIC PI4705/2017 and PI 2020 03468).

2.2 | Immunophenotypic studies

A total of 676 peripheral blood (PB) samples were collected from the 336 patients at the time of COVID-19 diagnosis (179 samples from MBL^{lo} and 497 from non-MBL COVID-19 patients) and subsequently over a period of 43 weeks since the onset of infection (defined as the appearance of the first symptoms of COVID-19). All the samples were stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST), the Immunemonitoring (IMM) BlgH tube, and the EuroFlow Innate Myeloid Cell (IMC) tube, using the EuroFlow bulk-lyse-stain-and-then-fix standard operating procedure^{17,22} (Supplementary Methods; Supplementary Table 2). For each antibody combination, $\geq 10^7$ cells/tube were measured per sample. Automated data analysis was performed using the INFINICYT software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) and the LST and IMM-BlgH data bases²³ (Supplementary Methods). The identification of the different white blood cell subsets (with the EuroFlow LST), B-cell and plasma cell subsets (using the IMM-BlgH tube), and dendritic cell subsets (with the EuroFlow IMC tube) was performed following standardized gating strategies, as described and illustrated elsewhere for each tube^{23–25}; a summary of the phenotypic profiles used for the subsetting of these cell populations is shown in Supplementary Table 2 (panels B, D, and F for the EuroFlow LST,

IMM-BlgH, and EuroFlow IMC tubes, respectively). For each cell population, absolute cell counts/ μ L of blood were calculated using a dual-platform approach,²⁶ based on their relative values (% from leukocytes) obtained with the flow cytometer, and then transformed into absolute cell counts after obtaining the absolute number of total leukocytes using the Sysmex XN-1000TM hematology cell analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). For the major populations of leukocytes, correlations of the absolute number of cells/ μ L obtained with the hematology cell analyzer versus the flow cytometer using EuroFlow protocols were performed in a subgroup of samples ($n = 284$), with an overall high degree of (direct) correlation between both platforms for each subset analyzed (Supplementary Figure 1).

2.3 | Measurement of anti-SARS-CoV-2 IgM, IgG, and IgA antibody levels in plasma

(Semi)quantitative determination of immunoglobulin (Ig) M, IgG, and IgA plasma levels against the spike (S) and the nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2 was performed in 668 and 454 samples, respectively. Commercially available ELISA kits for anti-S protein IgM antibodies (ThermoFisher, Waltham, MA), anti-S protein IgG and IgA antibodies (ImmunoStep S.L., Salamanca, Spain), anti-N protein IgM antibodies (AnshLab, Webster, TX), and anti-N protein IgG and IgA antibodies (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) were used. A high correlation of the results obtained by the anti-N IgM (AnshLab) and IgG (Mikrogen) kits employed in this study compared with reference methods used for the detection of specific antibodies against SARS-CoV-2 (e.g., Roche assays) has been previously reported and validated.^{27–29}

2.4 | Measurement of viral load in plasma

Quantitation of viral load in plasma of COVID-19 patients was performed in 279 samples. Total RNA was extracted from plasma using the Viral RNA isolation kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) according to the manufacturer's specifications. Detection and quantitation of RNA viral copies was performed using the Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) following the instructions of the manufacturer. The assay results were considered to be valid when the positive control had values ≥ 0.2 copies/ μ L; samples were classified as positive for SARS-CoV-2 when ≥ 0.1 copies/ μ L of viral RNA were detected, according to the kit instructions.

2.5 | Statistical methods

The Mann-Whitney *U* test (for non-paired continuous variables) or the Chi-square and Fisher exact tests (for categorical variables) were used to determine the statistical significance of differences observed between groups, using the MIDAS (v2.0.5.d) (Cytognos S.L.) and GraphPad Prism V8 (GraphPad Software, San Diego, CA) software

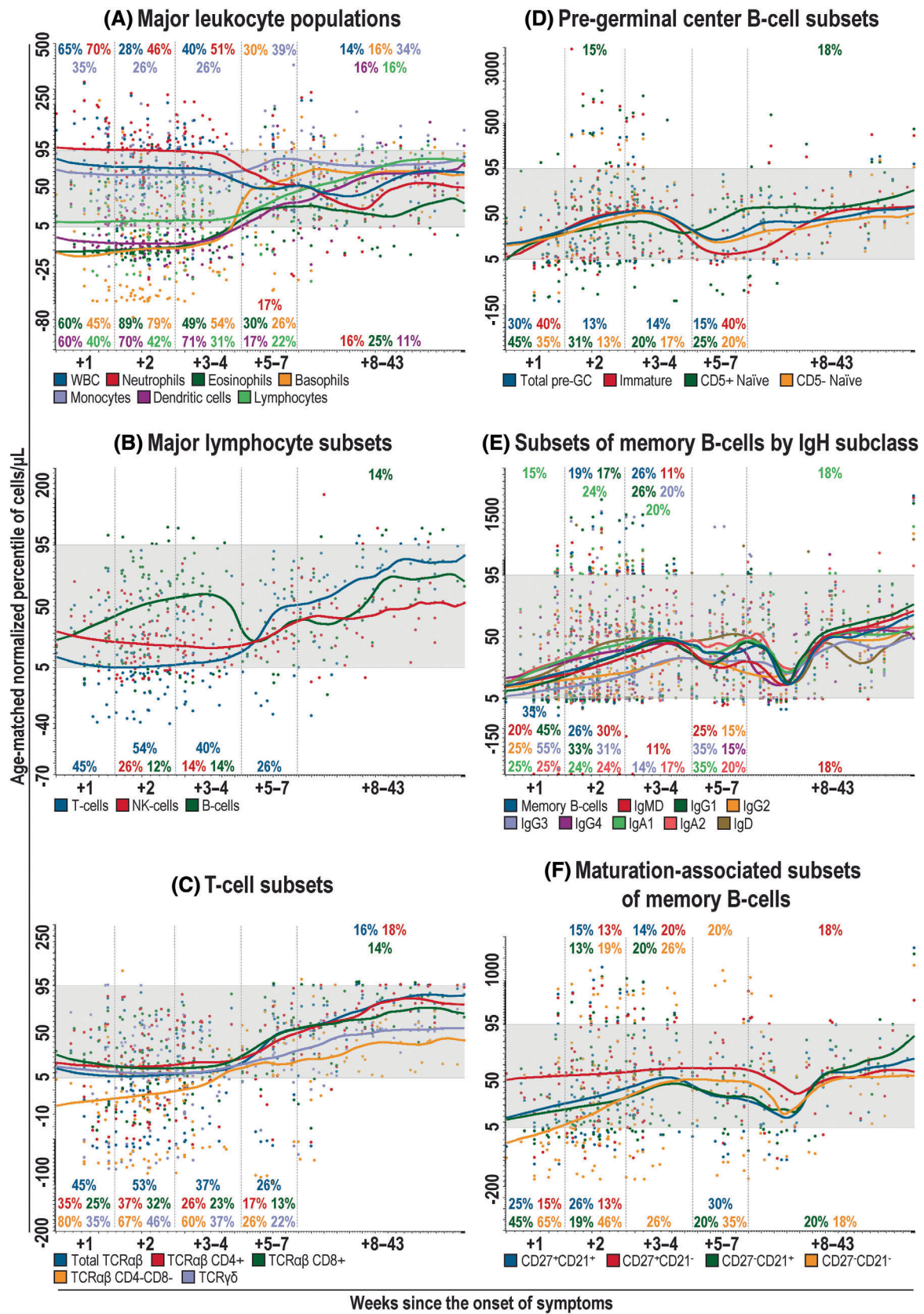


FIGURE 1 Legend on next page.

programs. For comparisons between two groups, p -values $\leq .05$ (for categorical variables) and corrected (Benjamini-Hochberg procedure for continuous variables) p -values $\leq .05$ were used to define statistical significance. For multiple comparisons across all time-points analyzed, expressed as weeks since the onset of symptoms, a false discovery rate (FDR) of $< 5\%$ was used as cutoff for statistical significance. For calculating correlation coefficients between continuous variables, the Spearman's rho test was used for non-Gaussian data distributions. Normalization of leukocyte values by age and their graphical representation were performed using MIDAS (v2.0.5.d), according to previously described algorithms¹¹ (Supplementary Methods). For box plot graphics, the GraphPad Prism V8 (GraphPad Software) was employed.

3 | RESULTS

3.1 | Kinetics of the major populations of leukocytes and anti-SARS-CoV-2 antibodies in blood of MBL^{lo} patients during and after COVID-19

Absolute white blood cell (WBC) counts (after normalization by age against HD) were increased above the 95th percentile (95thp) of HD in 65% of blood samples ($p \leq .0001$) from MBL^{lo} patients, early (week +1) after the onset of COVID-19-related symptoms. This was due to increased neutrophil (70% of samples; $p \leq .0001$) and, to a lesser extent also, monocyte counts (35%, $p \leq .0001$) (Figure 1; Supplementary Tables 3 and 7). In contrast, eosinophil, basophil, and lymphocyte counts were markedly decreased below the 5th percentile (5thp) of HD in between 40% and 60% of samples ($p \leq .0001$) during the first week since the onset of COVID-19 (Figure 1A; Supplementary Tables 3 and 7). These altered profiles persisted through the first 4 weeks since the onset of symptoms, most samples ($> 60\%$) reaching normal values for these cell populations from week +5 onward. Despite this, monocyte counts remained increased in blood throughout the whole study period in between 26% and 39% of samples ($p \leq .0001$) (Figure 1A; Supplementary Tables 3 and 7). Among the innate leukocyte populations, eosinophil and basophil counts were the first that tended to recover toward normal levels (89% and 79% of samples with eosinophil and basophils counts below the 5thp of

HD at week +2 vs. 49% and 54% at weeks +3–4 [$p \leq .0001$ and $p = .02$], respectively) (Figure 1A; Supplementary Tables 3 and 7). The WBC count almost completely recovered at week +5–7 (40% above the 95thp of HD at week +3–4 vs. 13% at week +5–7, $p = .04$), consistent with normalized neutrophil counts (51% above the 95thp of HD at week +3–4 vs. 13% at week +5–7, $p = .005$). Despite the overall tendency toward normal leukocyte levels described above, from week +8 to week +43 most major leukocyte populations still showed altered cell counts in up to one-fifth of samples, consisting of slightly increased WBC, basophil, monocyte, and lymphocyte counts ($p < .02$), together with decreased neutrophil, and eosinophil cell numbers ($p < .007$) (Figure 1A; Supplementary Tables 3 and 7). In addition, dendritic cell counts were also decreased in $> 60\%$ of samples ($p \leq .0001$) during the first four weeks since the onset of symptoms, with partially normalized dendritic cell numbers at week +5–7 (71% below the 5thp of HD at week +3–4 vs. 17% at week +5–7, $p \leq .0001$). Afterward, dendritic cells still displayed altered cell counts in the longer term (Figure 1A; Supplementary Table 3).

More detailed analysis of the lymphocyte compartment in blood of MBL^{lo} patients showed that T cells had similar kinetics to those described above for the total lymphocyte counts, throughout the whole follow-up period (Figure 1B; Supplementary Table 3). Of note, this profile was similar for all major T-cell subsets, except for a more pronounced (early) decrease of TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ T cells (80% below the 5thp of HD, $p \leq .0001$) at week +1 (Figure 1C; Supplementary Table 3). In contrast, NK-cell and B-cell counts barely changed along the study, except for a minor decrease of both cell populations between week +2 and week +4 ($p \leq .0001$ and $p = .03$, respectively) and the presence of increased B-cell counts at the latest follow-up time-points in 14% of cases ($p = .02$) (Figure 1B; Supplementary Table 3).

Despite this general B-cell behavior, more in-depth analysis of the B-cell compartment revealed that pre-germinal center (GC) B-cell counts were already decreased at week +1 in 30% of samples ($p = .001$), their levels remaining significantly low until week +8 in 13–15% of samples, when they finally reached normal values (Figure 1D; Supplementary Table 4). This profile was similar for all subsets of pre-GC B cells, except for immature B cells, which transiently recovered normal levels at week +2, to drop again at week

FIGURE 1 Kinetics of different populations of leukocytes in blood of MBL^{lo} patients during and after COVID-19. Kinetics of the major populations of leukocytes (A), lymphocytes (B), Tcells (C), pre-germinal center B-cell subsets (D), memory B cells grouped according to the IgH isotype and subclass expressed (E), and their maturation stage (F), present in blood of MBL^{lo} patients during COVID-19 infection, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μL for each cell population in pre-pandemic non-MBL age-matched HD, as reference. Colored dots depict the normalized value of the corresponding cell population for each individual sample studied, while colored horizontal curves represent the median value of each population along the study period (during and after COVID-19). Gray horizontal bands represent the 5th–95th percentile values (normality range) of pre-pandemic non-MBL HD. Vertical dotted lines delineate weeks +1, +2, +3–4, +5–7, and +8–43 showing a similar tendency (within each time interval). Percent values at the top and at the bottom of each panel indicate the percentage of MBL^{lo} samples in which the normalized absolute counts of the individual cell subsets (identified by the corresponding color-codes) were found to be significantly different ($p \leq .05$) from the age-matched HD control group (i.e., over the 95th percentile or below the 5th percentile of pre-pandemic non-MBL age-matched HD for each time interval, respectively). GC, germinal center; HD, healthy donor; IgH, immunoglobulin heavy chain; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer; TCR, T-cell receptor; WBC, white blood cells.

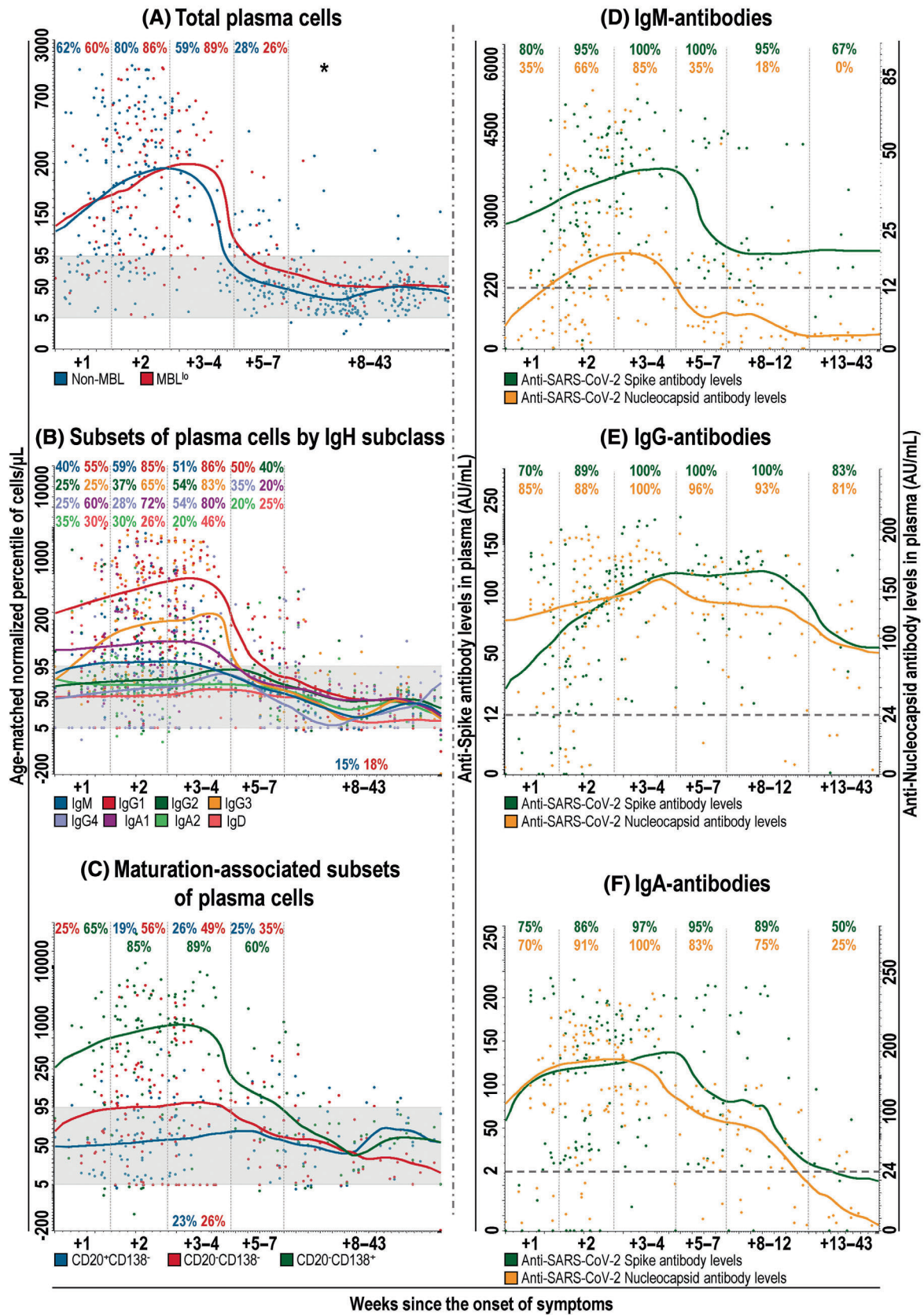


FIGURE 2 Legend on next page.

+5–7 (40% below the 5thp of HD at week +1 vs. 9% at week +2 vs. 40% at week +5–7; $p < .01$) (Figure 1D; Supplementary Table 4). Similarly to pre-GC B cells, memory B-cell (MBC) counts were also decreased in blood at week +1 in 35% of samples ($p = .0003$), but with an earlier recovery toward normal levels (26% below the 5thp of HD at week +2 vs. 3% at week +3–4, $p = .004$), independently of the IgH isotype and subclass expressed (Figure 1E; Supplementary Table 4). Similar kinetics were observed for the CD27⁺ versus CD27⁻ and CD21⁺ versus CD21⁻ subsets of MBC, except for CD27⁻CD21⁻ MBC, whose counts were markedly decreased in 65% of samples at week +1 ($p \leq .0001$) (Figure 1F; Supplementary Table 4).

In contrast to other B- and T-cell populations, plasma cells (PC) were significantly increased in blood already at the onset of COVID-19 symptoms (60% above the 95thp of HD at week +1, $p \leq .0001$), peaking at weeks +3–4 (89% above the 95thp of HD, $p \leq .0001$) and decreasing thereafter, until they returned to normal levels from week +8 onward (2% above the 95thp of HD, $p > .05$; Figure 2A; Supplementary Table 3). In contrast to MBC, PC subsets showed markedly different profiles depending on the pattern of expression of the different IgH isotypes and subclasses. Thus, the highest PC counts in blood at weeks+3–4 mostly corresponded to IgG1⁺, IgG3⁺, and IgA1⁺ PC, which were increased in $\geq 80\%$ of samples ($p \leq .0001$), while $< 60\%$ of samples had increased counts of IgG2⁺, IgG4⁺, IgA2⁺, and IgD⁺ PC at weeks +3–4 (Figure 2B; Supplementary Table 5). IgM PC counts showed intermediate kinetics, as they peaked at week +2 (59% above the 95thp of HD, $p \leq .0001$), with an earlier recovery toward normal levels (51% above the 95thp of HD at weeks +3–4 vs. 5% at weeks +8–43, $p = .0003$; Figure 2B; Supplementary Table 5). In the medium-to-long-term (week +8–43), all PC subsets returned to normal levels (Figure 2B; Supplementary Table 5). Interestingly, once PC counts were elevated, this was mainly due to an increase in the more mature CD20⁻CD138⁺ PC, augmented

in $> 60\%$ of samples during the first 7 weeks ($p \leq .0001$) after the onset of symptoms. In turn, the number of CD20⁻CD138⁻ PC, and particularly, the less mature CD20⁺CD138⁻ PC, showed a lower increase in blood with a peak at week+2 (56% and 19% above the 95thp of HD, $p \leq .0001$ and $p = .03$; respectively) (Figure 2; Supplementary Table 5).

As regards the humoral response, anti-SARS-CoV-2 protein S and protein N specific antibodies were detectable in $\geq 50\%$ of samples from MBL^{lo} patients early after the onset of symptoms (week +1) (Figure 2D–F), the only exception being anti-N IgM antibodies, which were positive at this time-point in only 35% of cases (Figure 2D; Supplementary Table 6). Subsequently, all antibody levels gradually increased, peaking at weeks +3–4 (Figure 2D–F). Thereafter, anti-N IgM median levels rapidly decreased below the cutoff level (median [IQR]: 20 [18 – 34] AU/mL at week +3–4 vs. 5 [4 – 16] AU/mL at week +5–7, $p = .001$). Although anti-S IgM median levels also decreased in parallel, they remained positive in $> 50\%$ of cases along the whole study period (3986 [1150–4466] AU/mL at week +5–7 vs. 1350 [754–3289] AU/mL at week +8–12 vs. 993 [171–2627] AU/mL at week +13–43; $p > .05$) (Figure 2D). Likewise, IgA median levels started to progressively decrease at week +5–7 (78 [20–192] AU/mL at week +5–7 vs. 5 [0–22] AU/mL at week +13–43, $p = .03$ for anti-S IgA; and 195 [144–211] AU/mL at week +3–4 vs. 100 [32–117] AU/mL at week +5–7, $p = .002$ for anti-N IgA), until they were cleared from plasma in the majority of MBL^{lo} patients by the end of the study (5 [0–22] AU/mL for anti-S IgA; 6 [4 – 24] AU/mL for anti-N IgA) (Figure 2F). In contrast, anti-S and anti-N IgG levels remained elevated throughout the whole follow-up period, showing only a slight decrease at the latest time-points, such decrease being statistically significant for anti-N IgG (134 [102–156] AU/mL at weeks +8–12 vs. 99 [32–109] AU/mL at weeks +13–42, $p = .03$), but not for anti-S IgG levels (Figure 2E).

FIGURE 2 Kinetics of different populations of blood plasma cells and the anti-SARS-CoV-2-specific plasma antibody levels in MBL^{lo} patients during and after COVID-19. Kinetics of total plasma cells in blood of MBL^{lo} COVID-19 patients (A: vs. non-MBL COVID-19 patients) and their subsets as defined according to the IgH isotype and subclass expressed (B), and the specific PC-associated maturation stage (C, from less mature CD20⁺CD138⁻ to intermediate CD20⁻CD138⁻ and more mature CD20⁻CD138⁺ plasma cells) during and after COVID-19 infection, normalized by age. Plasma levels (AU/mL) of specific IgM (D), IgG (E), and IgA (F) antibodies against the nucleocapsid (N) and spike (S) proteins of SARS-CoV-2 in MBL^{lo} subjects, measured during and after COVID-19. Data normalization by age represented in panels A–C are based on the distribution of absolute cell counts/ μ L for each cell population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Colored dots depict the normalized value of the corresponding cell population for each individual sample, while colored horizontal curves represent the median value of each population along the study. Gray horizontal bands represent the 5th–95th percentile values (normality range) of age-matched pre-pandemic non-MBL HD. Vertical dotted lines delineate weeks +1, +2, +3–4, +5–7, and +8–43 intervals showing a similar tendency (within each time interval). Percentages at the top and at the bottom of each panel indicate the percentage of samples in which the normalized absolute counts of the individual cell subsets (identified by the corresponding color codes) are significantly different ($p \leq .05$) from age-matched HD (i.e., over the 95th percentile or below 5th percentile of pre-pandemic age-matched non-MBL HD for each time interval, respectively). * $p \leq .05$ for comparisons between median cell counts in MBL^{lo} vs. non-MBL (A). In panels D–F, colored dots correspond to the levels (AU/mL) of anti-spike (green dots) and anti-nucleocapsid (orange dots) antibodies for each sample, while horizontal curves represent the median value for each antibody along the study period (during and after COVID-19). Percent values at the top of the graphs indicate the percentage of positive samples (i.e., number of samples for which antibodies against the viral proteins were detected from all samples analyzed) for each time interval. Vertical dotted lines delineate week +1, +2, +3–4, +5–7, +8–12, and +13–43 showing a similar tendency (within each time interval). Ticked horizontal lines represent the preestablished cutoff value for positivity for each antibody isotype according to the corresponding manufacturer (220 AU/mL for IgM, 12 AU/mL for IgG and 2 AU/mL for IgA anti-spike antibodies and 12 AU/mL for IgM and 24 AU/mL for both IgG and IgA anti-nucleocapsid antibodies). Ab, antibody; AU, arbitrary units; HD, healthy donors; IgH, immunoglobulin heavy chain; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

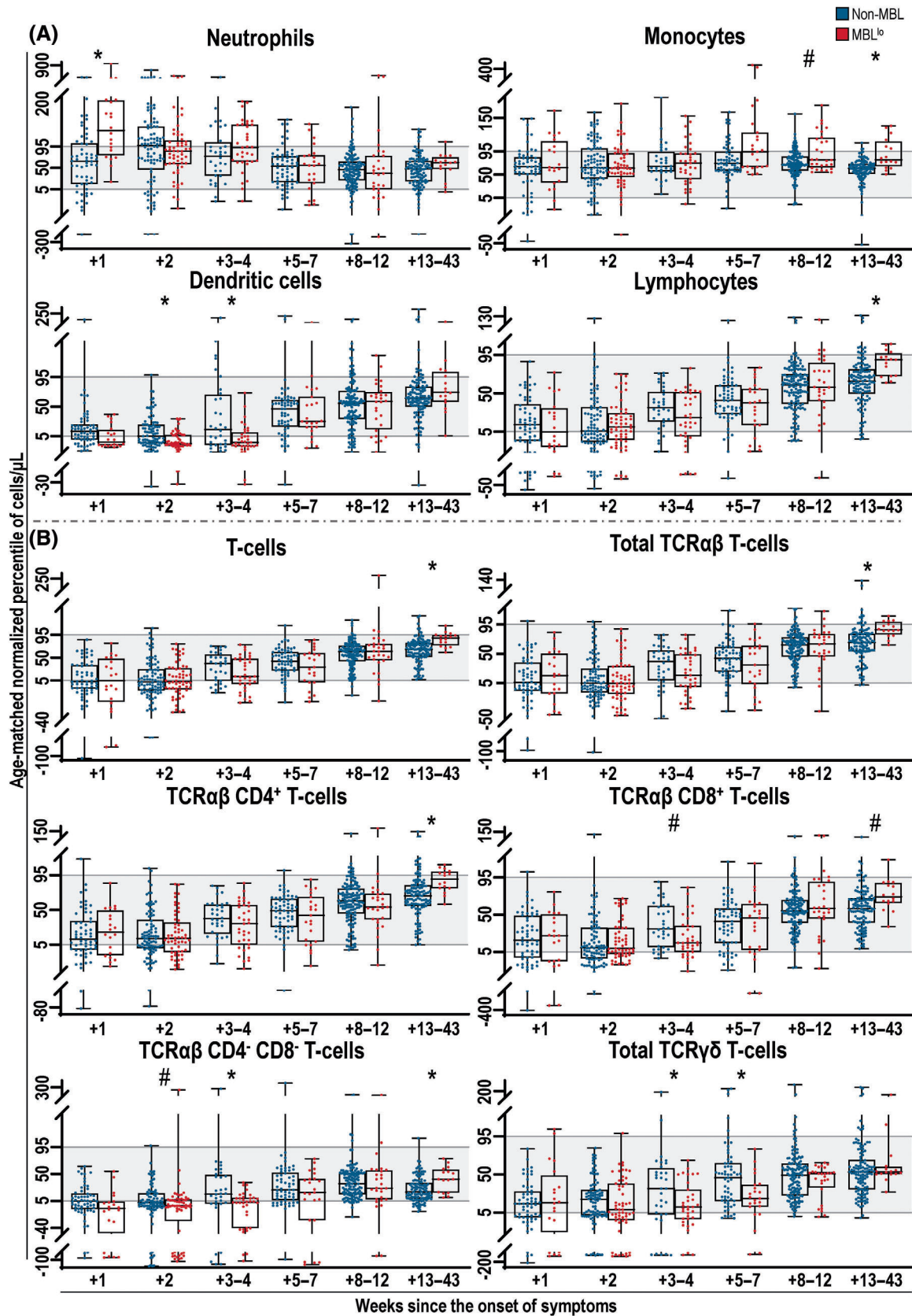


FIGURE 3 Legend on next page.

Clonal B cells kinetics were investigated in a subset of 62/74 (84%) MBL^{lo} COVID-19 patients who were studied at least at two different time-points. The persistence of clonal B cells with a similar clonal size was confirmed for all patients at both time-points (recruitment and last follow-up). In addition, we reassessed a subgroup of MBL^{lo} COVID-19 patients 1 year after the onset of the disease, from which all of them (38/38, 100%) showed detectable clonal B cells in blood at similar levels to those observed in the first analysis (median [IQR] of 0.25 [0.07–3.83] at diagnosis vs. 0.21 [0.1–1.6] after 1 year, $p = .94$).

3.2 | Kinetics of the major populations of leukocytes and anti-SARS-CoV-2 antibodies in blood of MBL^{lo} versus non-MBL patients during and after COVID-19

Significant differences were found in the immune cell kinetic profiles of MBL^{lo} versus non-MBL patients during and after COVID-19. Thus, early after the onset of symptoms, MBL^{lo} patients showed (vs. non-MBL) significantly higher median WBC counts (+99thp vs. +52thp of HD, respectively; $p \leq .0001$), due to greater neutrophil levels (+129thp of HD in MBL^{lo} vs. +64thp of HD in non-MBL patients, $p \leq .0001$) (Figure 3A and Supplementary Figure 2). Conversely, the nadir of dendritic cells at week +2 was also significantly more pronounced in MBL^{lo} versus non-MBL patients (–6thp vs. +5thp of HD, $p = .01$) such profile extending until week +3–4 (–4thp vs. +15thp of HD, $p = .01$) (Figure 3A). Interestingly, similar kinetics were observed for all major subsets of DCs (plasmacytoid DCs, as well as both CD1c⁺ and CD141⁺ myeloid DCs), though differences between the two patient groups were less pronounced for each dendritic cell subset (vs. the whole DC population), with only a trend toward lower levels in MBL^{lo} COVID-19 patients was found (Supplementary Figure 3). Of note, pre-GC B-cell counts were also significantly lower in MBL^{lo} versus non-MBL patients (+20thp vs. +58thp of HD, $p \leq .0001$) (Figure 4A), including all pre-GC B-cell subsets analyzed (Supplementary Figure 4). In addition, a tendency toward a lower decrease in MBC levels was observed in blood of MBL^{lo} versus non-MBL patients at week +2 (+29thp vs. +19thp of HD, $p = .08$; Figure 4A), due to lower CD27⁺CD21⁺ B-cell numbers (+29thp vs. +15thp of HD, $p = .05$; Supplementary Figure 5), with a similar distribution of the IgH-isotype and subclass of MBC subsets (Supplementary Figure 6).

Once the blood leukocyte populations started to return toward normal counts at week +3–4, significantly lower levels of TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁺CD8[–] T cells (+2thp of HD vs. +16thp of HD, $p = .002$), TCR $\gamma\delta$ T cells (+12thp vs. +33thp of HD, $p = .02$), and a trend toward decreased median TCR $\alpha\beta^+$ CD8⁺ T-cell counts (+16thp vs. +33thp of HD, $p = .07$) (Figure 3B) were found in MBL^{lo} versus non-MBL patients. Conversely, at this time-point, total PC were significantly increased over normal levels in blood in 95% of MBL^{lo} versus only 59% of non-MBL cases ($p = .006$) (Figure 2A and Figure 4B), mainly due to more mature CD20[–]CD138⁺ PC, which also remained more elevated in MBL^{lo} versus non-MBL patients from week +3 to week +8 (+808thp vs. +302thp of HD at weeks +3–4, $p = .02$; and +139thp vs. +52thp of HD at weeks +5–7, $p = .02$) (Figure 4B and Supplementary Figure 7). These different PC kinetics observed at week +3–4 between both groups of COVID-19 patient, specifically involved the IgG3, IgA1, and IgA2 PC subsets (Supplementary Figure 8), which also accounted for the delayed recovery of normal PC values in MBL^{lo} versus non-MBL patients at week +5–7 (total PC counts: +56thp vs. +31thp of HD, $p = .03$; IgA1 PC: +49thp vs. +22thp of HD, $p = .03$; and IgA2 PC: +49thp vs. +19thp of HD, $p = .03$) (Figure 4B; Supplementary Figure 8).

In the longer-term (week +8–43), differences were still found between MBL^{lo} and non-MBL COVID-19 patients. These consisted of a trend toward higher WBC counts in MBL^{lo} (+73thp vs. +54thp of HD, $p = .07$) due to increased monocyte (+78thp vs. +62thp of HD, $p = .0006$) and lymphocyte numbers (+89thp vs. +64thp of HD, $p = .02$) (Figure 3A), particularly due to increased counts (all subsets) of TCR $\alpha\beta^+$ T cells (+87thp vs. +67thp of HD, $p = .02$) (Figure 3B).

Overall, higher median antibody levels were also found in plasma of MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients prior to the PC peak in blood, at week +2 (3651 [2405–4190] AU/mL vs. 2414 [1048–3887] AU/mL, $p = .03$ for anti-S IgM; 135 [94–169] AU/mL vs. 94 [38–156] AU/mL, $p = .04$ for anti-N IgG; and 197 [112–209] AU/mL vs. 132 [36–196] AU/mL, $p = .02$ for anti-N IgA) (Figure 4C); such higher levels were still detectable at week +3–4 for anti-N IgA (195 [144–211] AU/mL vs. 149 [34–207] AU/mL, $p = .02$) and anti-S IgM (4063 [3816–4576] AU/mL vs. 3746 [2174–4252] AU/mL, $p = .07$). This was also associated with a trend toward higher median levels of anti-S IgG antibodies in plasma of MBL^{lo} vs. non-MBL patients in the medium term (107 [94–115] AU/mL vs. 99 [39–112] AU/mL at week +3–4, $p = .10$; and 115 [92–120] AU/mL vs. 80 [46–112] AU/mL at week +8–12, $p = .06$) and significantly

FIGURE 3 Kinetics of the major populations of leukocytes and T-cell subsets with a significantly different distribution in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL patients during and after COVID-19. (A) Kinetics of the major leukocyte subsets; (B) Kinetics of different T-cell subsets. Data expressed as absolute cell counts/ μ L for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μ L for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3–4, +5–7, +8–12, and +13–43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th–95th percentile values (normal range) in blood of pre-pandemic non-MBL HD. *Statistically significant differences ($p \leq .05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL subjects; # tendency for statistically significant differences ($p > .05$ and $\leq .10$). HD, healthy donor; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; TCR, T-cell receptor.

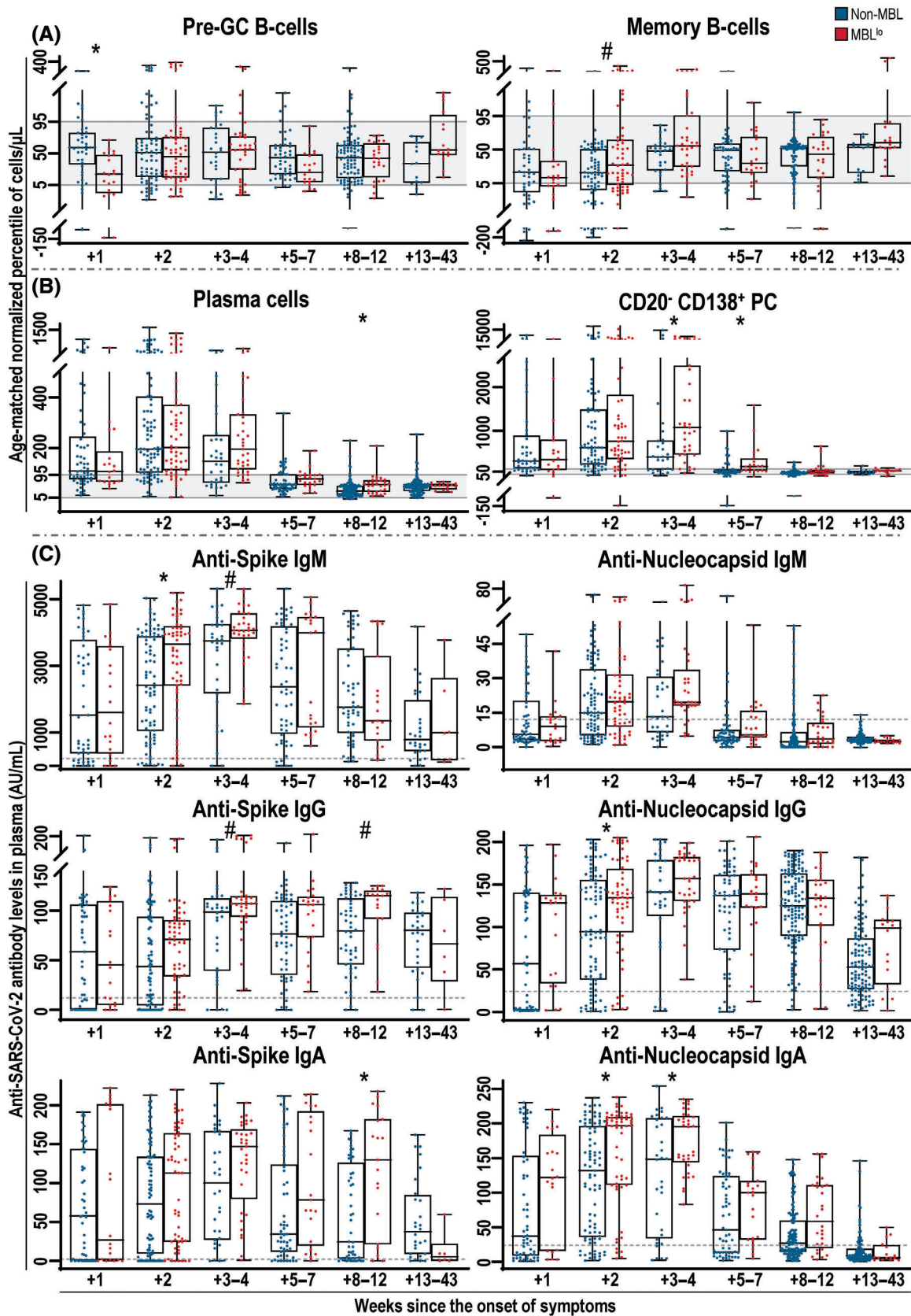


FIGURE 4 Legend on next page.

greater anti-S IgA median levels at week +8–12 (130 [21–182] AU/mL vs. 24 [3–127] AU/mL, $p = .03$) (Figure 4C).

3.3 | Detectable viral load in blood of MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients

A significantly higher percentage of MBL^{lo} samples were positive for SARS-CoV-2 RNA in plasma at week +1 after the onset of COVID-19-related symptoms (35% vs. 13% of non-MBL patients; $p = .05$) (Supplementary Table 8). Subsequently, no further differences were observed between both groups of patients at any time-point analyzed (Supplementary Table 8).

4 | DISCUSSION

MBL^{lo} has been recently identified as an independent risk factor for severe COVID-19,¹⁷ but the underlying immune dysregulation still remains unknown. Here we investigated the long-term (longitudinal) immune cell and anti-SARS-CoV-2 antibody profile in blood of MBL^{lo} individuals infected by SARS-CoV-2 prior to the introduction of vaccination, aiming at better understanding the greater severity of COVID-19 in MBL^{lo} versus non-MBL patients. For more accurate identification of immune alterations associated with MBL^{lo} individuals during COVID-19, immune cell counts normalized according to age (which affects to blood leukocyte counts) and the onset of first COVID-19-related symptoms were used.

Previous reports have extensively described alterations in the distribution of the immune cells during the acute COVID-19 infection. These mainly consisted of increased neutrophil and monocyte counts in blood, associated with significantly decreased eosinophil, basophil, dendritic cell and lymphocyte counts, particularly among cases with more severe disease;^{18–21} in addition, a substantial expansion of PC has been also described, such increase being more pronounced in patients with severe versus mild COVID-19.^{18–21} Overall, our data show similarly altered immune profiles in blood of MBL^{lo} COVID-19 patients early after the onset of COVID-19-related symptoms, which persisted during the first 4 weeks of the disease. Afterward, blood cell

counts started to recover, and in the majority of cases, they reached normal levels by week +5 after the onset of symptoms, in line with what has been described for patients hospitalized for severe COVID-19.^{18,30} During the convalescence phase, several blood cell populations persisted altered in number in MBL^{lo} subjects, reflecting an incomplete recovery of the immune system, almost 1 year after the onset of the disease.¹⁹ In line with the PC kinetics in blood, plasma levels of specific IgM, IgG, and IgA antibodies against different SARS-CoV-2 proteins were also detected in a substantial fraction of MBL^{lo} patients, early after the onset of symptoms (i.e., week +1), reaching a maximum at week +3–4 in parallel to the PC peak in blood. Once the viral infection was controlled, IgM and IgA levels decreased, whereas IgG antibody levels remained elevated until week +13, when they also started to decrease, in line with previous data. Of note, similar kinetics were observed for anti-S and anti-N antibody levels in plasma throughout the whole follow-up period. However, anti-S (i.e., IgM) antibodies persisted at low but still detectable levels in the longer-term compared with anti-N antibodies, in line with previous observations.³¹ Altogether, the immune cell and antibody kinetics here reported for MBL^{lo} COVID-19 patients fully resemble those described for (more) severe COVID-19 patients,^{21,32,33} and would support the previously reported association between MBL^{lo} and an increased risk for more severe COVID-19.¹⁷

Fully in line with this hypothesis, further specific comparison between MBL^{lo} and non-MBL COVID-19 patients revealed higher neutrophil counts at week +1 in MBL^{lo} patients, a well-established surrogate marker for more severe COVID-19.^{18,21} In addition, MBL^{lo} COVID-19 patients also showed significantly lower pre-GC B-cell counts (vs. non-MBL COVID-19 patients) at this early time point. Of note, lower numbers of pre-GC B-cells have been previously reported in blood of otherwise healthy MBL^{lo} subjects,¹² which could contribute to an impaired and/or delayed B-cell response against new antigen challenges, due to a narrower naïve B-cell repertoire.¹⁰ At week +2, a more pronounced decrease of dendritic cell counts was also observed in blood of MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients, such decrease extending until week +4. In parallel, a more marked decrease of TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD8⁻ and TCR $\gamma\delta^+$ T cells was observed in blood of MBL^{lo} patients, which extended from week +2 to week +7, while in non-MBL patients, these cell populations returned to normal levels

FIGURE 4 Kinetics of B-cell and plasma cell subsets, and SARS-CoV-2 specific antibody levels in plasma of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Panels A and B show the kinetics of B-cell and plasma cell subsets, respectively, with data expressed as absolute cell counts/ μ L for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute of cell counts/ μ L for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Gray horizontal bands represent the 5th–95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. (C) Plasma levels (AU/mL) of anti-spike and anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins specific IgM, IgG, and IgA antibodies in MBL^{lo} subjects. Ticked horizontal lines represent the cutoff for positivity for each antibody isotype (220 AU/mL for IgM, 12 AU/mL for IgG and 2 AU/mL for IgA anti-spike; 12 AU/mL for IgM and 24 AU/mL for both IgG and IgA anti-nucleocapsid protein antibodies). For the three panels (A, B and C), subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of COVID-19 symptoms: +1, +2, +3–4, +5–7, +8–12, and +13–43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum value for each group. *Statistically significant differences ($p \leq .05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL subjects; # tendency for statistical differences ($p > .05$ and $\leq .10$). AU, arbitrary units; d, days; GC, germinal center; HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

already at week +4. Decreased dendritic cell and T-cell subset counts in blood of COVID-19 patients has been associated in the acute phase of infection with cell migration from blood to specific tissues, including secondary lymphoid organs for antigen-presentation to inexperienced B cells and infected tissues where a higher viral load exists, respectively.³⁴ Conversely, a more pronounced increase in PC counts, particularly due to more mature CD20⁻CD138⁺ PC, was observed in blood of MBL^{lo} patients early after the onset of COVID-19 symptoms, followed by a peak at week +4, when PC counts were already decreasing toward normal levels in non-MBL subjects. In line with these findings, higher levels of SARS-CoV-2-specific antibodies were also detected during the acute phase of infection, between weeks +2 and +4. In contrast to this data, recent studies have reported a defective humoral response (i.e., lower plasma levels of specific antibodies) to vaccination against SARS-CoV-2 in high-count MBL (MBL^{hi}) and CLL patients, resulting in failure to seroconversion after complete vaccination schedules in a significant proportion of cases.^{35,36} Although data from vaccination might not be comparable with a complex disease such as COVID-19, higher antibody levels in MBL^{lo} COVID-19 patients might reflect the different biology of MBL^{lo} versus MBL^{hi} and CLL. Altogether, these findings reveal a delayed humoral immune response in MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients, which might be related to the more restricted BCR repertoire of pre-GC B cells in MBL^{lo},¹⁰ and the higher probability for a delayed ability to recognize a new virus like SARS-CoV-2, with the subsequent need for higher antibody levels for an effective clearance of the meanwhile higher viral load. In this regard, previous studies have also shown that anti-SARS-CoV-2 antibody levels typically peak later in severe versus mild COVID-19 patients, while reaching higher plasma levels in the former cases.^{33,37,38} Fully in line with our data, recent studies confirmed that COVID-19 patients aged >60 years (who are presumably enriched in MBL^{lo} cases) had significantly higher antibody responses and more severe COVID-19 compared with younger subjects, particularly children, who have a significantly broader pre-GC B-cell repertoire. Such higher antibody titres observed in older patients undergoing more severe COVID-19 are most probably required for complete clearance of the greater viral load achieved in the acute phase of infection prior to an effective humoral response.^{32,33,38,39} Consistent with these data, here we found a higher frequency of MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients to have detectable SARS-CoV-2 RNA in plasma during the first week after the onset of symptoms.

After COVID-19, still some differences were observed in our cohort between MBL^{lo} and non-MBL patients, further supporting the persistence of immune alterations for relatively long period of time among MBL^{lo} subjects. These included higher monocyte and T-cell counts in blood of MBL^{lo} versus non-MBL COVID-19 patients. However, increased T-cell counts have been previously described in blood of MBL^{lo} versus non-MBL HD aged 60–70 years, suggesting these longer-term alterations might be related to MBL^{lo} itself rather than COVID-19.¹¹

In summary, our data reveal altered immune cell and SARS-CoV-2 specific antibody profiles in blood of MBL^{lo} patients which mimic those previously described for severe COVID-19 disease in adults and

that are consistent with a delayed and significantly more pronounced innate (i.e., dendritic cell and T cell) and PC immune response in MBL^{lo} versus non-MBL patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Julia Almeida, Miguel Marcos, and Alberto Orfao contributed to the conceptualization, design, and supervision of the study, as well as to recruitment of funding. Julia Almeida, Jacques J.M. van Dongen, and Alberto Orfao contributed to the design and development of antibody panels. Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Alba Pérez-Pons, Alba Torres-Valle, Julio Pozo, Óscar González-López, Marta Bernal-Ribes, Oihane Pérez-Escurza, Francisco Javier García Palomo, and Miryam Santos Sánchez performed the experiments. Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Quentin Lecrevisse, Alba Pérez-Pons, Alba Torres-Valle, Marta Bernal-Ribes, Martín Pérez-Andrés, F. Javier Morán-Plata, Daniela Damasceno, Vitor Botafogo, Noemí Muñoz-García, Rafael Fluxa, Julia Almeida, and Alberto Orfao analyzed and interpreted data. Cristina Carbonell, José Ángel Martín-Oterino, Amparo López-Bernús, Moncef Belhassen-García, Lourdes Vazquez, Guillermo Hernández-Pérez, Pilar Leoz, Pilar Costa-Alba, Elena Pérez-Losada, Ana Yeguas, Marta García-Blázquez and Miguel Marcos selected COVID-19 patients for the study and collected their relevant clinical information. Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Cristina Carbonell, Julia Almeida, Miguel Marcos, and Alberto Orfao coordinated the planning and execution of the experiments. Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Julia Almeida, and Alberto Orfao had full access to and verified the underlying data. Guillermo Oliva-Ariza, Julia Almeida, and Alberto Orfao wrote the paper. All the authors critically reviewed the manuscript and approved the final version of the document.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by “Early Cancer Research Initiative Network on MBL (ECRINM3)” ACCELERATOR award (CRUK-UK-, Fundación AECC-Spain and Associazione Italiana per la Ricerca Sul Cancro [Italy-], by the CB16/12/00400 (CIBERONC), COV20/00386, PI17/00399, and PI22/00674, grants from the *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación*, (Madrid, Spain) co-funded by *FONDOS FEDER*, and by the SA109P20 (*Consejería de Educación*) and GRS-COVID-33/A/20 (*Gerencia Regional de Salud, Consejería de Sanidad*) grants from *Junta de Castilla y León* (Valladolid, Spain), by 0639-IDIAL-NET-3-3 grant (INTERREG POCTEP Spain-Portugal) from *Fondo Europeo de Desarrollo Regional*. G. Oliva-Ariza is supported by a grant (PR-2019 487971) from the *Consejería de Educación, Junta de Castilla y León* (Valladolid, Spain), B. Fuentes-Herrero is supported by the 0639-IDIAL-NET-3-3, and ECRIN-M3 grants, and Ó. González-López is supported by a grant (FI20/00116) from *Instituto de Salud Carlos III* co-funded by *Fondo Social Europeo Plus (FSE+)*.

The authors gratefully acknowledge all the other leader members from the ECRIN-M3 Consortium not included in the authors list (Co-PI: James Batchelor, Francesco Forconi, Paolo Ghia, Marcos González, Andrew Rawstron, Freda Stevenson, Jonathan Strefford, Miguel Vicente).

The authors would like to thank the *Spanish National DNA Bank (Banco Nacional de ADN Carlos III, University of Salamanca, PT20/00085, integrated in the Biobanks and Biomodels Platform of the Instituto de Salud Carlos III)* for their support in sample and data collection.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Alberto Orfao, Julia Almeida, and Jacques J.M. van Dongen report being one of the inventors on the EuroFlow-owned European patent 119646NL00 registered on November 2019 (“Means and methods for multiparameter flow cytometry-based leukocyte subsetting”), and they are also authors of the PCT patent WO 2010/ 140885A1 (“Methods, reagents and kits for flow cytometric immunophenotyping”). The Infinicyt software is based on intellectual property of the University of Salamanca (Salamanca, Spain). All above mentioned intellectual property and related patents are licensed to Becton/Dickinson Biosciences (San José, California), which pays royalties to the University of Salamanca and the EuroFlow Consortium. These royalties are exclusively used for continuation of the EuroFlow collaboration and sustainability of the EuroFlow Consortium. The other authors declare no competing financial interests or any other conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

De-identified data collected during the study on individual patients will be available via the Spanish National DNA Bank Carlos III, immediately after publication for researchers who provide a proposal that is approved by the external scientific committee and ethics committee of the Spanish National DNA Bank.

ORCID

Guillermo Oliva-Ariza  <https://orcid.org/0000-0002-9653-9849>

Óscar González-López  <https://orcid.org/0000-0002-4169-4294>

Julia Almeida  <https://orcid.org/0000-0003-3124-8917>

REFERENCES

- Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325-332.
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the world health organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-1748.
- Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(19):575-583.
- Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009;114(2):33-37.
- Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002;100(2):635-639.
- Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al. Monoclonal CD5+ and CD5– B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*. 2004;103(6):2337-2342.
- Slager SL, Parikh SA, Achenbach SJ, et al. Progression and survival of MBL: a screening study of 10 139 individuals. *Blood*. 2022;140(15):1702-1709.
- Criado I, Rodríguez-Caballero A, Gutiérrez ML, et al. Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after seven years of follow up and is associated with a poorer outcome. *Haematologica*. 2018;103(7):1198-1208.
- Shanafelt TD, Kay NE, Parikh SA, et al. Risk of serious infection among individuals with and without low count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Leukemia*. 2021;35(1):239-244.
- Criado I, Blanco E, Rodríguez-Caballero A, et al. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(12):2701-2705.
- Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, et al. Age- and sex-matched Normal leukocyte subset ranges in the general population defined with the EuroFlow lymphocyte screening tube (LST) for monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL subjects. *Cancers (Basel)*. 2022;15(1):58.
- Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol*. 2012;87(7):721-724.
- Whitaker JA, Parikh SA, Shanafelt TD, et al. The humoral immune response to high-dose influenza vaccine in persons with monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Vaccine*. 2021;39(7):1122-1130.
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574.
- Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA J Am Med Assoc*. 2020;323(13):1239-1242.
- Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062.
- Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Carbonell C, et al. High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients. *Blood*. 2023;141(3):309-314.
- Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):89-100.
- Rodríguez L, Pekkarinen PT, Lakshminathan T, et al. Systems-level immunomonitoring from acute to recovery phase of severe COVID-19. *Cell Rep Med*. 2020;1(5):100078.
- Mathew D, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020;369(6508).
- Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, et al. Different innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection of asymptomatic, mild, and severe cases. *Front Immunol*. 2020;11(December):1-16.
- Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094-2103.
- Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, et al. EuroFlow lymphoid screening tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods*. 2019;475:112662.
- Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2208-2219.e16.
- van der Pan K, de Bruin-Versteeg S, Damasceno D, et al. Development of a standardized and validated flow cytometry approach for monitoring of innate myeloid immune cells in human blood. *Front Immunol*. 2022;13(September):1-26.
- Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, et al. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2010;78(3):194-200.

27. Leuzinger K, Osthoff M, Dräger S, et al. Comparing immunoassays for sars-cov-2 antibody detection in patients with and without laboratory-confirmed sars-cov-2 infection. *J Clin Microbiol*. 2021;59(12):1-14.
28. Al-Jighefee HT, Yassine HM, Nasrallah GK. Evaluation of antibody response in symptomatic and asymptomatic covid-19 patients and diagnostic assessment of new IgM/IgG elisa kits. *Pathogens*. 2021; 10(2):1-18.
29. Nguyen NN, Mutnal MB, Gomez RR, et al. Correlation of ELISA method with three other automated serological tests for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *PLoS One*. 2020;15(10 October):1-9.
30. Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity*. 2021;54(6):1257-1275.e8.
31. Isho B, Abe KT, Zuo M, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 2020;5(52):1-21.
32. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*. 2020;183(4):1024-1042.e21.
33. Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-7.
34. Zhou R, To KKW, Wong YC, et al. Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity*. 2020;53(4):864-877.e5.
35. Shen Y, Freeman JA, Holland J, et al. COVID-19 vaccine failure in chronic lymphocytic leukaemia and monoclonal B-lymphocytosis; humoral and cellular immunity. *Br J Haematol*. 2022;197(1):41-51.
36. Shen Y, Freeman JA, Holland J, et al. Multiple COVID-19 vaccine doses in CLL and MBL improve immune responses with progressive and high seroconversion. *Blood*. 2022;140(25):2709-2721.
37. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, 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):565-574.
38. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020; 584(7821):437-442.
39. Selva KJ, van de Sandt CE, Lemke MM, et al. Systems serology detects functionally distinct coronavirus antibody features in children and elderly. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-14.

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: Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Lecrevisse Q, et al. Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Hematol*. 2023;1-14. doi:[10.1002/ajh.27119](https://doi.org/10.1002/ajh.27119)

ARTÍCULO 3

“Cinética a corto plazo de las células del sistema inmune y de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 tras vacunación en adultos sanos y en sujetos con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”

Guillermo Oliva-Ariza^{#1,2}, Ignacio Criado^{#1,2}, Blanca Fuentes-Herrero^{1,2}, Cristina Carbonell^{2,3}, José Ignacio Sánchez-Gallego^{1,2}, Amparo López-Bernús^{2,3,4}, María Laura Gutiérrez^{1,2,5}, Marta Bernal-Ribes^{1,2}, Quentin Lecrevisse^{1,2,5}, Jacques J.M. van Dongen¹, Miguel Marcos^{*2,3}, Julia Almeida^{*1,2,5}, Alberto Orfao^{*1,2,5} en representación del Consorcio ECRIN-M3.

¹Programa de Investigación Clínica y Traslacional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC – Universidad de Salamanca); Servicio de Citometría, NUCLEUS; Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España.

³Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁴Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, España.

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

#GO-A y IC han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben considerarse como primer autor del mismo.

*MM, JA y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor del mismo.

Frontiers in Immunology. Manuscrito enviado.

La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en el Anexo I al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. El rápido desarrollo de distintas vacunas frente al virus SARS-CoV-2 ha permitido llevar a cabo campañas de vacunación masiva a nivel mundial, tan solo un año después del inicio de la pandemia de COVID-19. La implementación global de estos programas de vacunación frente a SARS-CoV-2 ha resultado especialmente eficaz a la hora de prevenir los casos de COVID-19 grave, lo que se ha traducido en una reducción significativa del número de muertes causadas por la infección. La mayoría de los estudios dirigidos a establecer la eficacia de las vacunas frente a SARS-CoV-2 se han limitado a analizar los niveles de anticuerpos específicos en plasma y, en menor medida, la capacidad de generar memoria inmunológica para elaborar una respuesta eficiente y rápida frente a una nueva infección por el virus. Sin embargo, sigue sin conocerse con exactitud la cinética de las distintas poblaciones de células inmunes en sangre, durante las etapas tempranas de la respuesta frente a la vacunación.

Diversos estudios han demostrado la existencia de una inmunodeficiencia secundaria de tipo humoral en la linfocitosis B monoclonal de bajo recuento (LBM^{lo}), y que condicionaría que estos sujetos con LBM^{lo} sean más susceptibles a desarrollar infecciones graves. De hecho, recientemente se ha identificado en el contexto de la infección por SARS-CoV-2, la LBM^{lo} como un factor de riesgo para desarrollar una COVID-19 grave durante las primeras olas de la pandemia por COVID-19, evidenciándose además algunas alteraciones inmunológicas que podrían contribuir a explicar la mayor vulnerabilidad de estos sujetos a la infección, de las que cabe destacar el descenso en sangre del número de linfocitos B naive, asociado a un retraso en la respuesta por parte de las células plasmáticas (CP) durante la COVID-19. Pese a que varios trabajos recientes han descrito que los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) y linfocitosis B monoclonal de alto recuento (LBM^{hi}) muestran una respuesta humoral deficitaria a la vacunación dirigida frente a SARS-CoV-2, en la actualidad no existe información disponible en relación con la respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 en sujetos con LBM^{lo}.

Objetivo. En este apartado del trabajo doctoral, analizamos la cinética en sangre periférica (SP) de las diferentes poblaciones de células del sistema inmune, y particularmente las distintas subpoblaciones de linfocitos B, y los niveles de anticuerpos específicos frente a la proteína *spike* (S) de SARS-CoV-2 generados en respuesta a la vacunación frente a este virus en donantes sanos sin LBM y sujetos con LBM^{lo}.

Sujetos, material y métodos. En conjunto, entre febrero y abril de 2021 estudiamos un total de 75 sujetos vacunados frente al SARS-CoV-2, entre los que se incluyeron 66 voluntarios (28 hombres / 38 mujeres con una mediana de edad de 46 años [IQR: 36 – 56 años]), que recibieron el programa completo de vacunación con las dos dosis, y no presentaron en el momento de la inmunización (aparte de la LBM^{lo}) ninguna patología asociada a inmunodeficiencia, además de no estar bajo ningún tratamiento inmunomodulador, ni presentar infección (natural) por SARS-CoV-2 a lo largo todo el programa de vacunación y periodo de seguimiento del estudio. Estos sujetos se clasificaron de acuerdo con la presencia de LBM^{lo} en: 16/66 (24%) sujetos con LBM^{lo} (7 hombres / 9 mujeres; mediana de edad de 53 años [IQR: 45 – 65 años]) y 50/66 (76%) sujetos sin LBM (21 hombres / 29 mujeres; mediana de edad de 43 años [IQR: 34 – 51 años]). Además, estos sujetos se clasificaron también de acuerdo con su estado respecto a la exposición a SARS-CoV-2 previo a recibir la vacuna. De los 66 individuos se extrajeron un total de 295 muestras de SP, correspondientes a 71 sujetos con LBM^{lo} y 224 individuos sin LBM, en los siguientes tiempos: antes de recibir la primera dosis, de forma previa a recibir la segunda dosis de la vacuna y 30 días después de haberla recibido. Además, en un subgrupo de 18/66 sujetos se llevó a cabo un seguimiento más estrecho, para lo que se obtuvieron muestras de SP adicionales en los días +4, +7 y +10 después de la administración de cada dosis de la vacuna. En cada una de las muestras de SP analizamos la distribución de las distintas poblaciones de células del sistema inmune, con especial detalle de las diferentes poblaciones de linfocitos B, empleando la citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad. La (semi)cuantificación de los niveles de anticuerpos de isotipo IgG e IgA frente a la proteína *spike* (S) de SARS-CoV-2 se realizó mediante técnica de ELISA con kits comerciales.

Resultados. En general, la cinética observada para las diferentes poblaciones de células del sistema inmune presentaba ligeras diferencias entre los dos grupos de donante sanos sin LBM que analizamos (los que habían pasado y los que no habían pasado previamente la COVID-19) tras la administración de la primera dosis de la vacuna frente al SARS-CoV-2. Así, en ambos observamos un descenso en el número de leucocitos totales al día +4 tras la primera dosis de la vacuna, debido a una disminución significativa de las cifras de granulocitos neutrófilos y de linfocitos entre los sujetos que habían pasado la COVID-19. Posteriormente, al día +7 después

de la primera dosis, existía una reducción transitoria en el número de monocitos circulantes en este mismo grupo de sujetos. Tras la administración de la segunda dosis de la vacuna, las poblaciones de células del sistema inmune mostraron el mismo patrón de comportamiento que el observado tras la primera dosis, si bien los cambios en las distintas poblaciones de linfocitos fueron más acusados en aquellos sujetos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2. Como cabía esperar, un análisis más detallado de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B reveló que la respuesta a la segunda dosis de la vacuna estaba condicionada por el estado previo a la vacuna de exposición a SARS-CoV-2, de tal manera que en los sujetos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2, se observó un descenso significativo de los linfocitos B pre-centro germinal (CG), mientras que en los que habían pasado la COVID-19, la disminución de las células B fue a expensas de los linfocitos B de memoria CD27⁺. Cabe señalar que las CP presentaron una cinética completamente diferente en función de si existía o no exposición previa al virus. Así, en los sujetos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2, el número de CP aumentó significativamente tras la administración de la primera dosis de la vacuna, alcanzando los valores más elevados a los 10 días de la inoculación, mientras que el número máximo de CP se alcanzaba en el día +7 tras la administración de la segunda dosis de la vacuna. Por el contrario, en aquellos sujetos sin LBM que habían pasado previamente la COVID-19, las CP alcanzaron sus niveles más elevados en sangre el día +7 tras la primera dosis (siendo estos niveles superiores a los observados en los sujetos que no habían tenido contacto previo con el virus), sin que pudiera observarse ningún incremento en el número de CP en sangre tras la administración de la segunda dosis. Merece destacar que el aumento de las CP en sangre se debía casi en su totalidad a las CP de isotipo IgG⁺ y, en concreto, a las CP IgG1⁺ y, en menor medida a las CP IgG3⁺.

Respecto a la respuesta humoral específica frente a la proteína S de SARS-CoV-2, constatamos que los niveles de anticuerpos en plasma seguían la misma cinética que la descrita previamente para las CP. En este sentido, los niveles de anticuerpos específicos de isotipo IgG e IgA aumentaron significativamente al día +10 tras la primera dosis en aquellos sujetos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2, y alcanzaron el pico máximo en el día +7 tras la segunda dosis de la vacuna. En cambio, aquellos individuos que habían pasado previamente la COVID-19, el pico máximo de anticuerpos específicos se alcanzó al día +7 tras

la primera dosis, manteniéndose los anticuerpos en unos niveles estables (en “meseta”) a partir ese momento, incluso después de la administración de la segunda dosis de la vacuna.

Finalmente, cabe señalar que la distribución de las distintas poblaciones de células del sistema inmune analizadas en los sujetos con LBM^{lo} era muy similar a la de los que no presentaban LBM, si bien podían apreciarse algunas diferencias significativas entre ambos grupos. En concreto, estas diferencias afectaban principalmente a la respuesta humoral, consistiendo en unos niveles más bajos de linfocitos B en SP de forma previa a la administración de la segunda dosis de la vacuna entre los sujetos con LBM^{lo} (respecto a los niveles prevacunación de cada grupo), junto con niveles significativamente más elevados de CP circulantes en sangre en los dos momentos analizados, antes de la administración de la segunda dosis y 30 días después de la misma. Por otra parte, observamos como la vacunación frente a SARS-CoV-2 inducía una respuesta de anticuerpos similar en los sujetos con y sin LBM^{lo}. No obstante, en este último grupo se apreciaba un retraso respecto a los sujetos sin LBM en el tiempo necesario para alcanzar los niveles máximos de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2, tanto de los anticuerpos de isotipo IgG como IgA.

Conclusiones. La cinética en SP de las distintas poblaciones de células inmunes y de los niveles de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 varía según haya existido o no exposición a SARS-CoV-2 previa a la vacunación, observándose una respuesta humoral (de CP y de anticuerpos) más rápida entre los sujetos vacunados que habían pasado previamente la COVID-19, respecto a aquellos que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2. Además, la distribución en sangre de las células del sistema inmune en respuesta a la vacunación está alterada en los sujetos con LBM^{lo} respecto a los sujetos que no presentaban LBM, afectando estas diferencias principalmente a los linfocitos B y a las CP, reflejando estas células un retraso de la respuesta de anticuerpos similar a la observada en la respuesta inmune frente a infección natural en los pacientes COVID-19 con LBM^{lo}.

Early immune cell and antibody kinetics following SARS-CoV-2 vaccination in healthy adults and low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

Guillermo Oliva-Ariza^{†1,2}, Ignacio Criado^{†1,2}, Blanca Fuentes-Herrero^{1,2}, Cristina Carbonell^{2,3}, José Ignacio Sánchez-Gallego^{1,2}, Amparo López-Bernús^{2,3,4}, María Laura Gutiérrez^{1,2,5}, Marta Bernal-Ribes^{1,2}, Quentin Leclercq^{1,2,5}, Jacques J.M. van Dongen¹, Miguel Marcos^{‡2,3}, Julia Almeida^{‡*1,2,5}, Alberto Orfao^{‡*1,2,5} on behalf of the ECRIN-M3 Consortium

¹Translational and Clinical Research Program, Cancer Research Center (IBMCC, CSIC – University of Salamanca); Cytometry Service, NUCLEUS; Department of Medicine, University of Salamanca (Universidad de Salamanca, <https://ror.org/02f40zc51>), Salamanca, Spain

²Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

³Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; Department of Medicine, University of Salamanca (Universidad de Salamanca, <https://ror.org/02f40zc51>), Salamanca, Spain

⁴Department of Infectious Diseases, University Hospital of Salamanca, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, Spain

⁵Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

[†]GO-A and IC equally contributed to the manuscript, and they both should be considered as first authors.

[‡]MM, JA, and AO equally contributed to the manuscript, and they should all be considered as senior authors.

*** Correspondence:**

Prof. Alberto Orfao, MD, PhD
orfao@usal.es

Prof. Julia Almeida, MD, PhD
jalmeida@usal.es

Keywords: immune response, SARS-CoV-2, COVID-19, vaccination, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis, immunodeficiency.

Abstract

Background: Vaccines against SARS-CoV-2 have been rapidly developed, within the first year since the initial COVID-19 outbreak. Most studies assessing the immune effectiveness of these vaccines have focused on measuring the levels of specific (neutralizing) antibody responses and to a lesser extent also, their capacity to generate memory B-cells that confer long-term protection against SARS-CoV-2 infection. However, the early kinetics of the immune response to the SARS-CoV-2 at the cellular level still remain poorly understood, particularly among individuals with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{lo}), a condition that recently emerged as a novel risk factor for severe COVID-19, associated with a delayed plasma cell (PC) response in blood.

Objective: Here we investigated the kinetics of the immune cell and antibody responses to SARS-CoV-2 vaccination in blood of non-MBL healthy donors (HD) in comparison to MBL^{lo} subjects.

Methods: Overall, the kinetics of 42 different immune-cell populations were analyzed in 66 subjects (50 non-MBL HD and 16 MBL^{lo}) prior to and at different time points after vaccination against SARS-CoV-2, using high-sensitivity flow cytometry. Plasma levels of anti-spike SARS-CoV-2 IgG and IgA antibodies were measured in parallel by ELISA.

Results: Among non-MBL HD, total leukocytes decreased at day +4 following the administration of each SARS-CoV-2 vaccine dose, due to lower neutrophil and lymphocyte counts in both SARS-CoV-2 naive and previously infected non-MBL HD. In contrast, an earlier and more pronounced increase in PC counts after the administration of the first dose of the vaccine was detected in previously infected non-MBL HD, which was mostly due to increased IgG⁺ PC, and paralleled also by a rise in SARS-CoV-2-specific antibody levels. Compared to non-MBL HD, MBL^{lo} showed similar immune cell kinetics, except for lower total B-cells found after the first dose of the vaccine, and higher PC counts after both the first and second doses of the vaccine. Additionally, a trend towards a delayed but more pronounced SARS-CoV-2-specific antibody response was observed in MBL^{lo} SARS-CoV-2 naive subjects after the second dose of the vaccine.

Conclusions: SARS-CoV-2 vaccination induces an earlier and more pronounced PC and SARS-CoV-2-specific antibody response in previously infected vs. SARS-CoV-2 naive non-MBL HD. Compared to non-MBL HD, MBL^{lo} subjects show more clearly altered B-cell and PC counts after SARS-CoV-2 vaccination, together

with a delayed specific SARS-CoV-2-specific antibody response, in line with the previously reported altered antibody response during active COVID-19 in MBL^{lo} subjects.

1 Introduction

COVID-19 emerged in December 2019 as a new infectious disease in humans, which rapidly spread into a worldwide pandemic.(1,2) Already from the first reports, COVID-19 patients were found to show a heterogenous clinical course, ranging from asymptomatic to severe disease, and ultimately, death.(2,3) Since then, many reports have highlighted that COVID-19 severity directly correlates with poor innate and adaptive immune responses, in the context of a stronger inflammatory response, pointing out an adequate immune response against SARS-CoV-2 is critical for an efficient control and the complete clearance of the virus.(4–6) Thus, understanding the immune response to SARS-CoV-2 acquired a major relevance during the pandemic, not only for the management of COVID-19, but also for the design of new vaccination strategies. In a globally unprecedented effort, several highly-effective vaccines against SARS-CoV-2 were rapidly developed, which prevented severe COVID-19 and reduced the SARS-CoV-2 infection-related hospitalizations and deaths.(7–9)

Humoral responses to SARS-CoV-2, both during infection and after vaccination, are strongly dependent on immunoglobulin (Ig) G (mostly at the expense of IgG1, and to a lesser extent also, the IgG3 antibody subclasses) and IgA vs. IgM-specific antibody isotypes.(10–12) After the (progressive) waning of antibody levels following natural infection or vaccination, long-lived memory B-cells (MBC) and T-cells become the central immune components for long-term protection from future (particularly severe) SARS-CoV-2 infection.(12–14) Despite this, most studies aiming at monitoring the immune system protection acquired after vaccination have mostly focused on the plasma levels of the SARS-CoV-2-specific antibodies generated. In contrast, the early changes that occur in the immune cell compartments in response to SARS-CoV-2 vaccination of otherwise healthy subjects still remain to be investigated in detail. In addition, most studies focused on SARS-CoV-2 vaccination that had been carried across the general population did not take into account several factors that have been associated with a dysfunctional immune response during COVID-19 and that might also compromise an effective vaccination in these individuals. These include among others, the presence of small (<500 clonal B-cells/ μ L) circulating clones of neoplastic B-cells in blood resembling chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells, a condition known as low-count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{lo}). (15,16)

Recent studies from our and other groups have shown that, in the general population, MBL^{lo} is associated with a secondary humoral (antibody) and B-cell immunodeficiency,(17–20) that make these subjects more prone to develop more severe infections and secondary tumors, particularly lymphoid neoplasms.(21–23) In the context of SARS-CoV-2 infection, MBL^{lo} has also emerged recently as a novel risk factor for developing more severe COVID-19,(24,25) due to a delayed but more pronounced rise, in the absolute counts of blood circulating plasma cell (PC), compared to non-MBL COVID-19 patients.(26) Although recent studies have reported a defective humoral response to vaccination against SARS-CoV-2 in high-count MBL (MBL^{hi}) and CLL patients,(27,28) no data has been reported so far regarding the response to vaccination in individuals with MBL^{lo}.

Here, we analyzed the kinetics of circulating immune-cell populations, in parallel to the levels of anti-spike SARS-CoV-2-specific antibodies in blood of healthy donors without MBL (classified according to the existence or not of previous exposure to SARS-CoV-2) early after COVID-19 vaccination, and compared their response to that found in MBL^{lo} vaccinated subjects.

2 Materials and methods

Study group. A total of 75 adult volunteers (33 men and 42 women; median age of 46 years [IQR: 36 – 56 years]) who received COVID-19 vaccines between February and April 2021, were included in this study. Subjects were vaccinated with mRNA-based vaccines (BNT162b2, Pfizer-BioNTech or mRNA-1273, Moderna) or adenoviral vector-based vaccine (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca), according to the Spanish government vaccination program. Those subjects with an incomplete vaccination schedule (i.e., receiving only one dose of either Pfizer or Moderna vaccines without previous COVID-19 infection) (n=2), individuals presenting active neoplastic disease or a hematologic malignancy (n=1), those with confirmed or suspected acute COVID-19 infection during the period of the study (n=1), or that were under immunomodulatory/immunosuppressive treatment (n=5), were excluded from the study, which resulted in a final cohort of 66 participants. All 66 subjects were screened immediately prior to receiving the first dose of the vaccine for the presence of MBL^{lo}, using high-sensitive next-generation flow cytometry (NGF), and subdivided into two groups: i) MBL^{lo} subjects (16/66 [24%], 7 men and 9 women; median age of 53 years [IQR: 45 – 65 years]); and ii) non-MBL HD (50/66 [76%], 21 men and 29 women; median age of 43 years [IQR: 34 – 51 years]). Both groups were further subclassified according to their history of previous exposure to SARS-CoV-2 (Supplementary Table 1). A total

of 656 pre-pandemic non-MBL HD (301 men and 355 women; median age of 58 years [IQR: 47 –71 years]) from the same geographical area, who had been recruited and evaluated for the presence of MBL before the SARS-CoV-2 pandemic, were also included in the study to define the normal ranges for the absolute number of cells for each cell population analyzed.

Each participant gave his/her consent to participate in the study, according to the Declaration of Helsinki and the Spanish law for Biomedical Research. The study and both the subjects data and blood samples collected were approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca / IBSAL (approval codes: CEIC PI4705/2017 and PI 2020 03 468).

Immunophenotypic studies. A total of 295 peripheral blood (PB) samples (71 samples from MBL^{lo} and 224 from non-MBL vaccinated subjects) were collected from the 66 individuals, before the administration of the first dose of the vaccine, and subsequently before the administration of the second dose of the vaccine and at day +30 after the later had been administered. A subgroup of 18/66 (27%) individuals (4 MBL^{lo} and 14 non-MBL) were enrolled in a closer follow up, where PB samples (36 and 118 samples from the MBL^{lo} and the non-MBL subjects, respectively) were additionally collected at days +4, +7 and +10 after each of the two vaccine doses. All PB samples were stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) and the Immunemonitoring (IMM) B1gH tube, using the EuroFlow bulk-lyse-stain-and-then-fix standard operating procedure(24,29,30) (Supplementary Methods and Supplementary Table 2), available at www.EuroFlow.org. For each antibody combination, ≥ 107 cells/tube were measured per sample. Automated data analysis was performed using the INFINICYT software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) and the LST and IMM-B1gH data bases(31,32) (Supplementary Methods).

Measurement of anti-SARS-CoV-2 IgG and IgA antibody plasma levels. (Semi)quantitative determination of IgG and IgA plasma levels against the spike (S) protein of SARS-CoV-2 was performed in 294 samples, using commercially available ELISA kits (ImmunoStep S.L., Salamanca, Spain) as per the manufacturer's recommendations.

Statistical methods. Data was normalized with respect to the values at the pre-vaccination time-point, by calculating at every follow-up time-point the ratio between the absolute cell count/ μ L of each cell population

and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. To consider 0 as no change vs. the pre-vaccination time-point, the following formulas were used:

$$\text{If } x \geq 1; f(x) = x - 1$$

$$\text{If } x < 1; f(x) = \left(-\frac{1}{x}\right) + 1$$

For the comparison between groups for continuous variables, the Mann–Whitney U or the Kruskal–Wallis non-parametric tests for 2 or >2 independent groups of samples were used, respectively. Corrected (Benjamini–Hochberg procedure) *p* values of ≤ 0.05 for multiple comparisons with a false discovery rate (FDR) of <10% were used to define statistically significant differences across the different time points. For categorical variables, the Chi-square test and Fisher’s exact test were used; *p* values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance. Statistical analyses and figures were carried out and designed using the IBM-SPSS Statistical software v28.0 (IBM, Armonk, NY) and GraphPad Prism V8 software (GraphPad Software, San Diego, CA), respectively.

3 Results

3.1 Kinetics of the major populations of blood leukocytes from non-MBL HD following vaccination.

After the administration of the first dose of the vaccine, a decrease in the absolute white blood cell (WBC) count (vs. pre-vaccination levels) was observed at day +4 following the first dose among non-MBL HD, with a 0.15-fold decrease ($p=0.008$) for SARS-CoV-2 naive and a 0.13-fold decrease ($p=0.002$) for previously infected subjects, respectively (Figure 1). Among previously infected non-MBL HD, such WBC decrease at day +4 post-vaccination was due to the reduction of the total neutrophil (0.27-fold decrease, $p=0.008$), and lymphocyte counts (0.45-fold decrease, $p=0.007$), particularly at the expense of lower NK-cell (0.93-fold decrease, $p=0.006$) (Figure 1) and TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $^+$ T-cell counts (0.58-fold decrease, $p=0.02$), and to a lesser extent also B-cell counts ($p=0.11$) (Figure 2A). In contrast, at day +4 post-vaccination, SARS-CoV-2 naive subjects only showed a significant decrease (vs. pre-vaccination) of TCR $\gamma\delta$ T-cell counts (0.29-fold decrease, $p=0.01$) (Figure 2A). Though no overall differences in the WBC count were observed in any of the two groups at days +7 and +10 after the first injection of the vaccine, non-MBL HD who had previously undergone COVID-19 showed a transient reduction in monocyte counts (0.68-fold vs. 0.14-fold decrease at day +4, $p=0.008$), paralleled by an increase in total B cells at day +7 (0.85-fold decrease at day +4 vs. 0.14-fold increase at day +7, $p=0.02$), in the absence of significant changes (vs. pre-vaccination levels) in the different B-cell subsets

analyzed (Figure 2B). Despite the kinetics for the major WBC subsets observed after the first dose of vaccine showed similar profiles in both SARS-CoV-2 naive and previously infected non-MBL HD, slight but significant differences were found between them. Thus, previously infected non-MBL HD showed markedly lower monocyte counts at day +7 (0.68-fold decrease vs. 0.16-fold decrease in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD, $p=0.05$) (Figure 1), and total T-cell counts at day +10 (0.12-fold decrease vs. 0.09-fold increase in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD, $p=0.05$) (Figure 1).

In turn, more marked differences were observed between both groups of non-MBL HD in the PC kinetics in blood, after the administration of the first dose of the vaccine. Thus, total PC counts transiently decreased slightly in blood of SARS-CoV-2 naive non-MBL HD at day +4, to progressively increase afterwards with a peak at day +10 (0.38-fold decrease at day +4; 0.11-fold increase at day +7; and 0.59-fold increase at day +10, $p<0.02$), decreasing (again) thereafter (Figure 3A). These kinetics were mainly due to changes in IgG⁺ PC (Figure 3A) at the expense of both IgG1⁺ and IgG3⁺ PC (Supplementary Figure 3), while IgM⁺ and IgA⁺ PC counts remained stable over time (Figure 3). In turn, in previously infected non-MBL HD, IgG PC counts peaked at day +7, returning to pre-vaccination levels already at day +10 (0.93-fold increase at day +4 vs. 11-fold increase at day +7 vs. 0.65-fold increase at day +10, $p=0.01$) (Figure 3A); similarly to SARS-CoV-2 naive non-MBL HD, also in previously infected non-MBL HD, IgG1⁺ PCs were the main contributor to these changes (Supplementary Figure 3). As a consequence of the delay in reaching the PC peak in SARS-CoV-2 naive vs. previously infected subjects, a (low) tendency towards higher total PC ($p=0.17$) and IgG⁺ PC ($p=0.18$) counts were found at day +7 for the latter group, whereas higher total PC ($p=0.03$) and IgG⁺ PC ($p=0.03$) counts, at the expense of both the IgG1⁺ ($p=0.03$) and IgG3⁺ ($p=0.05$) PC counts (Supplementary Figure 3), were observed in blood of SARS-CoV-2 naive non-MBL HD at day +10 (Figure 3A). Regarding the maturation stage of blood circulating PCs, a significant decline in both the more immature CD138⁻ PC and the mature CD138⁺ PC was observed at day +10 after their peak in blood of previously infected non-MBL HD. Of note, the number of CD138⁻ PC was significantly higher among SARS-CoV-2 naive vs. previously infected subjects (1.08-fold vs. 0.75-fold increase, $p=0.04$) (Figure 3A), whilst mature CD138⁺ PC were increased at day +7 after the first dose among previously infected vs. SARS-CoV-2 naive non-MBL HD (57-fold vs. 6.62-fold increase, respectively; $p=0.04$) (Figure 3A).

Following the second dose of the vaccine, similar immune profiles to those described above for the first dose were observed. Thus, decreased WBC counts were found also at day +4 after the second dose,

mostly due now to a decrease in the lymphocyte counts (particularly in the T-cell and B-cell numbers) in blood of both SARS-CoV-2 naive and previously infected non-MBL HD (Figure 1). Regarding the myeloid cell populations, we only observed a slight rise in the number of neutrophils, 7 days after the second dose of the vaccine among subjects who had undergone previously COVID-19 (Figure 1). Of note, lower dendritic cell (DC) counts were found before the second dose of the vaccine in SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD (0.34-fold decrease vs. 0.28-fold increase, $p=0.03$) (Figure 1).

More detailed analysis of the T-cell compartment following the second dose of the vaccine, revealed a similar decrease of all major T-cell populations in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD (Figure 2A), while $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ T-cells was the only T-cell population that showed significantly decreased counts (0.42-fold decrease at day +4 vs. 0.04-fold increase at day 0, $p=0.001$) in previously infected non-MBL HD (Figure 2A). In addition, an overall tendency towards lower $\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-cell counts was found in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD at day +30 after the second dose of the vaccine, which was due to lower $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ T-cell numbers in blood (0.08-fold increase vs. 0.02-fold decrease, $p=0.03$) (Figure 2A). When dissecting the B-cell compartment, few differences were observed in the kinetics of the major B-cell compartments throughout the whole follow-up period after the second dose of the vaccine, for any of the two groups of non-MBL subjects (Figure 2B and Supplementary Figures 1 and 2). Despite this, pre-germinal center (GC) B-cell counts were significantly decreased in blood of SARS-CoV-2 naive non-MBL HD, particularly at day +4 (and to a lesser extent, also at day +7) after the second dose, which was followed by a rapid increase at day +7 (0.02-fold increase at day 0 vs. 0.63-fold decrease at day +4 vs. 0.12-fold decrease at day +7, $p<0.005$) (Figure 2B). In previously infected non-MBL HD, CD27^+ MBC was the only population transiently decreased at day +4 following the second dose of the vaccine (1.18-fold decrease at day +4 vs. 0.10-fold increase at day 0, $p=0.006$). Upon comparing both groups of non-MBL HD, significantly higher CD21^+ MBC counts were found at day +30 after the second dose in blood of previously infected non-MBL HD (0.40-fold increase vs. 0.60-fold decrease in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD, $p=0.05$) (Figure 2B). An in-depth analysis of MBC according to the isotype and subclass of Ig expressed showed that the waning of MBC counts mostly corresponded to a decreased number of IgMD^+ , IgG2^+ and IgA2^+ MBC (Supplementary Figure 2).

In contrast to the PC kinetics observed after the first dose of the vaccine in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD when PC counts reached their peak at day +10, after the second dose these subjects showed transiently increased PC counts with an earlier peak at day +7 (0.40-fold increase at day +7 vs. 0.13-fold

decrease at day +10, $p=0.03$), which rapidly returned to normal PC levels at day +10. This increase was mostly due to IgG⁺ PC, particularly to IgG1⁺ PC (Figure 3 and Supplementary Figure 3). In contrast, previously infected non-MBL HD who had reached the PC peak in blood at day +7 after the first dose of the vaccine, did not show significant changes in the PC compartment, except for a slightly increase in IgG2⁺ PC at day +7 following the second dose of the vaccine (Supplementary Figure 3). These different PC kinetic profiles were associated with overall higher CD138⁺, IgM⁺ and IgG⁺ PC counts (including all IgG subclasses) in blood of SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD at the later time-points investigated (i.e., days +10 and +30 after the second dose) (Figure 3A and Supplementary Figure 3).

Despite all changes described above in the kinetics of immune cells in blood of non-MBL HD following vaccination, the absolute cell counts of the different cell populations remained within the normal (age-matched) ranges throughout the whole follow-up period, except for PC, whose median levels were elevated above the 90th percentile at day +7 (following the first dose of the vaccine) in blood of non-MBL HD who previously had undergone COVID-19 (Supplementary Figures 4-9).

3.2 Anti-SARS-CoV-2 antibody kinetics in plasma of non-MBL HD after vaccination.

As regards the humoral response, SARS-CoV-2 naive non-MBL HD began to seroconvert at day +7 after the first dose of vaccination (Figure 3B). Thereafter, both anti-S IgG and IgA antibody levels increased at day +10 after the first dose, with a particularly significant rise for IgA (median [IQR]: 976 [187 – 11,250] AU/mL at day +10 vs. 0 [0 – 0] AU/mL at day +7, $p=0.03$) (Figure 3B). Following the administration of the second dose of the vaccine, a similar profile was observed for both antibody isotypes with a peak at day +7, particularly also for the anti-S IgA levels (16,297 [1,927 – 94,617] AU/mL at day +7 vs. 645 [0 – 1,059] AU/mL at day +4, $p=0.01$) (Figure 3B). In those non-MBL HD who had previously undergone COVID-19, anti-S IgG and/or IgA antibodies were already detected at baseline in 68% and 80% of cases, respectively (Figure 3B). Following the first dose of the vaccine, the titers of both isotypes rapidly increased at day +7 (23,532 [0 – 100,905] AU/mL at day +7 vs. 0 [0 – 136] AU/mL at day +4 for IgG, $p=0.01$; and (136,736 [0 – 304,759] AU/mL at day +7 vs. 0 [0 – 1,572] AU/mL at day +4 for IgA, $p=0.004$), all subjects showing a complete seroconversion at day +10 after the first dose of the vaccine (Figure 3B). The different kinetic profiles observed in SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD resulted in consistently higher anti-S IgG and IgA antibody titers among individuals from the latter group.

3.3 Kinetics of the major populations of blood leukocytes and anti-SARS-CoV-2 plasma antibodies after vaccination in MBL^{lo} vs. non-MBL HD.

At baseline, no significant differences were observed in the distribution of the different subsets of blood leukocytes analyzed between MBL^{lo} and non-MBL HD (data not shown). In contrast, immediately prior to the administration of the second dose of the vaccine, significant differences were found in the distribution of immune cells (vs. pre-vaccination levels) between MBL^{lo} and non-MBL HD. These consisted of lower TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺ T-cell (0.05-fold decrease vs. 0.06-fold increase, $p=0.03$) and B-cell (0.03-fold decrease vs. 0.11-fold increase, $p=0.04$) counts, together with higher total PC (0.13-fold increase vs. 0.05-fold decrease, $p=0.006$) counts in MBL^{lo} vs non-MBL HD, respectively (Figure 4A). Further differences were also observed at day +30 following the second dose of the vaccine, including higher monocyte (0.10-fold decrease vs. 0.37-fold decrease, $p=0.05$), TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻ T-cell (0.06-fold increase vs. 0.49-fold decrease, $p=0.001$), and PC (0.24-fold decrease vs. 0.96-fold decrease, $p=0.01$) counts in MBL^{lo} vs. non-MBL HD. These differences between MBL^{lo} and non-MBL HD subjects were due to more prominent differences observed among SARS-CoV-2 naive individuals, except for the TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻ T-cell counts, which showed higher levels in both SARS-CoV-2 naive and previously infected subjects (Figure 5A). In addition, significantly higher neutrophil counts (0.06-fold increase vs. 0.12-fold decrease, $p=0.02$), together with lower eosinophil counts (0.85-fold decrease vs. 0.17-fold increase, $p=0.02$) were observed in blood of previously infected MBL^{lo} subjects prior to the second dose of the vaccine, whereas higher TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺ T-cell counts were detected in blood of SARS-CoV-2 naive MBL^{lo} subjects at day +30 after vaccination (0.12-fold increase vs. 0.08-fold decrease, $p=0.01$) (Figure 5A).

Vaccination against SARS-CoV-2 induced a similar humoral response profile in both MBL^{lo} and non-MBL HD (Figure 4B). However, when we restricted the analysis to SARS-CoV-2 naive subjects, slightly superior anti-S IgG levels were observed after the second vaccination among MBL^{lo} vs. non-MBL HD, whereas for those individuals with previous COVID-19, significant higher anti-S IgG levels were detected at day +4 after the first dose of the vaccine in MBL^{lo} vs. non-MBL HD (281 [259 – 304] AU/mL vs. 136 [0 – 183] AU/mL; $p=0.03$) (Figure 5B). Interestingly, among SARS-CoV-2 naive MBL^{lo} subjects, all antibody levels peaked at day +10 after the second dose of the vaccine, whereas in non-MBL HD they reached their highest levels at day +7 following the second vaccination (Figure 5B).

4 Discussion

The introduction of vaccines against SARS-CoV-2 has significantly reduced the number of severe disease cases and deaths related to COVID-19.(7–9) So far, to evaluate the effectiveness of SARS-CoV-2 vaccines, most studies have focused on the humoral response to vaccination, through the measurement of the viral-specific antibody responses. Much less frequently, the generation of T- and B-cell memory elicited by the vaccine (capable to mount recall responses to viral re-encounter) has been reported in the literature.(10–14) However, few studies have described (integrated data) on the early kinetics in the different populations of blood leukocytes in parallel to the humoral changes in response to SARS-CoV-2 vaccination.(33,34) Here we investigated the kinetics of the immune cell and anti-spike SARS-CoV-2-specific antibodies in blood of HD (with no evidence of immunodeficiency or under immunomodulatory treatment) in response to their first SARS-CoV-2 vaccination, and compared these kinetics with those observed in a group of individuals carrying small clones of CLL-like B-cells in blood (MBL^{lo}), which is known to be associated with an impaired humoral response and higher rates of severe infection.(17–20,23)

Overall, our data show a decrease of WBC counts at day +4 following the administration of the first dose of the vaccine to non-MBL HD, due to decreased neutrophil and lymphocyte counts (mostly due to lower NK cell numbers at this early stage), followed by a decrease in monocytes at day +7, among previously infected non-MBL HD. Similar immune kinetic profiles were observed following the administration of the second dose of the vaccine, including a marked decrease in the blood lymphocyte count at day +4, but now in both SARS-CoV-2 naive and previously infected non MBL-HD. This transient early decrease of innate cell counts (i.e., neutrophils, monocytes and NK-cells,) in blood, particularly after the first dose of the vaccine might reflect the recruitment of early responders to the site of administration of the vaccine, where priming a local inflammatory response is taking place.(35) However, the relatively limited innate response observed can be explained by the current formulation of mRNA-based vaccines, which contain modified nucleotides to reduce the recognition by immune sensors, such as Toll-like receptors, and thereby restrict the development of an exacerbated inflammatory response as described in the first waves of COVID-19.(36,37) In addition, we also found decreased counts of both T- and B-cells, particularly at day +4 after the administration of the second dose of the vaccine.(34,38) This might reflect the increased recruitment of these cell populations after the booster vaccination towards the secondary lymphoid tissues, via CD197 (CCR7)-mediated CCL19 and

CCL21 signaling,(39) for triggering antigen-dependent B-cell activation and maturation in the GC, for the generating of SARS-CoV-2-specific antibody secreting PC and MBC.(40)

As expected, in HD two different profiles of B-cell response to vaccination were observed according to the previous exposure to SARS-CoV-2 status of each individual. Thus, the significant decrease in blood of pre-GC B lymphocytes observed in SARS-CoV-2 naive non-MBL HD (presumably due to migration to lymph nodes) might reflect a B-cell response dominated by pre-GC B-cells, consistent with the lack of SARS-CoV-2 specific MBC in these individuals.(12) Interestingly, in this group of SARS-CoV-2 naive HD, a decrease in TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺ T-cells (that collaborate with B-cells in the GC sites) was observed, in parallel to the pre-GC B-cell decrease. In turn, previously infected non-MBL HD showed significantly decrease counts of CD27⁺ MBC in blood, suggesting a rapid immune reactivation and recruitment of MBC to secondary lymphoid tissues following vaccination in those individuals who had previously undergone COVID-19. Of note, an increase in CD21⁻ MBC counts were observed from day +7 after the administration of the second dose of the vaccine both among SARS-CoV-2 naive and previously infected HD, with a peak at day +10, subsequently followed by a decrease toward levels similar to those detected before vaccination. Previous reports in COVID-19 patients have described an expansion of CD21⁻CD27⁻ MBC.(41,42) This phenotype has been associated with an anergic state of B-cells(43) and after SARS-CoV-2 vaccination of individuals that had previously undergone COVID-19, in whom this might reflect triggering a subsequent re-expansion of previously generated MBC, although the biological significance of this finding remains unknown.

Previous reports have (extensively) described a moderate PC response in SARS-CoV-2 naive individuals at day +10 after the administration of the first dose of the vaccine, followed by an earlier (i.e., day +7) and more intense PC peak after the second dose.(33) In contrast, in previously infected individuals, PC were found to peak at day +7 following the first dose of the vaccine, without a clear PC peak (i.e., response) in blood after the second dose.(34) Our data confirm and extend on these findings, by showing important differences in the PC maturation stages in blood of non-MBL HD, consisting of an increase of the more mature CD138⁺ PC in both groups of non-MBL HD investigated, particularly among the previously infected non-MBL HD. As previously reported, we also show now that the increased PC counts in blood are due to IgG⁺ PC (mostly IgG1⁺ and, to a lesser extent also, IgG3⁺) while IgM⁺ and IgA⁺ PC remained stable throughout the study.(44) In contrast to the IgG⁺ PC-restricted response found in our study, IgM⁺ and IgA⁺ (in addition to IgG⁺) PC responses have been previously described in COVID-19.(1) This bias towards a more prominent IgG⁺ PC

response found in SARS-CoV-2 vaccination vs. COVID-19, might be due to the intramuscular administration of the vaccine vs. the mucosal entry of the SARS-CoV-2 virus during infection. In line with this hypothesis, low titers of SARS-CoV-2-specific IgA antibodies have been found in saliva after vaccination,(46) suggesting that these kind of vaccines do not elicit an effective immune response at least at the oral (and probably nasal) mucosa. Furthermore, we found significantly lower levels of most PC subsets in blood of previously infected non-MBL HD at day +30 after the second dose of the vaccine, which might mirror faster homing of PC from blood to bone marrow once the infection has been resolved.

In addition to the immune cell kinetics, we also analyzed the plasma levels of anti-spike SARS-CoV-2-specific IgG and IgA antibodies. Our data show that specific SARS-CoV-2 antibodies had similar kinetics than those described above for PC. Thus, both anti-spike IgG and IgA antibody plasma levels rapidly increased at day +7 after the first dose of the vaccine in previously infected non-MBL HD, when maximum antibody titers were reached. In turn, antibody levels became detectable in most SARS-CoV-2 naive subjects at day +10 after the first dose of the vaccine, and thereafter they progressively increased with the highest levels being reached at day +7 after the second dose. In line with previous reports,(12,33) we also found that anti-spike IgG plasma levels persisted during at least 30 days after the second dose of the vaccine, while IgA plasma levels already started to decline at day +10. The apparent discrepancy between the rise of anti-spike SARS-CoV-2-specific IgA antibody levels in plasma and IgA⁺ PC counts in blood, in the absence of changes in IgA⁺ PC counts in blood following vaccination might indicate that a low number of antigen-specific IgA⁺ PC are enough to produce a significant increase in IgA antibody plasma levels, or that the newly generated IgA⁺ PC are preferentially in the bone marrow and/or mucosa, without a detectable peak in blood.

MBL^{lo} has been recently identified as a novel biomarker for more severe COVID-19 among otherwise HD,(24) potentially due to a delayed and more pronounced PC response, together with significantly higher SARS-CoV-2-specific antibody titers in comparison with non-MBL COVID-19 patients.(26) In addition, other defects in the immune system of non-infected MBL^{lo} subjects have been described, which relate to a defective B-cell compartment and humoral response, associated in these subjects with an increased risk for more severe infections.(17–19,21,23) Fully in line with these results, here we found lower total B-cell counts, immediately before the administration of the second dose of the vaccine (as previously described for convalescent COVID-19 patients with MBL^{lo}) (24) associated with higher PC counts in blood than those observed among non-MBL HD, suggesting also a delayed PC response to vaccination in MBL^{lo} subjects.(26)

Of note, these differences were mostly noticeable among SARS-CoV-2 naïve MBL^{lo} subjects, suggesting that individuals with pre-existent memory against SARS-CoV-2 would display a humoral immune response similar to that observed in non-MBL HD. Recent data on MBL^{hi} and CLL patients revealed an impaired antibody response to SARS-CoV-2 vaccination in both groups of patients, associated with the production of lower antibody titers compared to HD (particularly in CLL), leading to the need of additional doses of the vaccine to reach protective antibody levels.(27,28) In contrast, our data on MBL^{lo} subjects show similar anti-spike-specific antibody levels than those reached in non-MBL HD, though our approach does not provide information on the quality of the humoral response against the SARS-CoV-2 vaccine in MBL^{lo} vs non-MBL individuals (i.e., the neutralizing activity of these antibodies). Despite this, it is worth mentioning that the specific antibody kinetics in MBL^{lo} SARS-CoV-2 naïve subjects revealed a delay in attaining the highest levels of both anti-spike IgG and IgA antibodies until day +10 (vs. day +7 in non-MBL HD) after the second dose of the vaccine, while for SARS-CoV-2 naïve non-MBL HD the peak was observed at day +7, like in non-MBL HD. Of note, such delayed antibody response was also observed for the IgA antibodies in MBL^{lo} subjects who had been previously infected by SARS-CoV-2, following the first dose of the vaccine. Altogether, our data support previous observations in MBL^{lo} subjects during COVID-19.(26)

To the best of our knowledge, this is the first study in which the early changes in major and minor subsets of WBC in response to SARS-CoV-2 vaccination has been investigated at multiple time-points during the first month of administration of the first two doses of the vaccine in parallel to spike-specific IgG and IgA antibody plasma levels, providing a comprehensive overview of the immune cellular and humoral response to SARS-CoV-2 vaccination. The strict inclusion criteria applied to select our cohort, reduce the chance for a bias on our results on the immune kinetics in blood due to the effect of any underlying condition, including MBL^{lo}. However, our study has some limitations, related to the relatively small sample size, particularly of MBL^{lo} subjects, which did not allow us to perform a closer longitudinal analysis of the immune cell kinetics in this group of individuals. In addition, our cohort consists of subjects who were under three different vaccination programs, which might contribute to a greater heterogeneity of the results. Finally, our study does not provide any data on antigen-specific B- or T-cell responses, neither on the neutralizing activity of the anti-spike antibodies detected, which could have brought more insight into the quality of the specific immune responses to SARS-CoV-2 vaccination attained.

In summary, here we found different immune cell kinetic profiles following vaccination in SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD, which consisted of earlier PC and specific antibody specific responses in those non-MBL HD who had undergone COVID-19. The analysis of the immune response to SARS-CoV-2 vaccination in MBL^{lo} subjects revealed an altered immune cell distribution, which mainly affected to B-cells and PC, leading to a delayed humoral response to SARS-CoV-2 vaccination in these subjects.

5 Nomenclature

AU: arbitrary units

CLL: chronic lymphocytic leukemia

DC: dendritic cell

GC: germinal center

HD: healthy donor

Ig: immunoglobulin

IMM: immunemonitoring

IQR: interquartile range

LST: lymphocyte screening tube

MBC: memory B-cell

MBL: monoclonal B-cell lymphocytosis

MBL^{hi}: high-count monoclonal B-cell lymphocytosis

MBL^{lo}: low-count monoclonal B-cell lymphocytosis

PB: peripheral blood

PC: plasma cell

TCR: T-cell receptor

WBC: white blood cell

6 Conflict of Interest

A. Orfao, J. Almeida and J.J.M. van Dongen report being one of the inventors on the EuroFlow-owned European patent 119646NL00 registered on November 2019 (“Means and methods for multiparameter flow cytometry-based leukocyte subsetting”) and they are also authors of the PCT patent WO 2010/ 140885A1 (“Methods, reagents and kits for flow cytometric immunophenotyping”). The Infinicyt software is based on intellectual property of the University of Salamanca (Salamanca, Spain). All above mentioned intellectual property and related patents are licensed to Becton/Dickinson Biosciences (San José, California), which pays royalties to the University of Salamanca and the EuroFlow Consortium. These royalties are exclusively used for continuation of the EuroFlow collaboration and sustainability of the EuroFlow Consortium. The other authors declare no competing financial interests or any other conflict of interest.

7 Author Contributions

MM, JA, and AO contributed to the conceptualization, design, and supervision of the study, as well as to recruitment of funding. JA, JMMVD, and AO contributed to the design and development of antibody panels. GO-A, BF-H, JIS-G, MLG, and MB-R performed the experiments. GO-A, IC, BF-H, JIS-G, MLG, MB-R, QL, JA, and AO analyzed and interpreted data. CC, AL-B, and MM selected the volunteers for the study and collected the samples and their relevant clinical information. GO-A, IC, BF-H, CC, JA, MM, and AO coordinated the planning and execution of the experiments. GO-A, IC, JA, and AO had full access to and verified the underlying data. GO-A, IC, JA and AO wrote the paper. All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version of the document.

8 Funding

This work was supported by “Early Cancer Research Initiative Network on MBL (ECRINM3)” ACCELERATOR award (CRUK -UK-, Fundación AECC -Spain- and Associazione Italiana per la Ricerca Sul Cancro _Italy-), by the CB16/12/00400 (CIBERONC), COV20/00386, PI17/00399 and PI22/00674, grants from the *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación*, (Madrid, Spain) co-funded by *FONDOS FEDER*, and by the SA109P20 (*Consejería de Educación*) and GRS-COVID-33/A/20 (*Gerencia Regional de Salud, Consejería de Sanidad*) grants from *Junta de Castilla y León* (Valladolid, Spain), by 0639-IDIAL-NET-3-

3 grant (INTERREG POCTEP Spain-Portugal) from *Fondo Europeo de Desarrollo Regional*. G. Oliva-Ariza is supported by a grant (PR-2019 487971) from the *Consejería de Educación, Junta de Castilla y León* (Valladolid, Spain), I. Criado is supported by the *Juan de la Cierva -Incorporación-* (JC2020-044160-I) grant from *Ministerio de Ciencia e Innovación* (Madrid, Spain), B. Fuentes-Herrero is supported by the 0639-IDIAL-NET-3-3, and ECRIN-M3 grants, ML Gutiérrez is supported by a grant (SA109P20) from the *Consejería de Educación, Junta de Castilla y León*.

9 Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge all other members of the ECRIN-M3 Consortium not included in the author-list (Co-PI: James Batchelor, Francesco Forconi, Paolo Ghia, Marcos González, Andrew Rawstron, Freda Stevenson, Jonathan Strefford, Miguel Vicente).

The authors would like to thank the *Spanish National DNA Bank (Banco Nacional de ADN Carlos III, University of Salamanca, PT20/00085, integrated in the Biobanks and Biomodels Platform of the Instituto de Salud Carlos III)* for their support in sample and data collection, and particularly to Óscar González-López and Delia Sánchez García for their work on processing and the samples.

10 Data Availability Statement

De-identified data collected during the study on individual patients will be available via the Spanish National DNA Bank Carlos III, immediately after publication, for those researchers who provide a proposal that is approved by the external scientific committee and ethics committee of the Spanish National DNA Bank.

11 References

1. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565–74. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
2. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(11):1061–9. doi: 10.1001/jama.2020.1585

3. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(13):1239–42. doi: 10.1001/jama.2020.2648
4. Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, Terreri S, Corrente F, Capponi C, et al. Different Innate and Adaptive Immune Responses to SARS-CoV-2 Infection of Asymptomatic, Mild, and Severe Cases. *Front Immunol.* 2020;11(December):1–16. doi: 10.3389/fimmu.2020.610300
5. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861–80. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
6. Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(1):89–100. doi: 10.1016/j.jaci.2020.05.003
7. 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
8. 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
9. Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner H, Yoon SK, Meece J, et al. Prevention and Attenuation of Covid-19 with the BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines. *N Engl J Med.* 2021;385(4):320–9. doi: 10.1056/nejmoa2107058
10. Farkash I, Feferman T, Cohen-Saban N, Avraham Y, Morgenstern D, Mayuni G, et al. Anti-SARS-CoV-2 antibodies elicited by COVID-19 mRNA vaccine exhibit a unique glycosylation pattern. *Cell Rep.* 2021;37(11):110114. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110114
11. Tejedor Vaquero S, de Campos-Mata L, Ramada JM, Díaz P, Navarro-Barriuso J, Ribas-Llaurado C, et al. The mRNA-1273 Vaccine Induces Cross-Variant Antibody Responses to SARS-CoV-2 With Distinct Profiles in Individuals With or Without Pre-Existing Immunity. *Front Immunol.* 2021;12(September):1–9. doi: 10.3389/fimmu.2021.737083
12. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARSCoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol.* 2021;6(58):1–19. doi: 10.1126/sciimmunol.abi6950
13. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature.* 2021;592(7855):616–22. doi: 10.1038/s41586-021-03324-6
14. Kim W, Zhou JQ, Horvath SC, Schmitz AJ, Sturtz AJ, Lei T, et al. Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature.* 2022;604(7904):141–5. doi: 10.1038/s41586-022-04527-1

15. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. Vol. 130, *British Journal of Haematology*. 2005. p. 325–32. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x
16. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Vol. 36, *Leukemia*. Springer Nature; 2022. p. 1720–48. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2
17. Criado I, Blanco E, Rodríguez-Caballero A, Alcoceba M, Contreras T, Gutiérrez ML, et al. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2018 Dec 1;32(12):2701–5. doi: 10.1038/s41375-018-0164-3
18. Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Teodosio C, Lecomte Q, et al. Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset Ranges in the General Population Defined with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL Subjects. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 22;15(1):58. doi: 10.3390/cancers15010058
19. Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Rodríguez-Caballero A, Romero A, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol*. 2012 Jul;87(7):721–4. doi: 10.1002/ajh.23214
20. Whitaker JA, Parikh SA, Shanafelt TD, Kay NE, Kennedy RB, Grill DE, et al. The humoral immune response to high-dose influenza vaccine in persons with monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Vaccine*. 2021;39(7):1122–30. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.001
21. Criado I, Rodríguez-Caballero A, Gutiérrez ML, Pedreira CE, Alcoceba M, Nieto W, et al. Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after seven years of follow up and is associated with a poorer outcome. *Haematologica*. 2018 Jul 3;103(7):1198–208. doi: 10.3324/haematol.2017.183954
22. Slager SL, Parikh SA, Achenbach SJ, Norman AD, Rabe KG, Boddicker NJ, et al. Progression and survival of MBL: a screening study of 10 139 individuals. *Blood*. 2022;140(15):1702–9. doi: 10.1182/blood.2022016279
23. Shanafelt TD, Kay NE, Parikh SA, Achenbach SJ, Lesnick CE, Hanson CA, et al. Risk of serious infection among individuals with and without low count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Leukemia*. 2021 Jan 1;35(1):239–44. doi: 10.1038/s41375-020-0799-8
24. Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Carbonell C, Lecomte Q, Pérez-Pons A, Torres-Valle A, et al. High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients. *Blood*. 2023;141(3):309–14. doi: 10.1182/blood.2022017439
25. Parikh SA, Achenbach SJ, Rabe KG, Norman AD, Boddicker NJ, Olson JE, et al. The risk of coronavirus disease 2019 (COVID-19) among individuals with monoclonal B cell lymphocytosis. *Blood Cancer J*. 2022;12(11):8–10. doi: 10.1038/s41408-022-00754-x

26. Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Lecrevisse Q, Carbonell C, Pérez-Pons A, Torres-Valle A, et al. Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Hematol.* 2023;(September):1–14. doi: 10.1002/ajh.27119
27. Shen Y, Freeman JA, Holland J, Naidu K, Solterbeck A, Van Bilsen N, et al. Multiple COVID-19 vaccine doses in CLL and MBL improve immune responses with progressive and high seroconversion. *Blood.* 2022;140(25):2709–21. doi: 10.1111/bjh.18014
28. Shen Y, Freeman JA, Holland J, Solterbeck A, Naidu K, Soosapilla A, et al. COVID-19 vaccine failure in chronic lymphocytic leukaemia and monoclonal B-lymphocytosis; humoral and cellular immunity. *Br J Haematol.* 2022;197(1):41–51. doi: 10.1182/blood.2022017814
29. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017 Oct 1;31(10):2094–103. doi: 10.1038/leu.2017.29
30. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908–75. doi: 10.1038/leu.2012.120
31. Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, Hernández J, Fernandez P, Almeida J, et al. EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods.* 2019 Dec 1;475:112662. doi: 10.1016/j.jim.2019.112662
32. Delgado AH, Fluxa R, Perez-andres M, Diks AM, Brink JAMVG Den, Barkoff A, et al. Automated EuroFlow approach for standardized in-depth dissection of human circulating B-cells and plasma cells. *Front Immunol.* 2023;14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1268686
33. Kardava L, Rachmaninoff N, Lau WW, Buckner CM, Trihemasava K, Blazkova J, et al. Early human B cell signatures of the primary antibody response to mRNA vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(28):1–11. doi: 10.1073/pnas.2204607119
34. Painter MM, Johnston TS, Lundgreen KA, Santos JJS, Qin JS, Goel RR, et al. Prior vaccination promotes early activation of memory T cells and enhances immune responses during SARS-CoV-2 breakthrough infection. *Nat Immunol.* 2023;24:1711–24. doi: 10.1038/s41590-023-01613-y
35. Menni C, Klaser K, May A, Polidori L, Capdevila J, Louca P, et al. Vaccine side-effects and SARS-CoV-2 infection after vaccination in users of the COVID Symptom Study app in the UK: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(7):939–49. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00224-3
36. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261–79. doi: 10.1038/nrd.2017.243
37. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell.* 2021;184(7):1671–92. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.029

38. Salvagno GL, Pighi L, Henry BM, De Nitto S, Plebani M, Lippi G. Early kinetics of cellular immunity in recipients of bivalent BNT162b2 vaccine: a proof-of-concept study. *Clin Chem Lab Med*. 2023;61(9):E172–4. doi: 10.1515/cclm-2023-0226
39. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol*. 2005;6(9):895–901. doi: 10.1038/ni1240
40. Laidlaw BJ, Ellebedy AH. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(1):7–18. doi: 10.1038/s41577-021-00657-1
41. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;5(49). doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114
42. Sokal A, Chappert P, Barba-Spaeth G, Roeser A, Fourati S, Azzaoui I, et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell*. 2021;184(5):1201-1213.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.050
43. Doi H, Tanoue S, Kaplan DE. Peripheral CD27-CD21- B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis. *Clin Immunol*. 2014;150(2):184–91. doi: 10.1016/j.clim.2013.12.001
44. 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. *Nature*. 2021;596(7870):109–13. doi: 10.1038/s41586-021-03738-2
45. Shuwa HA, Shaw TN, Knight SB, Wemyss K, McClure FA, Pearmain L, et al. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med*. 2021;2(6):720-735.e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.03.013
46. Azzi L, Dalla Gasperina D, Veronesi G, Shallak M, Ietto G, Iovino D, et al. Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. *eBioMedicine*. 2022;75. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103788

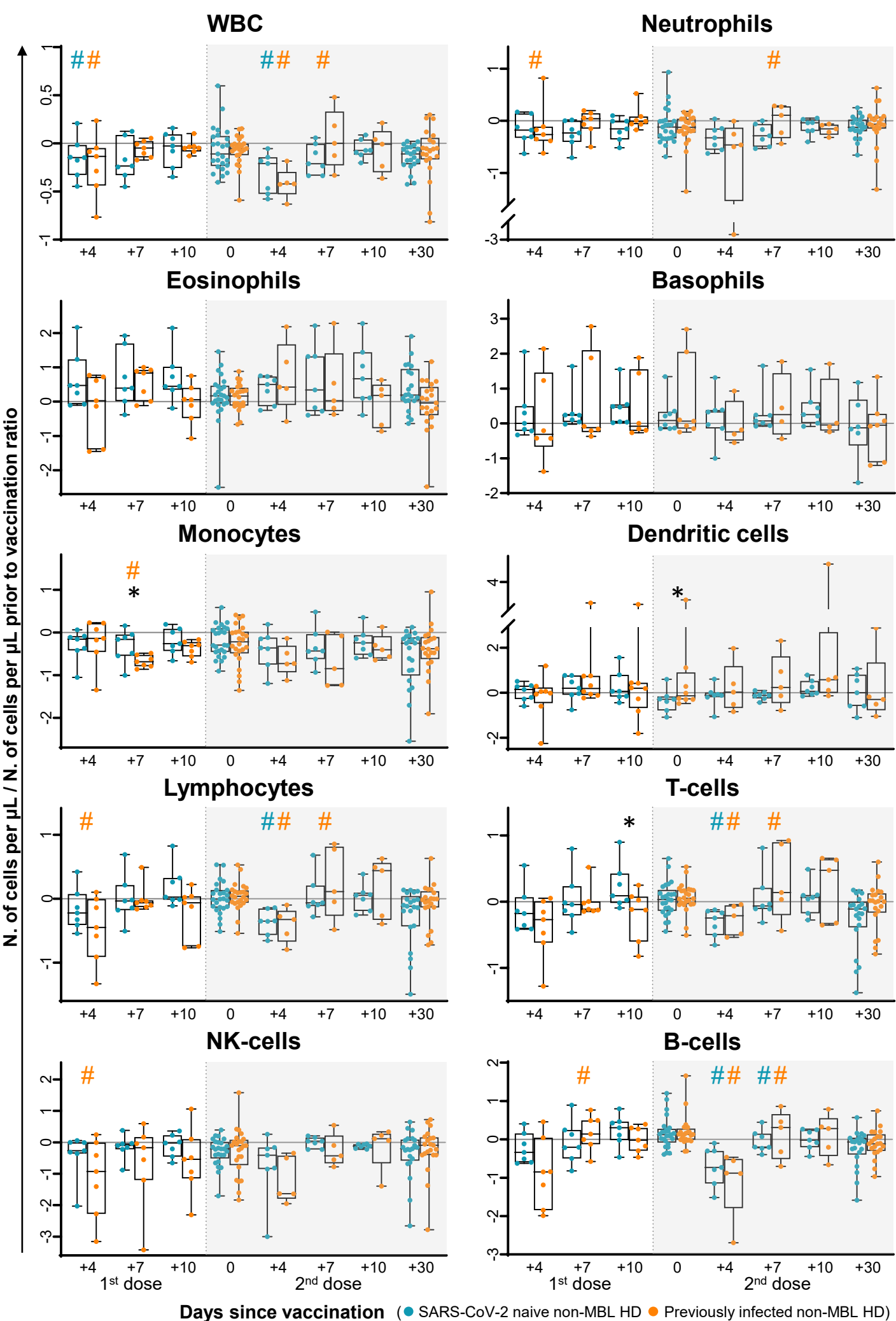


Figure 1. Kinetics of the major populations of leukocytes in blood of SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between the absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and those who had been previously infected by the virus (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer.

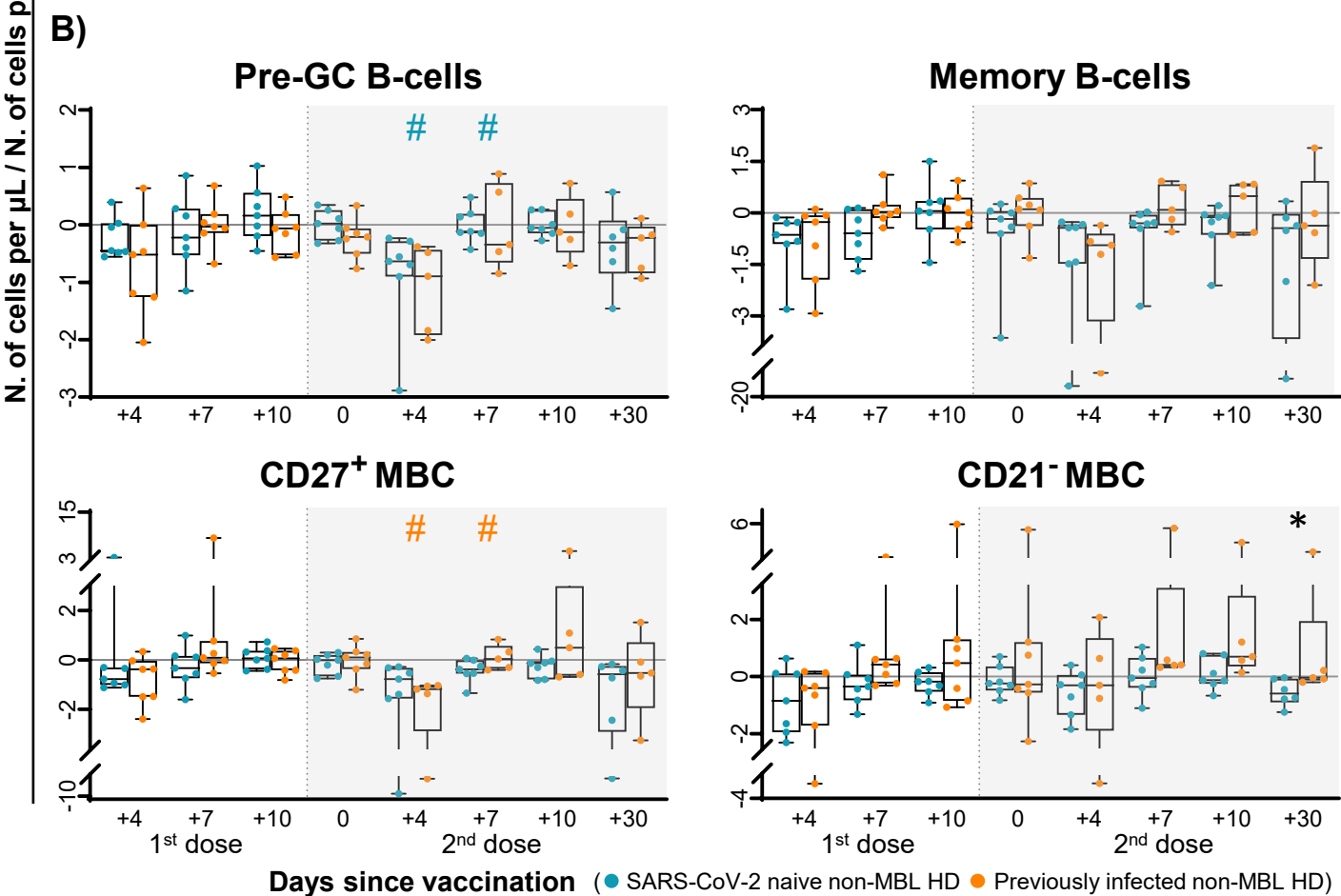
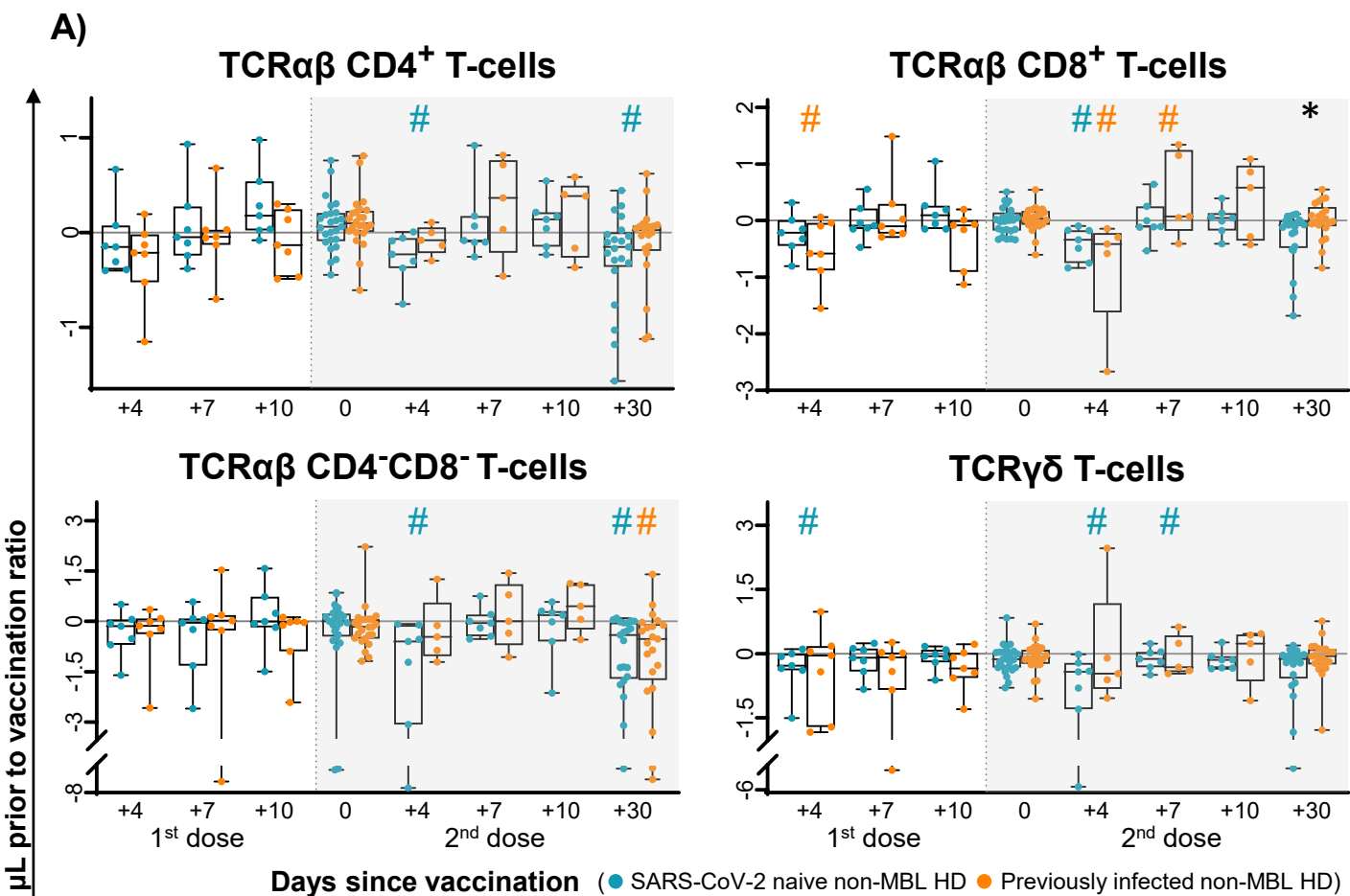


Figure 2. T-cell (A) and B-cell (B) subset kinetics in blood of SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between the absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and those who had been previously infected by the virus (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: GC, germinal center; HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; MBC, memory B-cells; TCR, T-cell receptor.

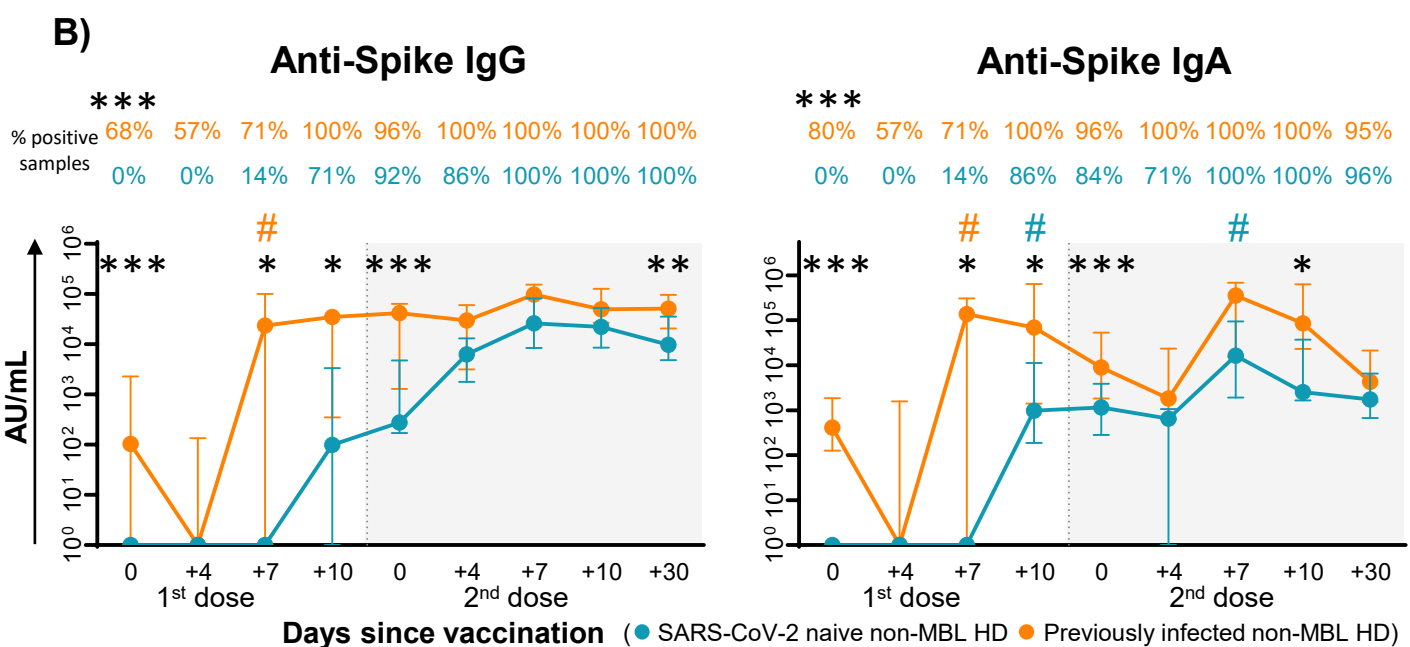
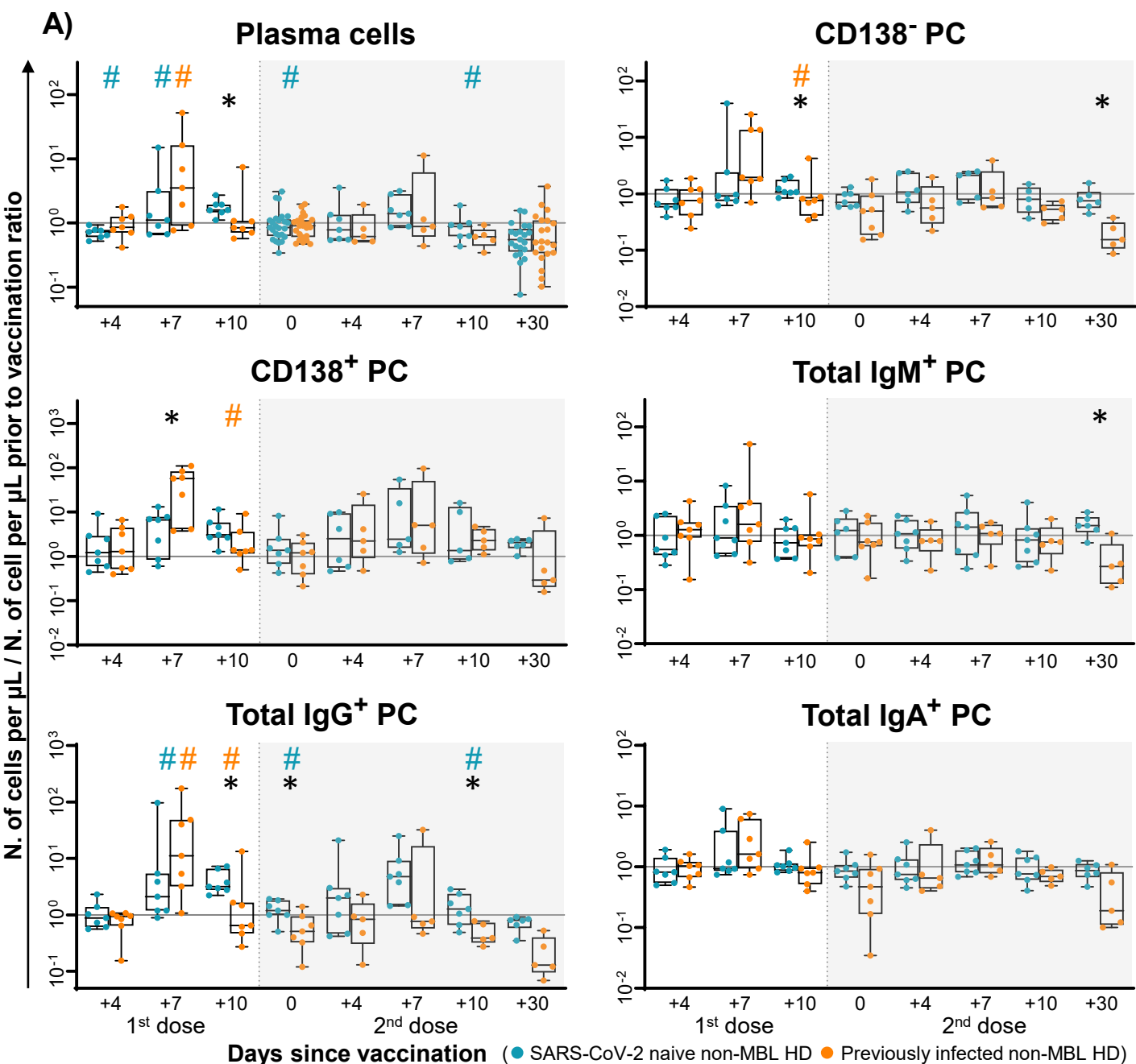


Figure 3. Kinetics of plasma cell subsets in blood grouped by their IgH isotype expression and maturation subsets (A) and SARS-CoV-2 specific antibody plasma levels in SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. (A) Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between the absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and those who had been previously infected by the virus (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. **(B)** Plasma levels (AU/ml) of anti-spike SARS-CoV-2 specific IgG and IgA antibodies in SARS-CoV-2 naive vs. previous COVID-19 non-MBL HD, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Whiskers represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the point in the middle corresponds to median values. Statistically significant differences between SARS-CoV-2 naive vs. previously infected non-MBL HD are represented with asterisks (p-value: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$); #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: AU, arbitrary units; HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; PC, plasma cells.

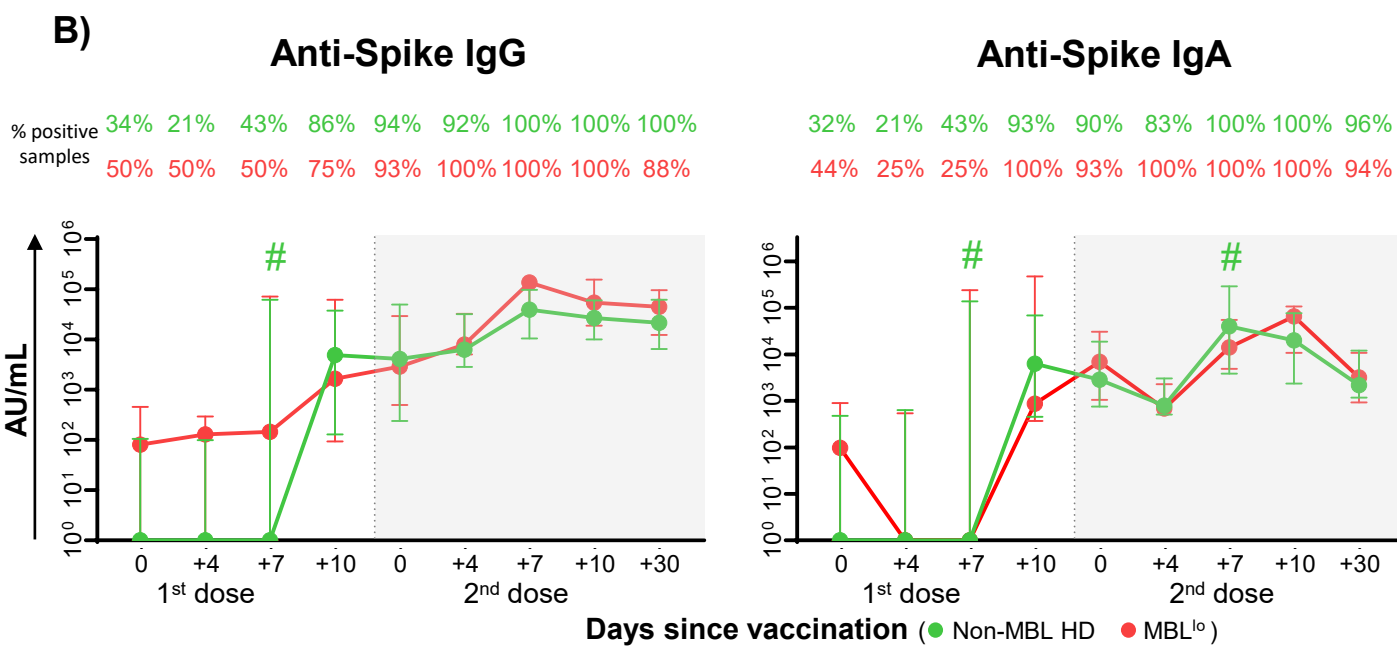
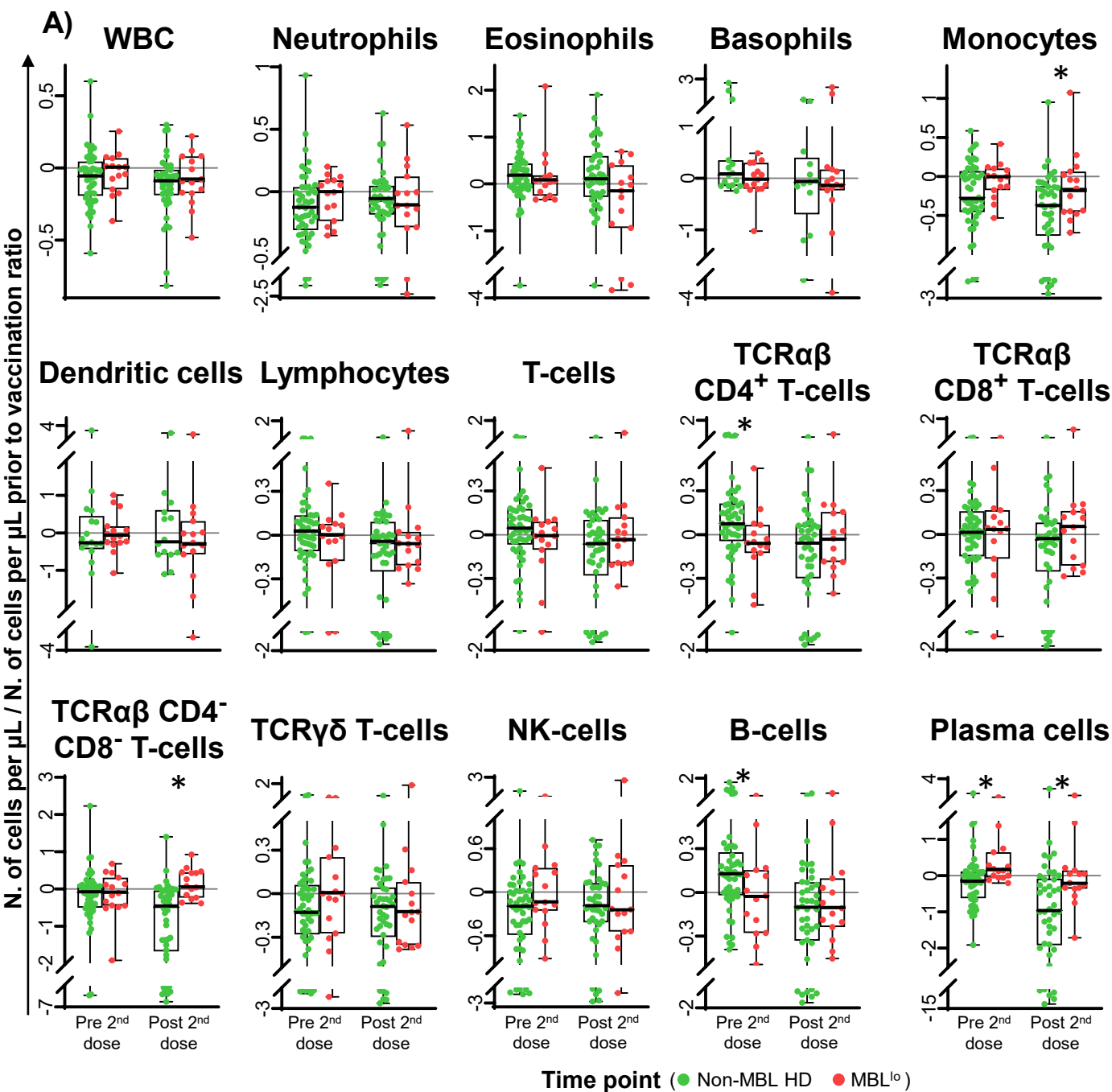


Figure 4. Kinetics of the major populations of leukocytes in blood (A) and SARS-CoV-2 specific antibody plasma levels (B) in MBL^{lo} vs. non-MBL HD after SARS-CoV-2 vaccination. (A) Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between the absolute cell count/ μ L of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without MBL (green dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the time from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL HD **(B)** Plasma levels (AU/ml) of anti-spike SARS-CoV-2 specific IgG and IgA antibodies in MBL^{lo} vs. non-MBL HD, using a logarithmic scale. Subjects without MBL (green dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Whiskers represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the point in the middle corresponds to median values. #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: AU, arbitrary units; HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer; TCR, T-cell receptor.

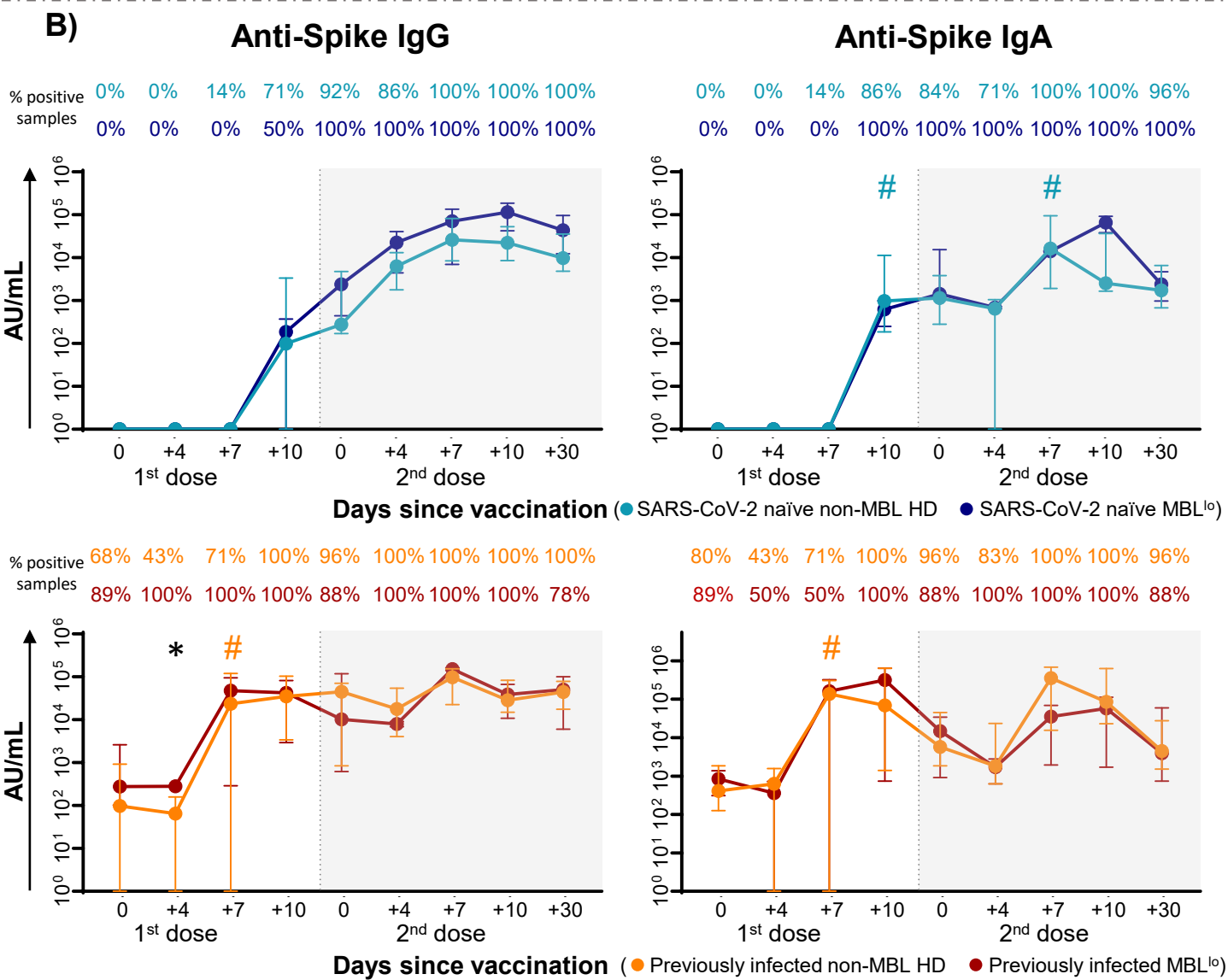
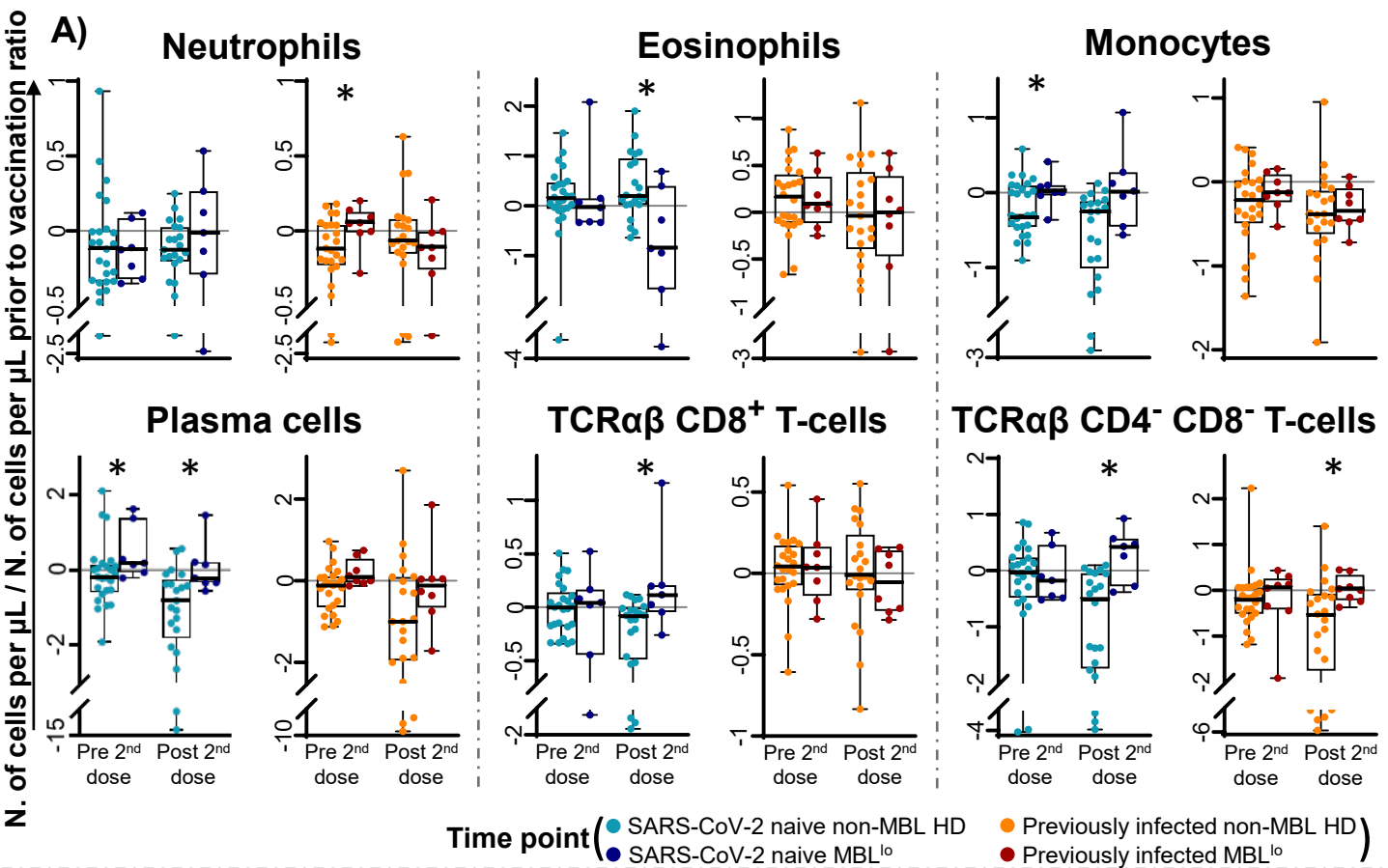


Figure 5. Leukocyte subset kinetics in blood (A) and SARS-CoV-2 specific antibody plasma levels (B) in MBL^{lo} vs. non-MBL HD after SARS-CoV-2 vaccination. (A) Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between the absolute cell count/ μ L of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (MBL^{lo}, dark blue dots; non-MBL, light blue dots) and those who had been previously infected by the virus (MBL^{lo}, red dots; non-MBL, orange dots) are grouped according to the time from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL HD. (B) Plasma levels (AU/ml) of anti-spike SARS-CoV-2 specific IgG and IgA antibodies in MBL^{lo} vs. non-MBL HD, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (MBL^{lo}, dark blue dots; non-MBL, light blue dots) and those who had been previously infected by the virus (MBL^{lo}, red dots; non-MBL, orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Whiskers represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the point in the middle corresponds to median values. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL HD #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; TCR, T-cell receptor.

DISCUSIÓN

Numerosas evidencias apuntan a que los sujetos con LBM^{lo} (que presumiblemente representa la fase más temprana del espectro LBM-LLC) ya son portadores de un sistema inmune deficiente, que afecta especialmente a la respuesta humoral.^{56,88-90,102} Estos defectos serían la antesala de las alteraciones inmunológicas típicas de pacientes con LBM^{hi} y sobre todo, con LLC, en los que dichas anomalías son mucho más extensas, evidentes y acusadas.^{84,94,97} En concreto, los individuos con LBM^{lo} presentan alteraciones en el compartimento linfoide B, especialmente en las células B pre-CG,^{56,88-90,102} que afectan al desarrollo de una respuesta humoral eficiente, sobre todo frente a nuevos antígenos, y en consecuencia, los haría más susceptibles a desarrollar infecciones graves.^{56,87} La pandemia de COVID-19 declarada en marzo de 2020, provocada por un nuevo virus frente al cual el ser humano no había estado expuesto previamente (SARS-CoV-2),^{115-117,119} nos brindó la posibilidad de emplear esta infección como modelo idóneo para confirmar la hipótesis sobre la que asienta el presente proyecto de tesis doctoral: la mayor susceptibilidad de los sujetos con LBM^{lo} de desarrollar formas más graves y de peor pronóstico/evolución de la infección, debido al estado de inmunodeficiencia subyacente asociado a esta entidad. Desde el inicio de la pandemia, numerosos estudios señalaron la existencia de diversos factores de riesgo asociados a un comportamiento clínico más agresivo de la COVID-19, tales como una edad avanzada, el sexo masculino o la coexistencia de diferentes comorbilidades,^{186,187,386} entre las que se incluyen inmunodeficiencias de diversa índole que puedan afectar el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada y específica frente al virus esencial para el control de la enfermedad. De hecho, la evolución a las formas más graves de la COVID-19 se ha asociado con una respuesta inmune significativamente desregulada.^{131,132,134} Ante estos antecedentes, en el contexto específico de la infección por SARS-CoV-2 y considerando que la presencia de LBM^{lo} podría influir en la evolución de la COVID-19 (independientemente de la edad) hacia formas más graves de la enfermedad, nos planteamos como primer objetivo de esta tesis doctoral establecer la prevalencia de LBM^{lo} en los pacientes con COVID-19 durante las primeras olas de la pandemia, tomando como referencia la prevalencia de LBM^{lo} en una cohorte prepandémica de adultos de la población general de la misma área geográfica, y determinar el posible impacto de la presencia de LBM^{lo} en la gravedad de la enfermedad.

Una vez establecida la relación entre la LBM^o y el riesgo incrementado de padecer una COVID-19 más grave, consideramos necesario profundizar en los cambios inmunológicos concretos (hasta entonces desconocidos) responsables del comportamiento más agresivo de la COVID-19 en los pacientes con clones de linfocitos B circulantes en SP. Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo se centró en profundizar en el perfil inmune de los pacientes con COVID-19 y LBM^o, mediante el estudio (longitudinal) de la cinética de las diferentes poblaciones de leucocitos en SP y de los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en estos pacientes, con la finalidad de identificar patrones característicos de la respuesta inmune asociados a la LBM^o, que contribuyan a explicar la posible relación existente entre esta entidad y una COVID-19 más grave.

Partiendo igualmente de la hipótesis de que existiría una asociación entre la LBM^o y una respuesta inmune inadecuada a la infección por SARS-CoV-2, nos planteamos también si de forma similar existiría una respuesta a la vacunación frente a la COVID-19 igualmente defectuosa. Recientemente, varios trabajos han demostrado que los pacientes con LLC, y en menor medida con LBM^{hi}, son incapaces de generar una respuesta humoral eficaz a la vacunación frente a SARS-CoV-2,³⁷⁸⁻³⁸⁰ debido a los defectos en el sistema inmune que presentan estos pacientes.^{84,94,97} En este sentido, teniendo en cuenta el estado de inmunodeficiencia subyacente a la LBM^o, cabe la posibilidad de que los individuos con LBM^o tampoco sean capaces de generar una respuesta inmune eficiente tras la vacunación frente a SARS-CoV-2. Por tanto, el tercer objetivo propuesto para el desarrollo de esta tesis doctoral se centró en evaluar el sistema inmune de los sujetos con LBM^o en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2. Además, teniendo en cuenta que en la bibliografía, la información acerca de los cambios tempranos en las distintas poblaciones de leucocitos circulantes en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 en sujetos sanos de la población general era en ese momento y aun ahora limitada, consideramos además dentro de este tercer objetivo del trabajo, analizar la cinética de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune y de los anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2, en sujetos sanos sin LBM vacunados frente a SARS-CoV-2, para utilizarla como referencia de la normalidad a la hora de compararla con la cinética de los sujetos con LBM^o e identificar posibles alteraciones características de esta entidad.

A continuación, abordaremos de forma secuencial la discusión de los resultados obtenidos en relación con cada uno de los tres objetivos específicos planteados en el trabajo, y recogido en los tres artículos científicos derivados del mismo.

1. Prevalencia de LBM^{lo} en pacientes con COVID-19 y su relación con la gravedad de la enfermedad

En la actualidad, sabemos que la prevalencia de la LBM^{lo} en la población general adulta es muy elevada, y oscila entre un 3% y un 16% (en función de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada para su detección) en los diferentes trabajos realizados en distintas áreas geográficas del mundo.^{18,21,23–25,27–30} En concreto, en el estudio realizado sobre la población general adulta de más de 40 años de la provincia de Salamanca (donde se alcanzó una sensibilidad de detección muy elevada) la frecuencia de LBM^{lo} observada fue del 14%.^{18,27} Como hemos referido previamente, la LBM^{lo} se asocia a un estado de inmunodeficiencia subyacente, que afecta principalmente al compartimento de células B,^{88–90} que condicionaría una mayor susceptibilidad de estos sujetos a padecer infecciones graves.^{56,87} Al iniciar esta tesis doctoral, no se había publicado ningún estudio en el que se hubiera investigado la prevalencia de LBM^{lo} en pacientes con infección primaria por microorganismos frente a los que no ha habido un contacto previo, como en la COVID-19, así como su posible impacto en la gravedad de la infección.

Al evaluar la presencia de clones de linfocitos B circulantes en una cohorte de 249 pacientes con COVID-19, detectamos LBM^{lo} en cerca del 30% de los pacientes incluidos en el estudio. Por tanto, confirmamos que la prevalencia de LBM^{lo} (la mayoría de las cuales presentaban un fenotipo de tipo LLC) en pacientes con COVID-19 era muy superior (el doble) a la descrita previamente en la población general de Salamanca.^{18,27} De forma similar a lo que ya se conocía en la población general,^{23,24,27,28,30} observamos que la frecuencia de LBM^{lo} iba aumentando progresivamente con la edad, siendo este aumento especialmente marcado entre los pacientes con COVID-19 mayores de 50 años. Además, al restringir el análisis de la prevalencia de LBM^{lo} únicamente a los pacientes con COVID-19 más graves (es decir, pacientes hospitalizados y/o ingresados en la UCI), la frecuencia de LBM^{lo} aumentó significativamente, hasta el 40% vs. 17% entre los pacientes con COVID-19 no hospitalizados. Estos hallazgos

sugieren que los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} muestran características clínicas asociadas a una mayor gravedad de la infección. En esta misma línea, otros autores han referido, en paralelo con la publicación de nuestros resultados, una frecuencia de hospitalización en sujetos con LBM^{lo} a causa de la COVID-19 3 veces superior a la observada en pacientes COVID-19 que no presentaban LBM.³⁸⁷ Por otro lado, aunque parece que en la población general la frecuencia de LBM^{lo} sería superior entre hombres respecto a las mujeres, solo en una pequeña parte de estos estudios, estas diferencias han alcanzado significación estadística.^{21,23} En nuestra serie de pacientes con COVID-19 observamos un claro predominio de LBM^{lo} en hombres, especialmente en el rango de edad de 50 a 70 años. Estos resultados están en consonancia con los descritos en diferentes estudios realizados en pacientes con COVID-19, en los cuales se ha señalado que la tasa de COVID-19 grave es significativamente más alta en los hombres, especialmente en personas de edad avanzada.^{171,186,187,191} Por tanto, nuestros hallazgos demuestran por primera vez que la frecuencia de LBM^{lo} es significativamente superior en los pacientes con COVID-19 que la descrita en la población general de la misma zona geográfica. Además, hemos confirmado que esta elevada frecuencia no se debe al efecto de la edad, ya que sigue siendo significativamente mayor al estratificar el análisis por grupos de edad. Por otro lado, hemos visto que la frecuencia de LBM^{lo} es incluso más elevada en los pacientes con COVID-19 hospitalizados, lo que apunta a que la LBM^{lo} podría estar influyendo de manera determinante en la evolución hacia una COVID-19 más grave.

Ante la elevada prevalencia de pequeños clones de linfocitos B circulantes de tipo LLC en pacientes COVID-19, cabe preguntarse si la presencia (y desarrollo) de LBM^{lo} es consecuencia de la infección. Con el fin de esclarecer esta cuestión, reevaluamos a un subgrupo de pacientes con LBM^{lo} un año después de haber pasado la COVID-19, confirmándose la presencia del clon de linfocitos B en la práctica totalidad de los pacientes. En dos pacientes en los que no pudo confirmarse la persistencia del clon tras la reevaluación podría deberse a falsos positivos, que al diagnóstico ambos casos mostraban clones LBM^{lo} en el límite de sensibilidad de la técnica y, al aumentar la sensibilidad de la técnica en la reevaluación, se descartó la presencia del clon en los dos sujetos. Tampoco observamos ningún cambio significativo en el tamaño medio del clon entre el momento inicial en el que se detectó por primera vez el clon y en la reevaluación. En su conjunto, estos hallazgos reafirman lo descrito previamente, señalando

que la LBM^{lo} es una entidad persistente y estable en el tiempo,^{24,56,388} sin que una nueva infección como la COVID-19 favorezca la emergencia de nuevos clones LBM^{lo} al menos en niveles detectables en sangre y a corto plazo (durante los meses siguientes a la resolución de la infección).

Ante estos resultados, nos propusimos profundizar en el estudio de las características clínicas y biológicas de los pacientes con COVID-19 y su asociación con la LBM^{lo}. Desde el inicio de la pandemia, se identificaron varias comorbilidades asociadas con un curso clínico más grave de la COVID-19. Por tanto, en una primera etapa, nuestro interés se centró en comprobar si los pacientes con y sin LBM^{lo} tenían una frecuencia similar de comorbilidades.^{169,186,187,386} En general, los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} mostraban más comorbilidades que aquellos pacientes que no tenían LBM, si bien las diferencias entre ambos grupos desaparecieron al comparar únicamente los pacientes mayores de 50 años, lo que sugiere que la presencia de comorbilidades previas (distintas a la LBM^{lo}) no estaría influyendo en el desarrollo de una enfermedad más grave en estos pacientes. Al comparar los parámetros clínicos asociados con una mayor gravedad de la COVID-19 en los pacientes con LBM^{lo} respecto a los que no tenían LBM, comprobamos que los primeros tenían síntomas asociados a una enfermedad más grave, entre los que destacaba una frecuencia más elevada de disnea.^{164,168,170} Además, en el momento del ingreso en el hospital, los pacientes con LBM^{lo} presentaron una saturación de oxígeno más baja, junto con niveles plasmáticos más elevados de marcadores proinflamatorios (como el fibrinógeno) y de marcadores relacionados con un mayor deterioro de la función renal (como la creatinina).^{168,170,186,187} Como sería de esperar en base a estos hallazgos clínicos y de laboratorio que apoyan la existencia de una asociación entre la LBM^{lo} y la COVID-19 más grave, la frecuencia de hospitalización en los pacientes con LBM^{lo} fue también significativamente superior a la observada en los pacientes sin LBM, requiriendo además los primeros más frecuentemente de oxigenoterapia y de ingreso en la UCI a lo largo de la evolución de la COVID-19. Globalmente, estos resultados indican que los pacientes COVID-19 con LBM^{lo} presentan un comportamiento clínico y analítico característicos de una enfermedad más grave, de acuerdo con la mayor gravedad de la COVID-19 descrita también en pacientes con LLC y LBM^{hi}.³⁰⁰

En un intento de identificar los mecanismos biológicos responsables de la asociación existente entre LBM^{lo} y mayor gravedad de la COVID-19, investigamos la distribución de las

principales poblaciones de leucocitos en SP de pacientes con LBM^o y sin LBM en dos momentos distintos: en la fase aguda de la infección y en el periodo de convalecencia tras pasar la COVID-19. Durante la fase aguda de la enfermedad, observamos que ambos grupos de pacientes mostraban un perfil de distribución de las células del sistema inmune en SP completamente alterado -congruente con las alteraciones descritas ampliamente en la introducción de esta tesis doctoral-, caracterizado por un aumento en el número de neutrófilos y monocitos en SP, asociado a una eosinopenia, basopenia y linfopenia, además de una expansión significativa de CP.^{213,214,268,287,310} No obstante, no encontramos diferencias significativas en la distribución de estas poblaciones celulares mayoritarias entre ambos grupos de pacientes, con la excepción, en el periodo de convalecencia post-COVID-19, de las cifras de linfocitos B totales circulantes, que eran significativamente menores en los pacientes COVID-19 con LBM^o. Cabe señalar que este hallazgo es concordante con datos previos de nuestro grupo, que sugieren que los sujetos con LBM^o tienen una producción deficiente de células B, probablemente asociada a una reducción progresiva del repertorio de los linfocitos B en el compartimento de células pre-CG.⁸⁸ Probablemente, el motivo por el cual no observamos diferencias adicionales en el recuento de células inmunológicas en sangre entre los dos grupos de pacientes, sea debido al enfoque utilizado en este primer objetivo, ya que, como se ha referido, analizamos la respuesta inmune en dos únicos puntos, durante la infección activa y una vez pasada la COVID-19. No obstante, debido a la naturaleza dinámica de la respuesta inmune, especialmente durante las etapas más tempranas de la infección, lo más adecuado sería plantearse estudiar los cambios en el sistema inmune mediante un análisis longitudinal, que nos permitiera tener una visión global de la respuesta inmune a lo largo de la COVID-19, aspecto que decidimos por tanto abordar en el segundo objetivo de esta tesis doctoral.

En contraposición con las escasas diferencias observadas entre los dos grupos de pacientes en la distribución de las poblaciones celulares en sangre, sí encontramos diferencias significativas entre los pacientes COVID-19 con y sin LBM^o, en lo que respecta a la respuesta humoral (anticuerpos específicos). Así, el porcentaje de pacientes COVID-19 con LBM^o en los que detectamos en plasma la presencia de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 (independientemente del isotipo y de la proteína del virus frente a la que iban dirigidos) era significativamente superior durante la fase aguda de la COVID-19, respecto a la detectada en los

pacientes sin LBM. Además, los niveles de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 también se encontraban más elevados en los pacientes con LBM^{lo}. Estos resultados refuerzan la asociación entre LBM^{lo} y una mayor gravedad de la COVID-19, apoyado por varios trabajos previos que han descrito una relación entre niveles más elevados de anticuerpos en plasma y una mayor gravedad de la enfermedad, debido a la acumulación excesiva de una mayor carga viral en pacientes con COVID-19 grave vs. leve, que necesitarían mayores títulos de anticuerpos para neutralizar un mayor número de partículas virales.^{265,294-296}

En general todos estos datos apuntan a que la presencia de LBM^{lo} contribuye negativamente en la evolución de la COVID-19. Para confirmar de manera definitiva la relación entre la presencia de LBM^{lo} y el desarrollo de COVID-19 (más) grave, llevamos a cabo un análisis multivariante en el que incluimos las variables clínicas y biológicas asociadas a un riesgo más elevado de hospitalización por COVID-19. El análisis multivariante confirmó que la presencia de LBM^{lo} constituía un factor de riesgo independiente a la hora de predecir la necesidad de hospitalización por COVID-19, junto con otras variables inmunológicas como un número incrementado de granulocitos neutrófilos, o la reducción de las cifras de eosinófilos, linfocitos B y células NK,^{213,214,268,287,310} y títulos elevados de IgA específica frente a la proteína N del virus,^{265,294-296} además de la disnea y la fiebre.^{164,168,170}

En resumen, los resultados relacionados con el primer objetivo de esta tesis doctoral muestran por primera vez que la frecuencia de LBM^{lo} en pacientes con COVID-19 es significativamente más alta que la descrita en la población general de Salamanca, siendo especialmente elevada en los pacientes hospitalizados. Además, confirmamos la existencia de una asociación significativa entre la presencia de LBM^{lo} y un comportamiento clínico y biológico característico de una COVID-19 grave, constituyendo la presencia de LBM^{lo} un factor de riesgo independiente de otras características de la enfermedad y del paciente a la hora de predecir la gravedad de la COVID-19.

2. Cinética de las poblaciones del sistema inmune y de los anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con LBM^{lo}

A pesar de que en el primer trabajo que compone esta tesis doctoral identificamos a la LBM^{lo} como un nuevo factor de riesgo de hospitalización por COVID-19, no logramos descifrar

los mecanismos biológicos, y en concreto inmunológicos, involucrados en la evolución hacia formas más graves de la infección asociados a la presencia de estos pequeños clones de linfocitos B circulantes en sangre. Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo doctoral se centró en investigar los perfiles inmunológicos asociados a la LBM^o en pacientes con COVID-19, a través de un estudio longitudinal de la cinética de la respuesta inmune celular y humoral llevado a cabo en pacientes infectados, seguidos a lo largo de 10 meses desde el inicio de los síntomas asociados a la COVID-19.

Con este propósito, analizamos un conjunto de 179 muestras de SP de 74 pacientes con LBM^o durante la fase aguda de la COVID-19, y tras un largo periodo de tiempo una vez resuelta la infección. En estas muestras determinamos la distribución de las distintas poblaciones de leucocitos en SP, y con especial detalle en las subpoblaciones de linfocitos B y CP, además de los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N de SARS-CoV-2, durante un largo periodo de seguimiento de 43 semanas desde el inicio de los síntomas asociados a la COVID-19. Además, con el fin de corregir posibles diferencias debidas a la edad, en este apartado todos los resultados relativos a la distribución de las distintas poblaciones celulares en SP se expresaron en números absolutos (número de células/ μ L) normalizados con respecto a la edad de controles sanos sin LBM reclutados antes del inicio de la pandemia. Gracias a esta aproximación metodológica, pudimos identificar con mayor precisión alteraciones en la distribución de las poblaciones leucocitarias en los sujetos analizados respecto a los valores de referencia establecidos previamente para cada población celular, eliminando el efecto de la diferencia de edad existente entre los distintos grupos de pacientes, y evitando así incurrir en una interpretación errónea de los resultados. En cualquier estudio relacionado con el sistema inmune es esencial tener en cuenta estas variaciones asociadas a la edad debido a los cambios dinámicos tan significativos que se producen en los distintos componentes celulares del sistema inmune a lo largo de la vida.^{90,307-309}

Estudios previos han descrito que durante la fase aguda de la COVID-19, la distribución de las células del sistema inmune en SP se encuentra significativamente alterada respecto a los valores normales de referencia, siendo esto particularmente evidente en pacientes con COVID-19 grave.^{213,214,267,268,289,312} Las alteraciones inmunológicas descritas de forma recurrente consisten en un aumento numérico de los granulocitos neutrófilos y monocitos en SP, asociado

a una disminución significativa del número de eosinófilos, basófilos, linfocitos y CDs, además de una expansión transitoria pero pronunciada, de CP.^{213,214,267,268,289,312} En líneas generales, en nuestros pacientes con LBM^o encontramos este mismo perfil inmunológico durante la etapa más temprana de la enfermedad, propio de una COVID-19 grave. Cabe señalar que estas alteraciones en las principales poblaciones de leucocitos en SP persistieron durante las 4 primeras semanas tras el inicio de los síntomas, empezando a normalizarse a partir de la semana +5, hasta alcanzar los valores normales, cinética que coincide con la descrita anteriormente en pacientes hospitalizados por COVID-19 grave.^{213,312} Durante la fase de convalecencia, los pacientes con LBM^o seguían presentando alteraciones numéricas de algunas poblaciones de células inmunes en SP, aunque menos marcadas que durante la fase aguda de la infección, lo que podría reflejar las secuelas ocasionadas por la COVID-19 en el sistema inmune a más largo plazo, casi un año después de la infección.^{214,312,315,323,324} Un análisis más detallado de las distintas subpoblaciones de linfocitos T y B reveló una disminución de todas las subpoblaciones mayoritarias de linfocitos T, siendo este descenso especialmente acusado para los linfocitos T TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8, probablemente debido al reclutamiento e infiltración de estas células al pulmón, donde van a desempeñar su función dentro de la respuesta innata.^{255,257} Respecto al compartimento B, tanto los linfocitos B pre-CG como los de memoria mostraron una cinética similar a la de los linfocitos B totales, encontrándose por tanto disminuidos al comienzo de la infección, recuperando posteriormente sus cifras rápidamente, hasta alcanzar niveles normales. De todas las subpoblaciones analizadas, los linfocitos B de memoria CD27⁻CD21⁻ (denominados linfocitos B atípicos, los cuales se asocian con un estado de “anergia”)^{318,319} estaban particularmente reducidos durante las etapas iniciales de la COVID-19. Este hallazgo es especialmente sorprendente, teniendo en cuenta que en trabajos previos se ha descrito que esta población de linfocitos B está expandida tanto durante la COVID-19, como tras la infección.^{260,267} No obstante, cabe señalar que los trabajos donde se refieren estos hallazgos son estudios transversales, y en los que probablemente estos resultados no se corresponden con el momento inicial de la infección, lo cual podría contribuir a explicar la discordancia existente con nuestros hallazgos en relación a esta pequeña subpoblación de células B.

Tal como se ha descrito previamente por otros grupos en pacientes con COVID-19, en nuestro estudio observamos un incremento significativo del número de CP circulantes en sangre

de los pacientes con LBM^o desde la primera semana tras del comienzo de los síntomas, hasta alcanzar el pico máximo en sangre en torno a la semana +4, comenzando a descender hasta recuperar valores normales a partir de ese momento.^{214,267,268,288,289,315,316} Merece destacar que esta respuesta estaba dominada por CP de subclase IgG1⁺, acompañadas también de un aumento, aunque en menor medida, de las CP IgG3⁺, IgA1⁺ e IgM⁺.^{269,270,315,320,322} Si bien nuestros resultados señalan que este aumento se producía a expensas de CP de todos los estadios de maduración, existía un claro predominio de las CP más maduras en sangre, caracterizadas por tener un perfil fenotípico CD20⁺CD138⁺. A su vez, los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N de SARS-CoV-2 presentaban una cinética superponible a la de las CP. Así, un porcentaje significativo de pacientes COVID-19 con LBM^o mostraba niveles detectables de anticuerpos específicos frente a las dos proteínas del virus desde la primera semana tras el inicio de los síntomas, alcanzando estos niveles máximos entre las semanas 3 y 4 de la enfermedad, en paralelo con el pico de CP en sangre. Un hallazgo aparentemente inesperado fue el que los anticuerpos de isotipo IgG e IgA mostraban una cinética paralela a la de los anticuerpos IgM, mientras que en una respuesta humoral “clásica” a un nuevo antígeno, se producirían primero los anticuerpos de isotipo IgM sin que las CP pasen por el proceso de cambio de isotipo, seguidos de la producción algo más tardía de IgA e IgG. En general, una vez controlada la infección, los niveles de IgM disminuyeron rápidamente, seguidos de los anticuerpos IgA, mientras que los niveles de anticuerpos IgG se mantuvieron elevados hasta la semana +13, cuando empezaron a disminuir también estos últimos que, sin embargo, permanecían detectables en plasma en la mayoría de los casos.^{265,328,331–334} También merece destacar que en nuestro estudio observamos una cinética paralela para los niveles plasmáticos de anticuerpos anti-S y anti-N durante todo el periodo de seguimiento. Sin embargo, los anticuerpos anti-S de isotipo IgM mantuvieron niveles relativamente bajos pero detectables durante todo el periodo de seguimiento, lo que contrastaba con los niveles de anticuerpos anti-N, cuyos títulos fueron significativamente inferiores y transitorios.²⁶⁶ Este hallazgo podría estar condicionado por la posible reactividad cruzada frente a la proteína N de otros coronavirus humanos (como SARS-CoV o MERS-CoV),^{389,390} al tratarse la proteína N de una proteína muy estable, con un alto grado de homología entre los diferentes coronavirus.^{130,136,137} Teniendo en cuenta este hecho, algunos sujetos podrían poseer células de memoria específicas frente a la

proteína N, que en respuesta a la infección por SARS-CoV-2, hubiesen generado una rápida respuesta mediada por CP de isotipo IgG⁺ e IgA⁺, explicando así los niveles más bajos de anticuerpos IgM contra la proteína N.^{391,392} En su conjunto, nuestros resultados relacionados con la respuesta celular y humoral en pacientes COVID-19 con LBM^o presentan una gran similitud con la descrita previamente como la respuesta inmune típica frente a sars-CoV-2 (y otros agentes infecciosos), si bien en los pacientes con LBM^o se observan rasgos propios de una enfermedad de carácter más grave, corroborando la asociación descrita en el primer trabajo de esta tesis doctoral entre LBM^o y unas características asociadas a una mayor gravedad de la COVID-19 desde el punto de vista inmunológico.

Una vez establecida la cinética de la respuesta celular y humoral en los pacientes con COVID-19 y LBM^o, nos propusimos determinar con mayor precisión que alteraciones específicas mostraba esta respuesta inmune de los pacientes con LBM^o, respecto a la cinética observada en los pacientes COVID-19 sin LBM. Respecto a la respuesta celular innata, confirmamos que el número de granulocitos neutrófilos circulantes era significativamente superior en los pacientes con LBM^o durante la primera semana tras el inicio de los síntomas, hallazgo consistente con una respuesta inflamatoria más exacerbada en estos pacientes, propia de una mayor gravedad de la COVID-19.^{213,234,235,268} Además, observamos niveles inferiores de CDs entre las semanas +2 y +4 tras el inicio de los síntomas, acompañado a su vez de un descenso significativo de las poblaciones de linfocitos T con una función innata (es decir, los linfocitos T TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ y TCR $\gamma\delta$), que se mantuvo hasta 7 semanas después del comienzo de los síntomas. La disminución de CDs en sangre se ha documentado previamente en pacientes con COVID-19 grave, habiendo sido interpretado este hallazgo como consecuencia de un incremento de la migración desde la sangre hacia los órganos linfoides secundarios, donde llevarían a cabo su función como células presentadoras de antígeno.^{214,267,283,312,313} En contraposición con las CDs, los linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ serían reclutados a las mucosas y al pulmón, donde ejercen un papel relevante dentro de la respuesta innata gracias a su función como células citotóxicas.^{257,282} De la misma forma, en la rama adaptativa de la respuesta inmune, y especialmente en el compartimento linfoide B, también encontramos importantes diferencias entre ambos grupos de pacientes con COVID-19. Así, los niveles de linfocitos B pre-CG eran significativamente inferiores al comienzo de los síntomas asociados a la COVID-19 entre los

pacientes con LBM^{lo}. Este hallazgo sigue la misma tendencia que lo referido anteriormente por nuestro grupo en una cohorte de sujetos con LBM^{lo} en estado basal, fuera del contexto de una infección.⁸⁸ La disminución del número de linfocitos B pre-CG residuales característico de los pacientes con LBM^{lo} podría condicionar además una reducción del repertorio del BCR de los linfocitos B recién producidos, con el consiguiente deterioro de la capacidad de generar respuestas específicas eficaces frente a nuevos antígenos. No obstante, cabe señalar que, pese al déficit descrito de los linfocitos B pre-CG, los pacientes con LBM^{lo} mostraron un incremento más pronunciado en el número de CP en sangre que los pacientes COVID-19 sin LBM, a expensas de CP maduras CD20⁺CD138⁺. Sin embargo, en los pacientes con LBM^{lo}, el pico máximo de CP en sangre se retrasó de la segunda a la tercera o cuarta semana tras el inicio de los síntomas, respecto a lo observado en pacientes COVID-19 sin LBM. Tanto la mayor intensidad, como el retraso del pico de CP en sangre observado en pacientes COVID-19 con LBM^{lo} respecto a los que no presentaban LBM, estarían probablemente condicionados por el descenso previo (constatado en la semana +1) en el número de linfocitos B pre-CG.

En consonancia con los hallazgos descritos previamente en esta tesis doctoral, el análisis de la cinética de la respuesta humoral a lo largo del tiempo mostró también niveles de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 significativamente más elevados en los pacientes con LBM^{lo} durante la fase aguda de la infección, entre las semanas 2 y 4 tras el inicio de los síntomas, lo que se ha asociado en la COVID-19 con una mayor gravedad de la enfermedad.^{265,295,296} Por el contrario, estos resultados contradicen los hallazgos previos que apuntan a la existencia de una respuesta humoral defectuosa a la vacunación frente a SARS-CoV-2 en pacientes con LBM^{hi} y LLC, al ser estos pacientes incapaces de generar una respuesta óptima con títulos de anticuerpos específicos similares a los alcanzados en sujetos sanos.^{379,385} Aunque es cierto que los datos referidos a la respuesta humoral frente a la vacuna podrían no ser comparables con los observados en una infección primaria tan compleja como la COVID-19, los niveles más elevados de anticuerpos observados en nuestros pacientes con LBM^{lo} podrían reflejar también las diferencias biológicas existentes entre los defectos inmunológicos de estos sujetos respecto a los descritos en pacientes con LBM^{hi} y LLC. Para poder confirmar esta hipótesis, sería necesario profundizar en la respuesta humoral (y celular) en sujetos con LBM^{lo} a la vacunación frente a SARS-CoV-2, lo que de hecho abordamos en nuestro tercer objetivo.

En las últimas semanas del periodo de seguimiento realizado en nuestra serie, el recuento de varias poblaciones celulares todavía estaba alterado en pacientes COVID-19 con LBM^o respecto a los que no presentaban LBM. Estas diferencias incluían niveles significativamente más altos de monocitos y linfocitos T (aunque dentro del rango de la normalidad) en sangre, en comparación con los pacientes sin LBM. Ante estos hallazgos, cabría pensar que las alteraciones de las poblaciones leucocitarias descritas persisten en sangre mucho tiempo después de haber pasado la COVID-19.^{315,323,324} No obstante, al tratarse de alteraciones presentes en los pacientes con LBM^o, estas alteraciones podrían también ser reflejo de las anomalías asociadas a la propia LBM^o, más que secuelas de la COVID-19 a largo plazo.^{56,90}

De acuerdo con los patrones de alteraciones en la respuesta inmune específica, celular y humoral, encontrados en pacientes COVID-19 con LBM^o y descritos anteriormente en esta memoria, proponemos un modelo integrado que podría contribuir a explicar el fundamento biológico por el cual la presencia de linfocitos B clonales circulantes se asocia con una mayor gravedad de la COVID-19, que también podría resultar válido para otras infecciones.^{56,87} Este modelo hipotético se basa en hallazgos previos que sugieren que los sujetos con LBM^o presentan un descenso en el número de linfocitos B pre-CG, que llevaría a una reducción del repertorio del BCR de los linfocitos B pre-CG, responsables de generar una respuesta humoral específica frente a nuevos antígenos frente a los que no ha habido un contacto previo. Nuestros resultados en pacientes COVID-19 con LBM^o confirman esta disminución en el número de linfocitos B pre-CG, que en el contexto de una exposición a SARS-CoV-2, originaría la activación de los linfocitos B específicos de antígenos de SARS-CoV-2 dentro del compartimento de linfocitos B naive, resultando en un retraso en la producción de células efectoras (las CP y los linfocitos B de memoria), tal como observamos en nuestra serie de pacientes con LBM^o. El retraso en la producción de CP permitiría la replicación incontrolada del virus, aumentando así la carga viral en el plasma de los pacientes (que es significativamente más elevada en los pacientes con LBM^o en las primeras semanas de la infección), lo que a su vez promovería, por un lado, la secreción de una mayor cantidad de anticuerpos específicos del virus, necesarios para neutralizar la elevada carga viral, y por otra parte, una activación más intensa de la respuesta innata, debido a la ausencia de una respuesta adaptativa capaz de controlar (de forma rápida y en un tiempo

limitado) la infección. Esto explicaría también los cambios más pronunciados y prolongados en las distintas poblaciones de células innatas involucradas en la patogenia de la COVID-19 grave.

En resumen, el análisis longitudinal de la cinética de las distintas poblaciones de leucocitos en sangre y de los anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 en plasma han puesto de manifiesto que los pacientes con COVID-19 y LBM^{lo} presentan perfiles inmunológicos alterados, que se asemejan a los descritos previamente para los casos con infección grave. En concreto, estas alteraciones consisten en una respuesta inmune innata más pronunciada y prolongada, reflejada en el descenso más marcado en sangre de las CDs y los linfocitos T innatos en las primeras semanas tras el inicio de los síntomas, seguido de un pico más pronunciado pero retrasado en sangre de CP, acompañado de niveles más elevados de anticuerpos específicos.

3. Cinética de las poblaciones del sistema inmune y de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 en sujetos sanos y con LBM^{lo}

A raíz de los hallazgos descritos en el apartado anterior, nos preguntamos si las alteraciones en el sistema inmune observadas en los sujetos con LBM^{lo}, e indicativas de una respuesta inadecuada frente al SARS-CoV-2, junto a una mayor gravedad de la COVID-19 observada en estos pacientes, podrían afectar también a su capacidad para generar una respuesta adecuada a la vacunación frente a este virus y, en cuyo caso, si los sujetos con LBM^{lo} podrían verse beneficiados de la administración de múltiples dosis de la vacuna, como se recomienda actualmente en sujetos incluidos en los grupos de riesgo.^{352,353} Hoy día es bien conocido que los pacientes con LBM^{hi} y LLC presentan una respuesta humoral defectuosa a la vacuna frente al SARS-CoV-2.^{379,385} En concreto, en estos pacientes se han descrito niveles de anticuerpos significativamente más bajos los observados en los controles sanos tras la administración de la vacuna.^{379,385} En el caso de sujetos con LBM^{lo}, se desconoce si estos desarrollan o no una respuesta inmune a la vacunación con antígenos de SARS-CoV-2. Por este motivo, el tercer objetivo de esta tesis doctoral se centró en analizar los cambios en la distribución de las distintas poblaciones de leucocitos en sangre y en los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a la proteína S del virus en sujetos con LBM^{lo} vacunados frente a SARS-CoV-2, comparando los perfiles de la respuesta observados en los sujetos sanos de la misma edad que no presentaban LBM.

Una limitación importante que nos encontramos en el momento de analizar la respuesta celular y humoral a la vacunación en sujetos con LBM^{lo} fue la ausencia de valores de referencia en controles sanos (sin LBM) con los que comparar los cambios que observamos en estos individuos. Además, la gran mayoría de los trabajos dirigidos a evaluar la eficacia de las vacunas frente al SARS-CoV-2 en la población general se han limitado a medir los niveles de anticuerpos específicos frente a la proteína S (y su actividad neutralizante) y, menor medida, su capacidad para generar células T y B de memoria.^{357-361,365,393} Ante esta limitación y el escaso número de estudios previos en los que se hayan analizado de manera integrada los cambios que ocurren de forma temprana en sangre en la distribución de las diferentes poblaciones de leucocitos en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2, en paralelo con los cambios en los niveles de anticuerpos, nos planteamos como prerrequisito esencial para alcanzar nuestro tercer objetivo, establecer el perfil de la respuesta a la vacunación frente al SARS-CoV-2 por parte de las células inmunitarias en sangre y de la cinética de los títulos en plasma anticuerpos específicos frente a la proteína S del virus en donantes sanos que no presentaban LBM, ni cualquier otro tipo de inmunodeficiencia. Con este propósito, analizamos la cinética de la respuesta celular y humoral a la vacunación frente al SARS-CoV-2 en 50 adultos sanos (sin LBM), en función de si habían tenido o no exposición/infección previa al virus. En los sujetos previamente infectados por SARS-CoV-2, el número de leucocitos totales se encontraba disminuido en el día +4 tras la administración de la primera dosis de la vacuna, respecto a los niveles previos a la vacunación, debido al descenso del número de granulocitos neutrófilos y linfocitos, y dentro de estos, de las células NK, seguido de una disminución transitoria del número de monocitos circulantes al día +7. Tras la administración de la segunda dosis de la vacuna se observó una cinética prácticamente idéntica, si bien cabe destacar que, los cambios observados en el compartimento linfoide eran entonces más marcados en los sujetos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2. La reducción temprana y transitoria en el número de células innatas (granulocitos neutrófilos, monocitos y células NK) circulantes en sangre, especialmente tras la primera dosis de la vacuna, podría reflejar el reclutamiento de estas células al lugar de administración de la vacuna, donde se estaría produciendo una respuesta inflamatoria local.³⁹⁴ Sin embargo, cabe señalar que los cambios inducidos por la vacunación en la respuesta innata no eran tan acusados en comparación con los observados en los pacientes con COVID-

19.^{131,160,213,214,312} Estos resultados podrían deberse, al menos en parte, por la formulación de las vacunas basadas en ARNm,³⁹⁵ que contienen nucleótidos modificados con el objetivo de reducir su reconocimiento por parte de los receptores para patrones moleculares de microorganismos, expresados por las células innatas, como los TLR, y limitar así el desarrollo de la respuesta inflamatoria exacerbada descrita en los pacientes con COVID-19 durante las primeras olas de la pandemia.^{131,160,195} Por otro lado, nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una activación temprana de los linfocitos T y B,^{369,370,374} reflejada en su disminución temprana en sangre al día +4 después de la administración de la vacuna, probablemente relacionada con una migración hacia los órganos linfoides secundarios mediado por CCR7 (CD197) en respuesta a la señalización por CCL19 y CCL21.³⁹⁶ En estos tejidos, los linfocitos T van a participar en la activación y maduración dependiente de antígeno de los linfocitos B en el CG, cuya finalidad es la producción de células efectoras de la respuesta humoral (las CP y los linfocitos B de memoria).^{132,258–260}

Como cabía esperar, los sujetos sanos sin LBM que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2 generaron una respuesta linfoide B de carácter más inmaduro, evidenciada por el descenso de los linfocitos B pre-CG, que estarían siendo reclutados al CG donde van a reconocer su antígeno específico.^{258,365} Por el contrario, en los sujetos sin LBM que habían pasado la COVID-19, y, por tanto, que habían generado linfocitos B de memoria específicos frente al SARS-CoV-2 tras la infección, la respuesta B fue dependiente de los linfocitos B de memoria CD27⁺, confirmando nuestros resultados que en estos sujetos se produce una rápida respuesta inmunológica mediada por los linfocitos B de memoria, generados tras la infección por el virus.^{358,360,363,364} Además, tras la administración de la segunda dosis observamos un aumento del número de linfocitos B de memoria CD21⁻ en aquellos sujetos que habían pasado la COVID-19. Como hemos referido anteriormente, en varios estudios se ha descrito un aumento de los linfocitos B de memoria “atípicos” (CD27⁻CD21⁻) en pacientes con COVID-19,^{260,267} habiéndose asociado este fenotipo a un estado de “anergia” funcional.^{318,319} Una posible explicación al aumento de estas células observado en sujetos vacunados podría residir en el hecho de que la vacunación en sujetos que han pasado la COVID-19 podría inducir una reactivación específica de esta población B con su consiguiente expansión, si bien es cierto que la relevancia biológica de este hallazgo sigue siendo desconocida.

Trabajos previos han descrito un aumento generalizado de las CP en la sangre en respuesta a la vacunación frente al SARS-CoV-2.^{357,359,372,374} Nuestros resultados confirman estos hallazgos, y además ponen de manifiesto la existencia de una cinética diferente de las CP en los sujetos vacunados, en función de la existencia o no de exposición previa al virus. Así, en sujetos sin LBM que habían pasado la COVID-19 previamente, la respuesta de las CP a la vacunación era más temprana y pronunciada (al día +7 tras la administración de la vacuna) respecto a las que no habían tenido contacto previo con el virus.^{359,374} En concordancia con otros trabajos, nuestros hallazgos demostraron también que esta respuesta a la vacunación (tanto en los sujetos previamente infectados como los que no habían estado expuestos al virus) era mediada principalmente por CP de isotipo IgG⁺, sin apenas cambio o respuesta por parte de las CP de isotipos IgA⁺ e IgM⁺.^{357,359} No obstante, llamaba la atención que estos datos no se corresponden con la producción de anticuerpos específicos frente a la proteína S, ya que sí detectamos una respuesta significativa de los anticuerpos de isotipo IgA, además del aumento de anticuerpos de isotipo IgG, como detallamos más adelante. Una posible explicación a la respuesta predominante por parte de las CP IgG⁺ observada tras la vacunación en los dos grupos de sujetos sanos estudiados, respecto a la respuesta por parte de las CP durante la infección natural por el SARS-CoV-2, en la que tal como hemos descrito anteriormente aumentan las CP que expresan los tres isotipos de Igs, podrían radicar en las diferencias en el modo de entrada del virus al organismo, es decir, a la administración intramuscular de la vacuna, frente a la entrada de SARS-CoV-2 a través de la mucosa nasal en la infección natural. Un análisis más detallado de las CP expandidas tras la vacunación de acuerdo con la subclase de inmunoglobulina expresada en la membrana reveló que la respuesta IgG⁺ era debida principalmente a células IgG1⁺, tanto en los sujetos sanos sin exposición previa a SARS-CoV-2, como en los previamente infectados por el virus. Además, en aquellos sujetos que no habían tenido contacto previo con el SARS-CoV-2, también observamos un aumento de CP IgG3⁺ (aunque menos acusado que la respuesta observada para las CP IgG1⁺), a diferencia de los sujetos que habían pasado la COVID-19 antes de la vacunación, en los cuales las cifras de CP IgG3⁺ en sangre permanecieron estables tras la inoculación de la vacuna. Estos resultados corroboran datos previos obtenidos en un estudio serológico, en el que se observó que los sujetos que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2 generan anticuerpos IgG3 tras la primera dosis de la vacuna,³⁶⁰ que sin

embargo son indetectables en individuos que han pasado la COVID-19, sugiriendo el posible papel de los anticuerpos IgG3 en el control temprano de la infección, ante el primer contacto con el virus. Además, en nuestra serie, las CP producidas en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 y circulantes en sangre mostraban un perfil fenotípico dominado por CP relativamente más maduras CD138⁺, especialmente sobre todo en los sujetos sin LBM que habían pasado previamente la COVID-19. Cabe destacar que, en estos últimos sujetos encontramos niveles claramente inferiores respecto a los que no habían tenido contacto previo con el virus de prácticamente todas las subpoblaciones de CP tras la administración de la segunda dosis, siendo este descenso más pronunciado a los 30 días después completar ambas dosis de la vacuna. Este hallazgo podría deberse a un desplazamiento desde sangre a médula ósea de las CP, una vez completada la respuesta inmune a la vacunación en los sujetos que ya habían tenido un contacto con el virus de forma previa a la vacunación.

De manera similar a lo descrito previamente en la bibliografía, comprobamos que los niveles plasmáticos de anticuerpos de isotipos IgG e IgA específicos frente a la proteína S seguían una cinética diferente en función de la exposición previa al SARS-CoV-2,^{357–359,362–364} paralela a la descrita para las CP. Así, observamos que en sujetos sin LBM que habían pasado previamente la COVID-19, los niveles máximos de anticuerpos IgG e IgA específicos se alcanzaban antes y eran más elevados, tras la primera dosis de la vacuna, en comparación con los sujetos que no habían tenido contacto previo con SARS-CoV-2. Además, los anticuerpos específicos de isotipo IgA empezaban a disminuir a los 30 días tras la administración de la segunda dosis, mientras que los anticuerpos IgG se mantenían elevados durante más tiempo.^{358,359} La aparente discrepancia entre el aumento de los niveles plasmáticos de los anticuerpos IgA específicos frente la proteína S y la ausencia de cambios en el número de CP IgA⁺ en sangre tras la vacunación, podría reflejar que un número bajo de CP IgA⁺ específicas de antígeno son suficientes para producir un aumento significativo de los niveles de anticuerpos frente a IgA, o bien podría explicarse porque las CP IgA⁺ recién generadas en respuesta a la vacuna se encuentran preferentemente en la médula ósea y/o en las mucosas, sin producirse un pico detectable en sangre.

Una vez establecida la cinética de las distintas poblaciones de células inmunitarias y de los niveles de anticuerpos específicos frente a la proteína S en sujetos sanos sin LBM,

profundizamos en el análisis de las posibles alteraciones presentes en los sujetos con LBM^{lo} en respuesta a la vacunación frente al SARS-CoV-2, tomando como referencia los perfiles anteriormente descritos en los sujetos sin LBM. En términos generales, la distribución de las distintas poblaciones de leucocitos era muy similar en ambos grupos de individuos con y sin LBM^{lo}. Sin embargo, en los primeros observamos un menor número de linfocitos B en sangre inmediatamente antes de la administración de la segunda dosis de la vacuna, al igual que hemos descrito anteriormente en el estudio transversal de las poblaciones del sistema inmune llevado a cabo en esta tesis doctoral, para los pacientes COVID-19 con LBM^{lo}, que frente a pacientes sin LBM tenían niveles más bajos de linfocitos B una vez pasada la COVID-19. De acuerdo con estos resultados, comprobamos también que el número de CP circulantes era significativamente más elevado en sujetos con LBM^{lo}, después de la administración de las dos dosis de la vacuna, hallazgo que sugiere que, al igual que ocurre en la COVID-19, la respuesta de CP frente a la vacunación es más tardía en los sujetos portadores de pequeños clones linfoides B circulantes. Desafortunadamente, no hemos podido analizar de forma más estrecha (en el tiempo) estos parámetros de modo a poder confirmar esta hipótesis, debido al número limitado de muestras disponibles de sujetos con LBM^{lo}. Cabe señalar que las diferencias existentes en la respuesta a la vacunación entre ambos grupos de sujetos con y sin LBM^{lo}, se deben a las diferencias específicas entre los sujetos de ambos grupos que no habían tenido contacto previo con el SARS-CoV-2, mientras que en aquellos que habían pasado la COVID-19 (es decir, que habían generado memoria inmunológica frente a SARS-CoV-2) estas diferencias se diluían y desaparecían. En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que los sujetos que presentan LBM^{lo} se verían beneficiados de disponer de memoria inmunológica a la hora de responder de forma más eficiente a una nueva infección por SARS-CoV-2. En cuanto a la respuesta humoral, observamos que los sujetos con LBM^{lo} alcanzaron unos títulos de anticuerpos en plasma similares a los detectados en los sujetos sin LBM, lo que supone una diferencia respecto a lo descrito por otros autores en pacientes con LBM^{hi} y LLC, en los que se observa una menor una cantidad de anticuerpos frente a la vacunación contra SARS-CoV-2 respecto a los controles sanos.^{379,385} No obstante, una limitación de este trabajo radica en que no aportamos información sobre la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados en los sujetos con LBM^{lo}, la cual podría verse afectada también en las etapas tempranas del espectro

LBM-LLC. Pese a lo anteriormente expuesto, el análisis de la cinética de los niveles de anticuerpos frente a la proteína S en respuesta a la vacunación de los individuos que previamente no habían estado expuestos a SARS-CoV-2, reveló que los sujetos con LBM^{lo} tardaban más tiempo en alcanzar el pico máximo de los niveles de anticuerpos IgG e IgA en plasma, respecto a los sujetos que no presentaban LBM, que se situaba en el día +10 vs. día +7 tras la administración de la segunda dosis de la vacuna, respectivamente. Además, observamos un perfil similar para los niveles de IgA en plasma en los sujetos que habían pasado previamente la COVID-19, consistente con una respuesta más tardía en los sujetos con LBM^{lo} vs. aquellos que no presentaban LBM, aunque esta diferencia solo era visible tras la primera dosis de la vacuna. En conjunto, estos resultados confirman que en sujetos con LBM^{lo} vacunados frente a SARS-CoV-2 existe una alteración de la respuesta inmune, y particularmente, de la respuesta humoral, consistente, entre otras anomalías, en un retraso en la producción de anticuerpos. Como era de esperar, este déficit no resulta tan evidente como el previamente descrito en pacientes con LBM^{hi} y LLC, dado que en términos de niveles de anticuerpos en plasma en los sujetos con LBM^{lo} la vacunación logra una respuesta completamente eficaz, ya que, aunque existe un retraso en la respuesta humoral, esta finalmente logra generar niveles similares de anticuerpos en plasma al de los sujetos sanos que no tienen LBM. Por tanto, nuestros resultados apuntan a que los sujetos con LBM^{lo} se verían beneficiados de la protección conferida por las (dos dosis de las) vacunas frente al SARS-CoV-2, y en consecuencia, sería recomendable que se vacunaran frente a este virus, y muy probablemente también frente a otros (como el virus de la gripe), con la finalidad de reducir el riesgo de padecer infecciones graves.

A modo de resumen, podríamos concluir que hemos confirmado que la cinética en sangre de las células del sistema inmune y de los anticuerpos específicos anti-S en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 difieren en función de la existencia o no de exposición previa al virus. En este sentido, en los sujetos sin LBM que han pasado la COVID-19 muestran una respuesta humoral, evaluada tanto por los cambios inducidos por la vacunación en las CP circulantes como en los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos del virus, más temprana y pronunciada que la observada en los vacunados que no habían tenido contacto previo con el virus. Por su parte, los individuos con LBM^{lo} sometidos a vacunación frente a SARS-CoV-2 muestran una respuesta alterada con rasgos similares a lo observado en pacientes COVID-19

con LBM^{lo}, dependientes sobre todo de una respuesta alterada de los linfocitos B y de las CP, que resultan un retraso en alcanzar los niveles máximos de anticuerpos tras la vacunación.

CONCLUSIONES

En relación con el primer objetivo de este trabajo doctoral, centrado en determinar la prevalencia de LBM^{lo} en pacientes con COVID-19, y evaluar el posible impacto de la LBM^{lo} en el comportamiento clínico, la gravedad y evolución de la infección por SARS-CoV-2:

1. La prevalencia de LBM^{lo} es significativamente superior en pacientes con COVID-19 hospitalizados, respecto a la frecuencia observada en la población general de la misma área geográfica, lo que apoyaría la asociación de la LBM^{lo} con una respuesta inmune alterada y, probablemente deficitaria, frente a SARS-CoV-2.
2. Los pacientes con COVID-19 y LBM^{lo} presentan una serie de manifestaciones clínicas y biológicas características de un curso clínico más grave de la infección, lo que se traduce en una mayor gravedad global de la COVID-19, respecto a la observada en sujetos que no tienen LBM. Estos hallazgos apoyarían la existencia de la asociación descrita previamente entre la LBM^{lo} y una mayor gravedad de las infecciones que padecen estos sujetos.
3. Los títulos de anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N de SARS-CoV-2 producidos durante la infección en pacientes con LBM^{lo} alcanzan niveles más elevados durante la fase aguda de la COVID-19, hallazgo que se asocia también con una mayor gravedad de la enfermedad y podría reflejar la mayor necesidad de anticuerpos para eliminar la carga viral incrementada en las formas más graves de la infección.
4. La LBM^{lo} constituye un nuevo biomarcador con valor independiente a la hora de predecir el riesgo de hospitalización por COVID-19 grave, sobre todo cuando se combina con otros parámetros como la presencia de disnea y fiebre al ingreso, el sexo masculino, un descenso más acentuado en sangre de los granulocitos eosinófilos, linfocitos B y células NK, y el incremento del número de granulocitos neutrófilos y de los niveles de anticuerpos de isotipo IgA específicos de la proteína N del virus.

En relación con el segundo objetivo, dirigido a conocer la cinética en sangre de pacientes con LBM^{lo} de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune y de los niveles de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 a lo largo de la COVID-19, respecto a lo observado en sujetos infectados sin LBM:

5. Los pacientes con COVID-19 y LBM^{lo} presentan una cinética en sangre de las células del sistema inmune y de los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 alterada y que se asemeja a los perfiles característicos de una COVID-19 grave.
6. Las alteraciones presentes en los pacientes con COVID-19 y LBM^{lo} incluyen un aumento del número de granulocitos neutrófilos y CP circulantes en sangre (predominantemente a expensas de las CP más maduras de las subclases IgG1⁺, IgG3⁺ e IgA1⁺), junto con niveles significativamente descendidos de CDs, linfocitos T innatos y linfocitos B pre-CG, además de niveles plasmáticos muy elevados de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2. Este perfil cinético probablemente refleja un incremento en la producción de células innatas mieloides junto a una migración aumentada de estas células a los tejidos infectados y órganos linfoides secundarios, respectivamente.
7. Las alteraciones inmunológicas antes referidas son más acusadas y prolongadas en el tiempo en los pacientes con COVID-19 y LBM^{lo}, respecto a los pacientes infectados que no presentaban LBM, destacando especialmente en el primer grupo el descenso más marcado de CDs y linfocitos T innatos en sangre y el retraso en el pico de la respuesta de las CP, junto con unos niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 significativamente más elevados durante las primeras cuatro semanas, lo que se asocia además a mayor carga viral y formas más graves de la COVID-19. En su conjunto, estos hallazgos reflejan una respuesta inmune humoral retrasada y más intensa en pacientes con LBM^{lo}, como probable reflejo de la inmunodeficiencia inherente a estos sujetos.

En relación con el tercer objetivo del estudio, centrado en el análisis de los cambios que se producen en etapas tempranas de la respuesta inmune frente a la vacunación por SARS-CoV-2 en sujetos sin LBM y con LBM^{lo}:

8. El análisis de los cambios tempranos en la distribución en sangre de las diferentes poblaciones de células inmunitarias y en los títulos plasmáticos de anticuerpos específicos frente a la proteína S de SARS-CoV-2 en respuesta a la vacunación frente a SARS-CoV-2 en sujetos sanos sin LBM, ha revelado diferencias en la respuesta humoral en función del estado de exposición previa al virus, consistentes en una respuesta más rápida y pronunciada en aquellos sujetos que habían pasado previamente la COVID-19, lo que probablemente refleja el estado de inmunización previa asociado a la presencia de células de memoria específicas del virus.

9. Los sujetos con LBM^{lo}, y en especial aquellos que no han tenido contacto previo con el virus, muestran algunas alteraciones en sangre en la respuesta celular a la vacunación frente a SARS-CoV-2, entre las que destaca un menor número de linfocitos B, junto a niveles más elevados de CP, observados tras la administración de la vacuna. Además, los sujetos con LBM^{lo} vacunados frente al SARS-CoV-2 tardan más tiempo en alcanzar los niveles máximos en plasma de anticuerpos específicos del virus, comparado con los sujetos sin LBM. En su conjunto, estos hallazgos apoyan la existencia de una respuesta humoral alterada en la LBM^{lo}, que sin embargo no les impide alcanzar títulos de anticuerpos, y probablemente una protección, frente a SARS-CoV-2 similares a los de los sujetos sanos sin LBM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br. J. Haematol.* 2005; **130**: 325–32.
- 2 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. IARC: Lyon (Francia), 2017.
- 3 Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022; **36**: 1720–48.
- 4 Marti GE, Muller J, Stetler-Stevenson M, Caporaso N. B-cell monoclonal lymphocytosis in three individuals living near a hazardous waste site. 1997.
- 5 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: WHO Classification of Tumours. IARC: Lyon (Francia), 2008.
- 6 Maitre E, Troussard X. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2019; **32**: 229–38.
- 7 Galigalidou C, Zaragoza-Infante L, Iatrou A, Chatzidimitriou A, Stamatopoulos K, Agathangelidis A. Understanding Monoclonal B Cell Lymphocytosis: An Interplay of Genetic and Microenvironmental Factors. *Front. Oncol.* 2021; **11**: 769612.
- 8 Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; **26**: 1908–75.
- 9 Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 2094–103.
- 10 Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, *et al.* Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 2010; **78**: S19–23.
- 11 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; **111**: 5446–56.
- 12 Rossi D, Sozzi E, Puma A, *et al.* The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 2009; **146**: 64–75.
- 13 Rawstron AC, Bennett F, Hillmen P. The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2007; **139**: 724–9.

- 14 Rawstron AC, Shingles J, De Tute R, Bennett F, Jack AS, Hillmen P. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and CLL-type monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) show differential expression of molecules involved in lymphoid tissue homing. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010; **78B**: S42–6.
- 15 Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, *et al.* Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2018; **94**: 121–8.
- 16 Xochelli A, Kalpadakis C, Gardiner A, *et al.* Clonal B-cell lymphocytosis exhibiting immunophenotypic features consistent with a marginal-zone origin: Is this a distinct entity? *Blood* 2014; **123**: 1199–206.
- 17 Xochelli A, Oscier D, Stamatopoulos K. Clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin. *Best Pract Res Clin Haematol* 2017; **30**: 77–83.
- 18 Nieto WG, Teodosio C, López A, *et al.* Non-CLL-like monoclonal B-Cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010; **78**: S24–34.
- 19 Amato D, Oscier DG, Davis Z, *et al.* Cytogenetic aberrations and immunoglobulin VH gene mutations in clinically benign CD5- monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Clin Pathol* 2007; **128**: 333–8.
- 20 Sarasua SM, Vogt RF, Middleton DC, Slade BA, Mcgeehin MA, Lybarger JA. 'CLL-LIKE' B-CELL PHENOTYPES DETECTED IN SUPERFUND STUDIES: EPIDEMIOLOGIC METHODS AND FINDINGS. 1997.
- 21 Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, *et al.* Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of 'indolent' chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002; **100**: 635–9.
- 22 Yağcı M, Yegin ZA, Yenicesu İ, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors in Turkey. *Hematology* 2018; **23**: 25–9.
- 23 de Faria-Moss M, Yamamoto M, Arrais-Rodrigues C, *et al.* High frequency of chronic lymphocytic leukemia-like low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in Japanese descendants living in Brazil. *Haematologica* 2020; **105**: e298–301.
- 24 Slager SL, Parikh SA, Achenbach SJ, *et al.* Progression and survival of MBL: a screening study of 10 139 individuals. *Blood* 2022; **140**: 1702–9.
- 25 Ghia P, Prato G, Scielzo C, *et al.* Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood* 2004; **103**: 2337–42.
- 26 Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol* 2007; **139**: 832–6.

- 27 Nieto WG, Almeida J, Romero A, *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–7.
- 28 Dagklis A, Fazi C, Sala C, *et al.* The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* 2009; **114**: 26–32.
- 29 Shim YK, Rachel JM, Ghia P, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in healthy blood donors: an unexpectedly common finding. *Blood* 2014; **123**: 1319–26.
- 30 Bajuk P, Furlan T, Černelč P, Čeh M, Podgornik H. Monoclonal B-cell lymphocytosis in the population of Slovenian region of Lower Carniola. *Int J Lab Hematol* 2016; **38**: 341–6.
- 31 Aljurf M, Rawas F, Alnounou R, *et al.* Prevalence and relative proportions of CLL and non-CLL monoclonal B-cell lymphocytosis phenotypes in the Middle Eastern population. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017; **10**: 42–3.
- 32 Rawstron AC, Ssemaganda A, de Tute R, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in a hospital-based UK population and a rural Ugandan population: a cross-sectional study. *Lancet Haematol* 2017; **4**: e334–40.
- 33 Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; **47**: 1477–80.
- 34 Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **104**: 169–82.
- 35 Chihara D, Ito H, Matsuda T, *et al.* Differences in incidence and trends of haematological malignancies in Japan and the United States. *Br J Haematol* 2014; **164**: 536–45.
- 36 Yang S, Varghese AM, Sood N, *et al.* Ethnic and geographic diversity of chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2021; **35**: 433–9.
- 37 Xu J, Li J, Wei Z, Wang Y, Liu P. Screening for monoclonal B-lymphocyte expansion in a hospital-based Chinese population with lymphocytosis: an observational cohort study. *BMJ Open* 2020; **10**: e036006.
- 38 Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; **94**: 647–53.
- 39 Slager SL, Caporaso NE, De Sanjose S, Goldin LR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2013; **50**: 296–302.
- 40 Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, *et al.* Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002; **100**: 2289–91.

- 41 Marti GE, Carter P, Abbasi F, *et al.* B-Cell Monoclonal Lymphocytosis and B-Cell Abnormalities in the Setting of familial B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2003; **52**: 1–12.
- 42 Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, *et al.* Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol* 2010; **151**: 152–8.
- 43 Demirci T, Yeğin ZA, Kurşunoğlu N, *et al.* Prevalence of Monoclonal B Lymphocytosis in First-Degree Relatives of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients in Turkey. *Turkish J Hematol* 2013; **32**: 29–34.
- 44 Kassem S, Fouda M, Akef A, *et al.* A higher frequency of monoclonal B cell lymphocytosis among Egyptian relatives of CLL patients. *Leuk Lymphoma* 2020; **61**: 2242–5.
- 45 Slager SL, Lanasa MC, Marti GE, *et al.* Natural history of monoclonal B-cell lymphocytosis among relatives in CLL families. *Blood* 2021; **137**: 2046–56.
- 46 Matos DM, Ismael SJ, Scrideli CA, De Oliveira FM, Rego EM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in first-degree relatives of patients with sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; **147**: 339–46.
- 47 Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, *et al.* Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 2010; **116**: 5957–60.
- 48 Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, *et al.* Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 2011; **117**: 1911–6.
- 49 Kleinstern G, Weinberg JB, Parikh SA, *et al.* Polygenic risk score and risk of monoclonal B-cell lymphocytosis in caucasians and risk of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in African Americans. *Leukemia* 2022; **36**: 119–25.
- 50 Landgren O, Maher A, Wanlong M, *et al.* B-Cell Clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 659–67.
- 51 Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, *et al.* Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2008; **359**: 575–83.
- 52 Foster AE, Nguyen TDT, Al-Hammadi N, Frater JL, Hassan A, Kreisel F. Clinical presentation, progression, and outcome of patients with Clonal B-cell counts of less than $5 \times 10^9/L$, 5 to $10 \times 10^9/L$, and more than $10 \times 10^9/L$ and chronic lymphocytic leukemia immunophenotype. *Am J Clin Pathol* 2015; **143**: 70–7.
- 53 Molica S, Mauro FR, Giannarelli D, *et al.* Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome on behalf of the GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Haematologica* 2011; **96**: 277–83.

- 54 Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2008; **359**: 2065–6.
- 55 Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, *et al.* General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* 2011; **118**: 6618–25.
- 56 Criado I, Rodríguez-Caballero A, Gutiérrez ML, *et al.* Low-count monoclonal B-cell lymphocytosis persists after seven years of follow up and is associated with a poorer outcome. *Haematologica* 2018; **103**: 1198–208.
- 57 Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, *et al.* B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood* 2009; **113**: 4188–96.
- 58 Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, *et al.* Brief report: Natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 3959–63.
- 59 Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* 2015; **126**: 454–62.
- 60 Kern W, Bacher U, Haferlach C, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol* 2012; **157**: 86–96.
- 61 Fung SS, Hillier KL, Leger CS, *et al.* Clinical progression and outcome of patients with monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 2007; **48**: 1087–91.
- 62 Parikh SA, Chaffee KG, Larson MC, *et al.* Outcomes of a large cohort of individuals with clinically ascertained high-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2018; **103**: e237-40.
- 63 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, *et al.* Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–6.
- 64 Aoun P, Blair HE, Smith LM, *et al.* Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 1595–603.
- 65 Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, *et al.* The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): The CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol* 2016; **173**: 105–13.
- 66 Nadeu F, Diaz-Navarro A, Delgado J, Puente XS, Campo E. Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2020; **15**: 149–77.

- 67 Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL, *et al.* Immunophenotypic and gene expression analysis of monoclonal B-cell lymphocytosis shows biologic characteristics associated with good prognosis CLL. *Leukemia* 2011; **25**: 1459–66.
- 68 Henriques A, Rodríguez-Caballero A, Nieto WG, *et al.* Combined Patterns of IGHV Repertoire and Cytogenetic/Molecular Alterations in Monoclonal B Lymphocytosis versus Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One* 2013; **8**: 1–10.
- 69 Shim YK, Vogt RF, Middleton D, *et al.* Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2007; **72**: 344–53.
- 70 Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219–35.
- 71 Morabito F, Mosca L, Cutrona G, *et al.* Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 5890–900.
- 72 Vardi A, Dagklis A, Scarfo L, *et al.* Immunogenetics shows that not all MBL are equal: The larger the clone, the more similar to CLL. *Blood* 2013; **121**: 4521–8.
- 73 Agathangelidis A, Galigalidou C, Scarfò L, *et al.* Infrequent “chronic lymphocytic leukemia-specific” immunoglobulin stereotypes in aged individuals with or without low-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2021; **106**: 1178–81.
- 74 Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, *et al.* Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; **200**: 519–25.
- 75 Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017; **31**: 282–91.
- 76 Gerousi M, Laidou S, Gemenetzi K, Stamatopoulos K, Chatzidimitriou A. Distinctive Signaling Profiles With Distinct Biological and Clinical Implications in Aggressive CLL Subsets With Stereotyped B-Cell Receptor Immunoglobulin. *Front Oncol* 2021; **11**: 1–7.
- 77 Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1515–25.
- 78 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; **131**: 2745–60.
- 79 Rasi S, Monti S, Spina V, Foà R, Gaidano G, Rossi D. Analysis of NOTCH1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2012; **97**: 153–4.
- 80 Greco M, Capello D, Brusca A, *et al.* Analysis of SF3B1 mutations in monoclonal B-

- cell lymphocytosis. *Hematol Oncol* 2013; **31**: 54–5.
- 81 Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, *et al*. Genomic Characterization of High-Count MBL Cases Indicates that Early Detection of Driver Mutations and Subclonal Expansion are Predictors of Adverse Clinical Outcome. *Leukemia* 2017; **31**: 170–6.
- 82 Agathangelidis A, Ljungström V, Scarfò L, *et al*. Highly similar genomic landscapes in monoclonal b-cell lymphocytosis and ultra-stable chronic lymphocytic leukemia with low frequency of driver mutations. *Haematologica* 2018; **103**: 865–73.
- 83 Morrison V. Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: Pathogenesis, spectrum of infection, and approaches to prophylaxis. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; **9**: 365–70.
- 84 Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 2015; **126**: 573–81.
- 85 Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, *et al*. Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): A cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia* 2013; **27**: 136–41.
- 86 Solomon BM, Rabe KG, Slager SL, Brewer JD, Cerhan JR, Shanafelt TD. Overall and cancer-specific survival of patients with breast, colon, kidney, and lung cancers with and without chronic lymphocytic leukemia: A SEER population-based study. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 930–7.
- 87 Shanafelt TD, Kay NE, Parikh SA, *et al*. Risk of serious infection among individuals with and without low count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Leukemia* 2021; **35**: 239–44.
- 88 Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, *et al*. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol* 2012; **87**: 721–4.
- 89 Criado I, Blanco E, Rodríguez-Caballero A, *et al*. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2018; **32**: 2701–5.
- 90 Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, *et al*. Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset Ranges in the General Population Defined with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL Subjects. *Cancers (Basel)* 2022; **15**: 58.
- 91 Casabonne D, Almeida J, Nieto WG, *et al*. Common Infectious Agents and Monoclonal B-Cell Lymphocytosis: A Cross-Sectional Epidemiological Study among Healthy Adults. *PLoS One* 2012; **7**: 1–8.
- 92 Fazi C, Dagklis A, Cottini F, *et al*. Monoclonal B cell lymphocytosis in hepatitis C virus

- infected individuals. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010; **78**: 61–8.
- 93 Boddicker NJ, Achenbach SJ, Parikh SA, *et al.* Associations of history of vaccination and hospitalization due to infection with risk of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia* 2022; **36**: 1404–7.
- 94 Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Deaglio S, Vitale N, Vaisitti T. Immune response dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: Dissecting molecular mechanisms and microenvironmental conditions. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–22.
- 95 Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, *et al.* Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer* 2015; **121**: 2883–91.
- 96 Andersen MA, Vojdeman FJ, Andersen MK, *et al.* Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk Lymphoma* 2016; **57**: 1592–9.
- 97 Criado I, Muñoz-Criado S, Rodríguez-Caballero A, *et al.* Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: Implications for disease progression. *Haematologica* 2017; **102**: 1238–46.
- 98 Ishdorj G, Streu E, Lambert P, *et al.* IgA levels at diagnosis predict for infections, time to treatment, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv* 2019; **3**: 2188–98.
- 99 Singh N, Mott SL, Sutamtewagul G, *et al.* Prevalence and the impact of hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic lymphoma patients. *eJHaem* 2020; **1**: 537–44.
- 100 Tsai HT, Caporaso NE, Kyle RA, *et al.* Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: A prospective study. *Blood* 2009; **114**: 4928–32.
- 101 Glancy E, Siles R. Monoclonal B-cell lymphocytosis and hypogammaglobulinaemia. *Br J Haematol* 2016; **173**: 316–7.
- 102 Lanasa MC, Weinberg JB. Immunologic aspects of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Immunol Res* 2011; **49**: 269–80.
- 103 Palma M, Gentilcore G, Heimersson K, *et al.* T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica* 2017; **102**: 562–72.
- 104 Roessner PM, Seiffert M. T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease? *Leukemia* 2020; **34**: 2012–24.
- 105 Vlachonikola E, Stamatopoulos K, Chatzidimitriou A. T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Two-Edged Sword. *Front Immunol* 2021; **11**: 1–11.

- 106 D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, *et al.* Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res* 2011; **35**: 363–8.
- 107 Bozorgmehr N, Okoye I, Oyegbami O, *et al.* Expanded antigen-experienced CD160+CD8+effector T cells exhibit impaired effector functions in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunother Cancer* 2021; **9**: 1–17.
- 108 Riches JC, Davies JK, McClanahan F, *et al.* T cells from CLLpatients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013; **121**: 1612–21.
- 109 Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2427–37.
- 110 Vardi A, Vlachonikola E, Karypidou M, *et al.* Restrictions in the T-cell repertoire of chronic lymphocytic leukemia: High-throughput immunoprofiling supports selection by shared antigenic elements. *Leukemia* 2017; **31**: 1555–61.
- 111 Lanasa MC, Allgood SD, Bond KM, Gockerman JP, Levesque MC, Weinberg JB. Oligoclonal TRBV gene usage among CD8+ T cells in monoclonal B lymphocytosis and CLL. *Br J Haematol* 2009; **145**: 535–7.
- 112 Blanco G, Vardi A, Puiggros A, *et al.* Restricted T cell receptor repertoire in CLL-like monoclonal B cell lymphocytosis and early stage CLL. *Oncoimmunology* 2018; **7**: 1–9.
- 113 Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8 +double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol* 2007; **139**: 780–90.
- 114 Agathangelidis A, Galigalidou C, Scarfò L, *et al.* High-throughput analysis of the T-cell receptor gene repertoire in low-count monoclonal B-cell lymphocytosis reveals a distinct profile from chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2020; **105**: e517.
- 115 Zhu N, Zhang D, Wang W, *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; **382**: 727–33.
- 116 Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; **579**: 270–3.
- 117 Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; **579**: 265–9.
- 118 Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; **5**: 536–44.
- 119 World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 22. 2020.
- 120 Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus

- Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **323**: 1239–42.
- 121 Wjst M, Wendtner C. High variability of COVID-19 case fatality rate in Germany. *BMC Public Health* 2023; **23**: 1–7.
- 122 World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 51. 2020.
- 123 World Health Organization. WHO COVID-19 Dashboard. Geneva. 2020. <https://covid19.who.int/> (accessed Oct 22, 2023).
- 124 Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020; **586**: 516–27.
- 125 Klasse PJ, Nixon DF, Moore JP. Immunogenicity of clinically relevant SARS-CoV-2 vaccines in nonhuman primates and humans. *Sci Adv* 2021; **7**: 1–23.
- 126 World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 Variants. 2021. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (accessed Oct 27, 2023).
- 127 Mistry P, Barmania F, Mellet J, *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* 2022; **12**: 1–21.
- 128 Rabaan AA, Alenazy MF, Alshehri AA, *et al.* An updated review on pathogenic coronaviruses (CoVs) amid the emergence of SARS-CoV-2 variants: A Look into the repercussions and possible solutions. *J Infect Public Health* 2023; **16**: 1870–83.
- 129 World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. 2022. [https://www.who.int/es/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/es/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (accessed Oct 22, 2023).
- 130 Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021; **19**: 141–54.
- 131 Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* 2021; **184**: 1671–92.
- 132 Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021; **184**: 861–80.
- 133 Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science* 2022; **375**: 1122–7.
- 134 Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 363–74.
- 135 Carpenter CR, Mudd PA, West CP, Wilber E, Wilber ST. Diagnosing COVID-19 in the

- Emergency Department: A Scoping Review of Clinical Examinations, Laboratory Tests, Imaging Accuracy, and Biases. *Acad Emerg Med* 2020; **27**: 653–70.
- 136 Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 2020; **9**: 221–36.
- 137 Lu R, Zhao X, Li J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; **395**: 565–74.
- 138 Lam TTY, Jia N, Zhang YW, *et al.* Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 2020; **583**: 282–5.
- 139 Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020; **181**: 281–92.
- 140 Wrapp D, Wang N, Corbett KS, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; **367**: 1260–3.
- 141 Shang J, Ye G, Shi K, *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 2020; **581**: 221–4.
- 142 Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; **367**: 1444–8.
- 143 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**: 562–9.
- 144 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; **181**: 271–80.
- 145 Ou X, Liu Y, Lei X, *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 2020; **11**: 1–12.
- 146 Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015; **202**: 120–34.
- 147 Sungnak W, Huang N, Bécavin C, *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 2020; **26**: 681–7.
- 148 Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, *et al.* SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells . *EMBO J* 2020; **39**: 1–15.
- 149 Liu L, Wang P, Nair MS, *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 2020; **584**: 450–6.
- 150 Ju B, Zhang Q, Ge J, *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* 2020; **584**: 115–9.

- 151 Wang C, Li W, Drabek D, *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 2020; **11**: 1–6.
- 152 Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2021; **19**: 685–700.
- 153 Sahu AK, Sreepadmanabh M, Rai M, Chande A. SARS-CoV-2: phylogenetic origins, pathogenesis, modes of transmission, and the potential role of nanotechnology. *VirusDisease* 2021; **32**: 1–12.
- 154 Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol* 2020; **27**: 1202–8.
- 155 Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; **69**: 635–64.
- 156 Nieto-Torres JL, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 2015; **485**: 330–9.
- 157 Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res* 2020; **51**: 482–91.
- 158 Fu YZ, Wang SY, Zheng ZQ, *et al.* SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. *Cell Mol Immunol* 2021; **18**: 613–20.
- 159 Sui L, Zhao Y, Wang W, *et al.* SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–10.
- 160 Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022; **23**: 165–76.
- 161 Amrun SN, Lee CYP, Lee B, *et al.* Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine* 2020; **58**: 102911–9.
- 162 Yang R, Gui X, Xiong Y. Comparison of Clinical Characteristics of Patients with Asymptomatic vs Symptomatic Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Netw Open* 2020; **3**: 16–9.
- 163 Lu X, Zhang L, Du H, *et al.* SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1663–5.
- 164 Guan W, Ni Z, Hu Y, *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1708–20.
- 165 Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, *et al.* Occurrence and transmission

- potential of asymptomatic and presymptomatic SARSCoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2020; **17**: 1–25.
- 166 Zhang W, Cheng W, Luo L, *et al.* Secondary transmission of coronavirus disease from presymptomatic persons, China. *Emerg Infect Dis* 2020; **26**: 1924–6.
- 167 Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **324**: 782–93.
- 168 Wang D, Hu B, Hu C, *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **323**: 1061–9.
- 169 Li J, Huang DQ, Zou B, *et al.* Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol* 2021; **93**: 1449–58.
- 170 Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020; **75**: 1730–41.
- 171 Docherty AB, Harrison EM, Green CA, *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: Prospective observational cohort study. *BMJ* 2020; **369**: 1–12.
- 172 Zhou F, Yu T, Du R, *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; **395**: 1054–62.
- 173 Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes among 5700 Patients Hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **323**: 2052–9.
- 174 Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, *et al.* The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med* 2020; **172**: 577–82.
- 175 Pan L, Mu M, Yang P, *et al.* Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: A descriptive, cross-sectional, multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2020; **115**: 766–73.
- 176 Mao R, Qiu Y, He JS, *et al.* Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; **5**: 667–78.
- 177 Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, *et al.* Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional

- Study. *Clin Infect Dis* 2020; **71**: 888–9.
- 178 Aziz M, Goyal H, Haghbin H, Lee-Smith WM, Gajendran M, Perisetti A. The Association of “Loss of Smell” to COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Med Sci* 2021; **361**: 216–25.
- 179 Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, *et al.* Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2020; **277**: 2251–61.
- 180 Mao L, Jin H, Wang M, *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 2020; **77**: 683–90.
- 181 Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol* 2020; **5**: 831–40.
- 182 Helms J, Tacquard C, Severac F, *et al.* High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med* 2020; **46**: 1089–98.
- 183 Gottlieb M, Long B. Dermatologic manifestations and complications of COVID-19. *Am J Emerg Med* 2020; **38**: 1715–21.
- 184 Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, *et al.* COVID-19 and coagulation: Bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood* 2020; **136**: 489–500.
- 185 Zaim S, Chong JH, Sankaranarayanan V, Harky A. COVID-19 and Multiorgan Response. *Curr Probl Cardiol* 2020; **45**: 1–21.
- 186 Gao Y dong, Ding M, Dong X, *et al.* Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2021; **76**: 428–55.
- 187 Zhang J jin, Dong X, Liu G hui, Gao Y dong. Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023; **64**: 90–107.
- 188 Zhang J jin, Cao Y yuan, Tan G, *et al.* Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2021; **76**: 533–50.
- 189 Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 2020; **584**: 430–6.
- 190 Wu JT, Leung K, Bushman M, *et al.* Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat Med* 2020; **26**: 506–10.
- 191 Pijls BG, Jolani S, Atherley A, *et al.* Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: A meta-analysis of 59 studies. *BMJ Open* 2021; **11**: 1–10.

- 192 Du H, Dong X, Zhang J jin, *et al.* Clinical characteristics of 182 pediatric COVID-19 patients with different severities and allergic status. *Allergy* 2020; **76**: 510–32.
- 193 Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**: 507–13.
- 194 Witkowski JM. Immune system aging and the aging-related diseases in the COVID-19 era. 2022; **243**: 19–27.
- 195 Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 2020; **369**: 718–24.
- 196 Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020; **181**: 1036–45.
- 197 Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* 2020; **26**: 1636–43.
- 198 Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, *et al.* Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun* 2020; **11**: 1–10.
- 199 Gal-Oz ST, Maier B, Yoshida H, *et al.* ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nat Commun* 2019; **10**: 1–14.
- 200 Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 626–38.
- 201 Reddy RK, Charles WN, Sklavounos A, Dutt A, Seed PT, Khajuria A. The effect of smoking on COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2021; **93**: 1045–56.
- 202 Lippi G, Henry BM. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): COPD and COVID-19. *Respir Med* 2020; **167**: 1–2.
- 203 Li B, Yang J, Zhao F, *et al.* Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. *Clin Res Cardiol* 2020; **109**: 531–8.
- 204 Li X, Xu S, Yu M, *et al.* Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **146**: 110–8.
- 205 Gao C, Cai Y, Zhang K, *et al.* Association of hypertension and antihypertensive treatment with COVID-19 mortality: a retrospective observational study. *Eur Heart J* 2020; **41**: 2058–66.
- 206 Bae SA, Kim SR, Kim MN, Shim WJ, Park SM. Impact of cardiovascular disease and risk factors on fatal outcomes in patients with COVID-19 according to age: A systematic review and meta-analysis. *Heart* 2021; **107**: 373–80.

- 207 Sattar N, McInnes IB, McMurray JJV. Obesity Is a Risk Factor for Severe COVID-19 Infection: Multiple Potential Mechanisms. *Circulation* 2020; **142**: 4–6.
- 208 Vizcarra P, Pérez-Elías MJ, Quereda C, *et al.* Description of COVID-19 in HIV-infected individuals: a single-centre, prospective cohort. *Lancet HIV* 2020; **7**: e554-64.
- 209 Zhang Q, Liu Z, Moncada-Velez M, *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020; **370**: 1–13.
- 210 Rajpal A, Rahimi L, Ismail-Beigi F. Factors leading to high morbidity and mortality of COVID-19 in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes* 2020; **12**: 895–908.
- 211 Liang W, Guan W, Chen R, *et al.* Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *Lancet Oncol* 2020; **21**: 335–7.
- 212 Tian J, Yuan X, Xiao J, *et al.* Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol* 2020; **21**: 893–903.
- 213 Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **146**: 89–100.
- 214 Rodriguez L, Pekkarinen PT, Lakshmikanth T, *et al.* Systems-Level Immunomonitoring from Acute to Recovery Phase of Severe COVID-19. *Cell Reports Med* 2020; **1**: 1–12.
- 215 Boechat JL, Chora I, Morais A, Delgado L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. *Pulmonology* 2021; **27**: 423–37.
- 216 Liu Y, Du X, Chen J, *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect* 2020; **81**: e6–12.
- 217 Amgalan A, Othman M. Hemostatic laboratory derangements in COVID-19 with a focus on platelet count. *Platelets* 2020; **31**: 740–5.
- 218 Lippi G, Plebani M, Michael B. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020; **506**: 145–8.
- 219 Bergamaschi G, Borrelli de Andreis F, Aronico N, *et al.* Anemia in patients with Covid-19: pathogenesis and clinical significance. *Clin Exp Med* 2021; **21**: 239–46.
- 220 Yao Y, Cao J, Wang Q, *et al.* D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: A case control study. *J Intensive Care* 2020; **8**: 1–11.
- 221 Bao J, Li C, Zhang K, Kang H, Chen W, Gu B. Comparative analysis of laboratory indexes of severe and non-severe patients infected with COVID-19. *Clin Chim Acta* 2020; **509**: 180–94.
- 222 Yan L, Zhang HT, Goncalves J, *et al.* An interpretable mortality prediction model for COVID-19 patients. *Nat Mach Intell* 2020; **2**: 283–8.

- 223 Azkur AK, Akdis M, Azkur D, *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020; **75**: 1564–81.
- 224 Sokolowska M, Lukasik ZM, Agache I, *et al.* Immunology of COVID-19: Mechanisms, clinical outcome, diagnostics, and perspectives—A report of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020; **75**: 2445–76.
- 225 Streicher F, Jouvenet N. Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. *Trends Immunol* 2019; **40**: 1134–48.
- 226 Ribero MS, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog* 2020; **16**: 1–22.
- 227 Madden EA, Diamond MS. Host cell-intrinsic innate immune recognition of SARS-CoV-2. *Curr Opin Virol* 2022; **52**: 30–8.
- 228 Coro ES, Chang WLW, Baumgarth N. Type I IFN Receptor Signals Directly Stimulate Local B Cells Early following Influenza Virus Infection. *J Immunol* 2006; **176**: 4343–51.
- 229 Durbin RK, Kotenko S V., Durbin JE. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev* 2013; **255**: 25–39.
- 230 Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 231–42.
- 231 Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2016; **38**: 471–82.
- 232 Lucas C, Wong P, Klein J, *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 2020; **584**: 463–9.
- 233 Xia H, Cao Z, Xie X, *et al.* Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* 2020; **33**: 1–12.
- 234 Chua RL, Lukassen S, Trump S, *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol* 2020; **38**: 970–9.
- 235 Liao M, Liu Y, Yuan J, *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; **26**: 842–4.
- 236 Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol* 2020; **5**: 1–15.
- 237 Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res* 2014; **59**: 118–28.

- 238 Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol Rev* 2022; **310**: 27–46.
- 239 Guo L, Wang G, Wang Y, *et al.* SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *The Lancet Microbe* 2022; **3**: e348–56.
- 240 Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022; **23**: 186–93.
- 241 Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, *et al.* Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Reports Med* 2021; **2**: 1–14.
- 242 Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**: 1–8.
- 243 Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4+ T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 1–13.
- 244 Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytom Part A* 2019; **95**: 647–54.
- 245 Braun J, Loyal L, Frentsch M, *et al.* SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* 2020; **587**: 270–4.
- 246 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.
- 247 King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 757–66.
- 248 Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 2009; **10**: 385–93.
- 249 Juno JA, Tan HX, Lee WS, *et al.* Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; **26**: 1428–34.
- 250 Boppana S, Qin K, Files JK, *et al.* SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathog* 2021; **17**: 1–18.
- 251 Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, *et al.* Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell* 2020; **183**: 1340–53.
- 252 Parrot T, J.-B. G, A. P, *et al.* MAIT cell activation and dynamics associated with COVID-19 disease severity. *Sci Immunol* 2020; **5**: 1–14.

- 253 Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 31–8.
- 254 Poccia F, Agrati C, Castilletti C, *et al.* Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: The role played by V γ 9V δ 2 T cells. *J Infect Dis* 2006; **193**: 1244–9.
- 255 Wu Z, Zheng Y, Sheng J, *et al.* CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol* 2022; **13**: 1–14.
- 256 Rijkers G, Vervenne T, van der Pol P. More bricks in the wall against SARS-CoV-2 infection: involvement of $\gamma\delta$ 2 T cells. *Cell Mol Immunol* 2020; **17**: 771–2.
- 257 Odak I, Barros-Martins J, Bošnjak B, *et al.* Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. *EBioMedicine* 2020; **57**: 1–8.
- 258 Laidlaw BJ, Ellebedy AH. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. *Nat Rev Immunol* 2022; **22**: 7–18.
- 259 Röltgen K, Boyd SD. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Host Microbe* 2021; **29**: 1063–75.
- 260 Sokal A, Chappert P, Barba-Spaeth G, *et al.* Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell* 2021; **184**: 1201–13.
- 261 Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 2016; **45**: 471–82.
- 262 Kräutler NJ, Suan D, Butt D, *et al.* Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *J Exp Med* 2017; **214**: 1259–67.
- 263 Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: Antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**: 46–61.
- 264 Yu Y, Wang M, Zhang X, *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther* 2021; **6**: 1–10.
- 265 Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, *et al.* Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 2021; **591**: 639–44.
- 266 Isho B, Abe KT, Zuo M, *et al.* Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020; **5**: 1–21.
- 267 Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol* 2020; **5**: 1–15.
- 268 Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, *et al.* Different Innate and Adaptive Immune Responses to SARS-CoV-2 Infection of Asymptomatic, Mild, and Severe Cases. *Front Immunol* 2020; **11**: 1–16.

- 269 Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, *et al.* Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2021; **6**: 1–18.
- 270 de Campos-Mata L, Tejedor Vaquero S, Tachó-Piñot R, *et al.* SARS-CoV-2 sculpts the immune system to induce sustained virus-specific naïve-like and memory B-cell responses. *Clin Transl Immunol* 2021; **10**: 1–21.
- 271 Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, *et al.* Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature* 2021; **591**: 92–8.
- 272 Bastard P, Gervais A, Voyer T Le, *et al.* Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol* 2021; **6**: 1–26.
- 273 Tian S, Xiong Y, Liu H, *et al.* Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol* 2020; **33**: 1007–14.
- 274 Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 2021; **51**: 1–21.
- 275 Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol* 2020; **108**: 17–41.
- 276 Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, *et al.* Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell* 2021; **184**: 149-168.e17.
- 277 Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* 2020; **182**: 1401–18.
- 278 Veras F, Pontelli M, Silva C, *et al.* SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps (NETs) mediate. *J Exp Med* 2020; **217**.
- 279 Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, *et al.* Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med* 2020; **217**: 1–11.
- 280 Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020; **191**: 145–7.
- 281 Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, *et al.* Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 2020; **182**: 1419–40.
- 282 Zhou R, To KKW, Wong YC, *et al.* Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity* 2020; **53**: 864–77.
- 283 Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, *et al.* Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 2020; **369**:

- 1210–20.
- 284 Remy KE, Mazer M, Striker DA, *et al.* Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight* 2020; **5**: 1–15.
- 285 Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; **395**: 1033–4.
- 286 Chen G, Wu D, Guo W, *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020; **130**: 2620–9.
- 287 Qin C, Zhou L, Hu Z, *et al.* Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; **71**: 762–8.
- 288 Laing AG, Lorenc A, del Molino del Barrio I, *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* 2020; **26**: 1623–35.
- 289 Mathew D, Giles JR, Baxter AE, *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* 2020; **369**.
- 290 Xu Z, Shi L, Wang Y, *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2020 Feb 25;:]. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X. *Lancet Respir Med* 2020; **8**: 420–2.
- 291 Diao B, Wang C, Tan Y, *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* 2020; **11**: 1–7.
- 292 Zheng M, Gao Y, Wang G, *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020; **17**: 533–5.
- 293 Zheng HY, Zhang M, Yang CX, *et al.* Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020; **17**: 541–3.
- 294 Long QX, Liu BZ, Deng HJ, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; **26**: 845–8.
- 295 Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 2020; **584**: 437–42.
- 296 Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, *et al.* Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol* 2020; **5**: 1–20.
- 297 Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, *et al.* Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell* 2020; **183**: 143-157.e13.
- 298 DeWolf S, Laracy JC, Perales MA, Kamboj M, van den Brink MRM, Vardhana S. SARS-CoV-2 in immunocompromised individuals. *Immunity* 2022; **55**: 1779–98.

- 299 He W, Chen L, Chen L, *et al.* COVID-19 in persons with haematological cancers. *Leukemia* 2020; **34**: 1637–45.
- 300 Scarfò L, Chatzikonstantinou T, Rigolin GM, *et al.* COVID-19 severity and mortality in patients with chronic lymphocytic leukemia: a joint study by ERIC, the European Research Initiative on CLL, and CLL Campus. *Leukemia* 2020; **34**: 2354–63.
- 301 Robilotti E V., Babady NE, Mead PA, *et al.* Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nat Med* 2020; **26**: 1218–23.
- 302 Jee J, Foote MB, Lumish M, *et al.* Chemotherapy and COVID-19 Outcomes in Patients with Cancer. *J Clin Oncol* 2020; **38**: 3538–46.
- 303 Lee LYW, Cazier JB, Angelis V, *et al.* COVID-19 mortality in patients with cancer on chemotherapy or other anticancer treatments: A prospective cohort study. *Lancet* 2020; **395**: 1919–26.
- 304 Avouac J, Drumez E, Hachulla E, *et al.* COVID-19 outcomes in patients with inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases treated with rituximab: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2021; **3**: e419–26.
- 305 Florence A, Nassim AA, Jean-David A, *et al.* Severity of COVID-19 and survival in patients with rheumatic and inflammatory diseases: Data from the French RMD COVID-19 cohort of 694 patients. *Ann Rheum Dis* 2021; **80**: 527–38.
- 306 Fernandez-Ruiz R, Paredes JL, Niewold TB. COVID-19 in patients with systemic lupus erythematosus: lessons learned from the inflammatory disease. *Transl Res* 2021; **232**: 13–36.
- 307 Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, *et al.* Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 2208–19.
- 308 Botafogo V, Pérez-Andres M, Jara-Acevedo M, *et al.* Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4+ T Cells in Human Blood Using a Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol* 2020; **11**: 1–16.
- 309 Van Der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, *et al.* The EuroFlow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–11.
- 310 Sun S, Cai X, Wang H, *et al.* Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. *Clin Chim Acta* 2020; **507**: 174–80.
- 311 Li J, Zhang K, Zhang ye, Gu Z, Huang C. Neutrophils in COVID-19: recent insights and advances. *Virology* 2023; **20**: 1–8.
- 312 Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, *et al.* Longitudinal analysis reveals that delayed

- bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity* 2021; **54**: 1257-1275.e8.
- 313 Matic S, Popovic S, Djurdjevic P, *et al.* SARS-CoV-2 infection induces mixed M1/M2 phenotype in circulating monocytes and alterations in both dendritic cell and monocyte subsets. *PLoS One* 2020; **15**: 1–17.
- 314 Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 529–36.
- 315 Shuwa HA, Shaw TN, Knight SB, *et al.* Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med* 2021; **2**: 720–35.
- 316 Wen W, Su W, Tang H, *et al.* Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov* 2020; **6**: 1–18.
- 317 Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, *et al.* Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol* 2020; **21**: 1506–16.
- 318 Doi H, Tanoue S, Kaplan DE. Peripheral CD27-CD21- B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis. *Clin Immunol* 2014; **150**: 184–91.
- 319 Weiss GE, Crompton PD, Li S, *et al.* Atypical Memory B Cells Are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-Endemic Area. *J Immunol* 2009; **183**: 2176–82.
- 320 Lundgren A, Leach S, Axelsson H, *et al.* Plasmablasts in previously immunologically naïve COVID-19 patients express markers indicating mucosal homing and secrete antibodies cross-reacting with SARS-CoV-2 variants and other beta-coronaviruses. *Clin Exp Immunol* 2023; **213**: 173–89.
- 321 Caraux A, Klein B, Paiva B, *et al.* Circulating human b and plasma cells. age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica* 2010; **95**: 1016–20.
- 322 Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, *et al.* Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Reports Med* 2020; **1**: 100040.
- 323 Ryan FJ, Hope CM, Masavuli MG, *et al.* Long-term perturbation of the peripheral immune system months after SARS-CoV-2 infection. *BMC Med* 2022; **20**: 1–23.
- 324 Files JK, Boppana S, Perez MD, *et al.* Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection. *J Clin Invest* 2021; **131**: 1–11.
- 325 Liu J, Yang X, Wang H, *et al.* Analysis of the Long-Term Impact on Cellular Immunity in COVID-19-Recovered Individuals Reveals a Profound NKT Cell Impairment Jia. *MBio* 2021; **12**: 1–14.
- 326 Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, *et al.* Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci*

- Immunol* 2020; **5**: 1–15.
- 327 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**. DOI:10.1126/science.abf4063.
- 328 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**: 1–13.
- 329 Chen Y, Tong X, Li Y, *et al.* A comprehensive, longitudinal analysis of humoral responses specific to four recombinant antigens of SARS-CoV-2 in severe and non-severe COVID-19 patients. *PLoS Pathog* 2020; **16**: 1–16.
- 330 Lee Y-L, Liao C-H, Liu P-Y, *et al.* Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J Infect* 2020; **81**: E55-58.
- 331 Zhang B, Yue D, Wang Y, Wang F, Wu S, Hou H. The dynamics of immune response in COVID-19 patients with different illness severity. *J Med Virol* 2021; **93**: 1070–7.
- 332 Zhu L, Xu X, Zhu B, *et al.* Kinetics of SARS-CoV-2 Specific and Neutralizing Antibodies over Seven Months after Symptom Onset in COVID-19 Patients. *Microbiol Spectr* 2021; **9**. DOI:10.1128/spectrum.00590-21.
- 333 Marot S, Malet I, Leducq V, *et al.* Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–7.
- 334 Xiang T, Liang B, Fang Y, *et al.* Declining Levels of Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 in Convalescent COVID-19 Patients One Year Post Symptom Onset. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–10.
- 335 Zeng F, Wu M, Wang J, Li J, Hu G, Wang L. Over 1-year duration and age difference of SARS-CoV-2 antibodies in convalescent COVID-19 patients. *J Med Virol* 2021; **93**: 6506–11.
- 336 Yang Y, Yang M, Peng Y, *et al.* Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection. *Nat Microbiol* 2022; **7**: 423–33.
- 337 Xu K, Dai L, Gao GF. Humoral and cellular immunity and the safety of COVID-19 vaccines: A summary of data published by 21 May 2021. *Int Immunol* 2021; **33**: 529–40.
- 338 World Health Organization. Draft Landscape of COVID-19 Candidate Vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed Oct 17, 2023).
- 339 Liu Q, Qin C, Liu M, Liu J. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty* 2021; **10**: 1–15.
- 340 Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, *et al.* Prevention and Attenuation of Covid-19 with the BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines. *N Engl J Med* 2021; **385**: 320–9.

- 341 Wang H, Zhang Y, Huang B, *et al.* Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell* 2020; **182**: 713-721.e9.
- 342 Ella R, Vadrevu KM, Jogdand H, *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 637–46.
- 343 Guebre-Xabier M, Patel N, Tian JH, *et al.* NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge. *Vaccine* 2020; **38**: 7892–6.
- 344 van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* 2020; **586**: 578–82.
- 345 Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 2020; **586**: 583–8.
- 346 Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, *et al.* Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2439–50.
- 347 Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2603–15.
- 348 Baden LR, El Sahly HM, Essink B, *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; **384**: 403–16.
- 349 Ulmer JB, Mason PW, Geall A, Mandl CW. RNA-based vaccines. *Vaccine* 2012; **30**: 4414–8.
- 350 Logunov DY, Dolzhikova I V., Zubkova O V., *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020; **396**: 887–97.
- 351 Xia S, Zhang Y, Wang Y, *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 39–51.
- 352 Barda N, Dagan N, Cohen C, *et al.* Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *Lancet* 2021; **398**: 2093–100.
- 353 Haggenburg S, Hofsink Q, Lissenberg-Witte BI, *et al.* Antibody Response in Immunocompromised Patients with Hematologic Cancers Who Received a 3-Dose mRNA-1273 Vaccination Schedule for COVID-19. *JAMA Oncol* 2022; **8**: 1477–83.
- 354 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.
- 355 Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, *et al.* Humoral and cellular immune memory to four

- COVID-19 vaccines. *Cell* 2022; **185**: 2434-2451.e17.
- 356 Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, *et al.* Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021; **27**: 1205–11.
- 357 Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* 2021; **596**: 109–13.
- 358 Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, *et al.* Distinct antibody and memory B cell responses in SARSCoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol* 2021; **6**: 1–19.
- 359 Kardava L, Rachmaninoff N, Lau WW, *et al.* Early human B cell signatures of the primary antibody response to mRNA vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; **119**: 1–11.
- 360 Tejedor Vaquero S, de Campos-Mata L, Ramada JM, *et al.* The mRNA-1273 Vaccine Induces Cross-Variant Antibody Responses to SARS-CoV-2 With Distinct Profiles in Individuals With or Without Pre-Existing Immunity. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–9.
- 361 Farkash I, Feferman T, Cohen-Saban N, *et al.* Anti-SARS-CoV-2 antibodies elicited by COVID-19 mRNA vaccine exhibit a unique glycosylation pattern. *Cell Rep* 2021; **37**: 110114.
- 362 Tarkowski M, de Jager W, Schiuma M, *et al.* Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin Isotypes, and Neutralization Activity Against Viral Variants, According to BNT162b2-Vaccination and Infection History. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–12.
- 363 Desmecht S, Tashkeev A, El Moussaoui M, *et al.* Kinetics and Persistence of the Cellular and Humoral Immune Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine in SARS-CoV-2-Naive and -Experienced Subjects: Impact of Booster Dose and Breakthrough Infections. *Front Immunol* 2022; **13**: 1–11.
- 364 Angyal A, Longuet S, Moore SC, *et al.* T-cell and antibody responses to first BNT162b2 vaccine dose in previously infected and SARS-CoV-2-naive UK health-care workers: a multicentre prospective cohort study. *The Lancet Microbe* 2022; **3**: e21–31.
- 365 Kim W, Zhou JQ, Horvath SC, *et al.* Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature* 2022; **604**: 141–5.
- 366 Chivu-Economescu M, Bleotu C, Grancea C, *et al.* Kinetics and persistence of cellular and humoral immune responses to SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers with or without prior COVID-19. *J Cell Molecular Med* 2022; **26**: 1293–305.
- 367 Collier AY, Yu J, McMahan K, *et al.* Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines. *N Engl J Med* 2021; **385**: 2008–10.
- 368 Barouch DH, Stephenson KE, Sadoff J, *et al.* Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COVS2.S Vaccination. *N Engl J Med* 2021; **385**.

- 369 Salvagno GL, Pighi L, Henry BM, De Nitto S, Plebani M, Lippi G. Early kinetics of cellular immunity in recipients of bivalent BNT162b2 vaccine: a proof-of-concept study. *Clin Chem Lab Med* 2023; **61**: E172–4.
- 370 Painter MM, Mathew D, Goel RR, *et al.* Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity* 2021; **54**: 2133-2142.e3.
- 371 Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, *et al.* COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 2020; **586**: 594–9.
- 372 Li C, Lee A, Grigoryan L, *et al.* Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. *Nat Immunol* 2022; **23**: 543–55.
- 373 Li Z, Xiang T, Liang B, *et al.* Characterization of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immune Responses Induced by Inactivated COVID-19 Vaccines in a Real-World Setting. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–12.
- 374 Painter MM, Johnston TS, Lundgreen KA, *et al.* Prior vaccination promotes early activation of memory T cells and enhances immune responses during SARS-CoV-2 breakthrough infection. *Nat Immunol* 2023; **24**: 1711–24.
- 375 Ciabattini A, Pastore G, Fiorino F, *et al.* Evidence of SARS-CoV-2-Specific Memory B Cells Six Months After Vaccination With the BNT162b2 mRNA Vaccine. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–11.
- 376 Almendro-Vázquez P, Chivite-Lacaba M, Utrero-Rico A, *et al.* Cellular and humoral immune responses and breakthrough infections after three SARS-CoV-2 mRNA vaccine doses. *Front Immunol* 2022; **13**: 1–11.
- 377 Mato AR, Roeker LE, Lamanna N, *et al.* Outcomes of COVID-19 in patients with CLL: a multicenter international experience. *Blood* 2020; **136**: 1134–43.
- 378 Parry H, McIlroy G, Bruton R, *et al.* Antibody responses after first and second Covid-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Cancer J* 2021; **11**: 4–11.
- 379 Shen Y, Freeman JA, Holland J, *et al.* COVID-19 vaccine failure in chronic lymphocytic leukaemia and monoclonal B-lymphocytosis; humoral and cellular immunity. *Br J Haematol* 2022; **197**: 41–51.
- 380 Sorcini D, De Falco F, Gargaro M, *et al.* Immune correlates of protection by vaccine against SARS-CoV-2 in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2023; **201**: 45–57.
- 381 Mellinghoff SC, Robrecht S, Mayer L, *et al.* SARS-CoV-2 specific cellular response following COVID-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2022; **36**: 562–5.

- 382 Herishanu Y, Avivi I, Aharon A, *et al.* Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2021; **137**: 3165–73.
- 383 Erika Haydu J, Maron JS, Redd RA, *et al.* Humoral and cellular immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccines in chronic lymphocytic leukemia: a prospective cohort study. *Blood Adv* 2022; **6**: 1671–83.
- 384 Herishanu Y, Avivi I, Levi S, *et al.* Six-month antibody persistence after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv* 2022; **6**: 148–51.
- 385 Shen Y, Freeman JA, Holland J, *et al.* Multiple COVID-19 vaccine doses in CLL and MBL improve immune responses with progressive and high seroconversion. *Blood* 2022; **140**: 2709–21.
- 386 Kilic G, Bulut O, Jaeger M, *et al.* The Immunological Factors Predisposing to Severe Covid-19 Are Already Present in Healthy Elderly and Men. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–11.
- 387 Parikh SA, Achenbach SJ, Rabe KG, *et al.* The risk of coronavirus disease 2019 (COVID-19) among individuals with monoclonal B cell lymphocytosis. *Blood Cancer J* 2022; **12**: 8–10.
- 388 Matos DM, Furtado FM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis in individuals from sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukemia families persists over time, but does not progress to chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; **37**: 292–5.
- 389 Dobaño C, Santano R, Jiménez A, *et al.* Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res* 2021; **232**: 60–74.
- 390 Rak A, Donina S, Zabrodskaya Y, Rudenko L, Isakova-Sivak I. Cross-Reactivity of SARS-CoV-2 Nucleocapsid-Binding Antibodies and Its Implication for COVID-19 Serology Tests. *Viruses* 2022; **14**: 1–11.
- 391 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.
- 392 Schulien I, Kemming J, Oberhardt V, *et al.* Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. *Nat Med* 2021; **27**: 78–85.
- 393 Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, *et al.* mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* 2021; **592**: 616–22.
- 394 Menni C, Klaser K, May A, *et al.* Vaccine side-effects and SARS-CoV-2 infection after vaccination in users of the COVID Symptom Study app in the UK: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 939–49.

- 395 Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; **17**: 261–79.
- 396 Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2005; **6**: 895–901.

ANEXO I

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

ARTÍCULO 1

“Elevada frecuencia de linfocitosis B monoclonal de bajo recuento en pacientes hospitalizados por COVID-19”

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 12).

Blood, 19 de enero de 2023; 141 (3): 309–314.
DOI: 10.1182/blood.2022017439
PMID: 36399707
PMCID: PMC9906370

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Title: *High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients.*

Authors: Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Cristina Carbonell, Quentin Lecrevisse, Alba Pérez-Pons, Alba Torres-Valle, Julio Pozo, José-Ángel Martín-Oterino, Óscar González-López, Amparo López-Bernús, Marta Bernal-Ribes, Moncef Belhassen-García, Oihane Pérez-Escorza, Martín Pérez-Andrés, Lourdes Vazquez, Guillermo Hernández- Pérez, Francisco Javier García Palomo, Pilar Leoz, Pilar Costa-Alba, Elena Pérez-Losada, Ana Yeguas, Miryam Santos Sánchez, Marta García-Blázquez, F. Javier Morán-Plata, Daniela Damasceno, Vitor Botafogo, Noemí Muñoz-García, Rafael Fluxa, Teresa Contreras-Sanfeliciano, Julia Almeida, Miguel Marcos, Alberto Orfao

SUPPLEMENTARY METHODS

Patients, controls, and samples. We studied a total of 249 COVID-19 patients (133 men and 116 women; median age of 60 years (range: 18—99 years)) that were attended at the University Hospital of Salamanca between April 2020 and April 2021. Criteria for inclusion were: age ≥ 18 years, suspected COVID-19 by clinical, laboratory and radiological features, and confirmation of the presence of SARS-CoV-2 by RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) in a nasopharyngeal swab, and/or a positive serology for anti-nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2 IgM and/or IgG antibodies in patients who had not received anti-SARS-CoV-2 vaccination when a PCR-assay was not available. Overall, 206/249 (83%) COVID-19 patients were diagnosed by RT-PCR, while 43/249 (17%) were diagnosed based on a positive serology for anti-N SARS-CoV-2 IgM and/or IgG antibodies in the acute and/or the early recovery phase of infection. Exclusion criteria included: presence of active neoplastic disease or hematologic malignancy, confirmed or suspected acute infection other than COVID-19, and an expected survival of < 24 hours. All patients were classified based on disease severity as¹: i) asymptomatic/paucisymptomatic patients who did not require admission to the hospital (n=19); ii) patients who had mild symptomatic disease and did not require admission to the hospital (n=95); iii) patients who were hospitalized with symptoms of moderate disease requiring no or low-flow oxygen therapy (n=54); iv) patients with severe disease due to respiratory failure or other organ dysfunction, as determined by a Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score > 2 , who received per protocol tocilizumab and/or intravenous corticosteroids (n=50); and v) patients with critical disease who required mechanical ventilation, admission to an intensive care unit (ICU) and/or died because of COVID-19 (n=31). Comparisons of major clinical and laboratory characteristics between COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR and COVID-19

patients diagnosed by a positive serology are detailed in Supplementary Tables 1 and 2, respectively. A total of 728 healthy controls (333 men and 395 women; median age 61 years (range: 25—97 years) recruited from the same geographical area before the SARS-CoV-2 pandemic were also included in the study.

All patient data and samples included in the study were obtained after the patient (or their relatives, in case of disability due to illness) had given his/her consent to participate in the study, according to the Declaration of Helsinki and the Spanish law for Biomedical Research. The study and blood sample collection were approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca / IBSAL (approval code: PI 2020 03 468).

Immunophenotypic studies. A total of 508 peripheral blood (PB) samples were collected from the 249 patients, out of which 353 samples were collected during the active phase of COVID-19 and 155 were collected after recovery from infection (median: 60 days; range: 15—366 days). Peripheral blood (PB) samples (30mL) were collected in K3-EDTA Vacutainer tubes -Becton/Dickinson Biosciences (BD), San José, CA- and stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) and Immune monitoring (IMM) BIgH tube, using the EuroFlow bulk-lyse-stain-and-then-fix standard operating procedure.² Briefly, non-nucleated red blood cells were lysed with an ammonium chloride solution and washed twice in phosphate buffered saline (PBS; pH=7.4). Then, $>10^7$ white blood cells were stained with the LST reagent (BD OneFlow LSTTM reagent, BD) and the IMM-BIgH antibody combinations (Supplementary Table 3) for 30 minutes. Subsequently, cells were fixed and, in case of the IMM-BIgH tube, stained with cytoplasmic antibodies using the Fix & Perm Reagent Kit (Nordic-MUBio, Susteren, The Netherlands). For each antibody combination, ≥ 10 million cells/tube were measured for each sample, either in a FACSCanto II (BD) or a FACSLyric (BD) flow cytometer for LST, and an LSRFortessa X-20 (BD) or a FACSymphony (BD) instrument for the IMM-IgH tube. For data analysis, the Automated Gating and Identification (AGI) tool of the INFINICYT software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used in combination with the EuroFlow LST and IMM-BIgH data bases.³ For the identification of MBL clones, the presence of ≥ 20 clustered cell events with an aberrant -e.g. CD5⁺ CD20^{lo} surface membrane immunoglobulin (smIg)^{lo} -and/or clonal (e.g. smIg κ ⁺ or smIg λ ⁺)- immunophenotype, was required.⁴

Measurement of SARS-CoV-2 antibodies in plasma. Assays to determine the levels in plasma of antibodies against both the Nucleocapsid (N) and the Spike (S) SARS-CoV-2 proteins were performed in a total of 493 samples (343 samples collected during active infection and 150 obtained after recovery). (Semi)quantitative

determination of immunoglobulin (IgM, IgG, and IgA plasma levels against both proteins of SARS-CoV-2 was performed using commercially available ELISA assays (AnshLab, Webster, TX for IgM and Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany for IgG and IgA anti-N protein antibodies, and Thermo Fisher, Waltham, MA for IgM, and ImmunoStep S.L., Salamanca, Spain for IgG and IgA anti-S protein antibodies).

Statistical methods. The Mann-Whitney U test (for continuous variables) or the Chi-square and Fisher exact tests (for categorical variables) were applied to assess the statistical significance of differences between groups. To avoid associations occurring by chance due to multiple simultaneous comparisons, p-values were Bonferroni-adjusted for comparisons of those variables with multiple categories. A multivariate regression model (binary logistic regression) was used to assess the independent contribution of MBL^{lo} to the risk of hospitalization for COVID-19, comparing mild outpatients vs. patients admitted to hospital for COVID-19, using the IBM-SPSS Statistical software package (v26.0, IBM, Armonk, NY). Comorbidity variables were grouped in single categories to avoid confusion due to small sample size. Relevant variables that influenced the need for hospitalization in the univariate analysis (P-value ≤ 0.05) were subjected to further selection (Supplementary Table 12) using a forward stepwise logistic procedure. Those variables showing statistical significance in the univariate analysis but whose data was available in $<70\%$ of cases, and those variables that could incur into confusion due to collinearity (e.g., within lymphocyte subpopulations) were excluded from the multivariate analysis. ROC curves were used for determining the best cut-off values for continuous variables. The model obtained was confirmed by means of a non-stepwise analysis to check for confusion. Statistical significance was set at P-values ≤ 0.05 .

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Marcos M, Belhassen-García M, Sánchez-Puente A, *et al.* Development of a severity of disease score and classification model by machine learning for hospitalized COVID-19 patients. *PLoS One* 2021; **16**: e0240200.
2. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 2094–103.
3. Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, *et al.* EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods* 2019; **475**: 112662.
4. Nieto WG, Almeida J, Romero A, *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–7.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR vs. COVID-19 patients diagnosed by positive serology.

	COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR (n=206)	COVID-19 patients diagnosed by serology (n=43)	P-value
Age (years)*	61 ± 20; 62 (45 – 79)	57 ± 21; 55 (41 – 77)	0.19
Sex (male/female)	115 / 91 (56% / 44%)	18 / 25 (42% / 58%)	0.10
Comorbidities			
Presence of any comorbidity	116/206 (56%)	18/43 (42%)	0.08
Hypertension	71/206 (35%)	11/43 (26%)	0.26
Obesity	39/206 (19%)	2/43 (5%)	0.02
Immunosuppressive therapy / AI disease	21/206 (10%)	2/43 (5%)	0.24
Cardiovascular disease	37/206 (18%)	3/43 (7%)	0.07
Chronic pulmonary disease	26/206 (13%)	3/43 (7%)	0.29
Diabetes	32/206 (16%)	2/43 (5%)	0.06
Cancer (non-active)	22/206 (11%)	1/43 (2%)	0.09
Chronic kidney disease	15/206 (7%)	2/43 (5%)	0.53
Updated Charlson comorbidity index			
0	132/206 (69%)	31/39 (80%)	
1	23/206 (12%)	5/39 (13%)	
2	25/206 (13%)	2/39 (5%)	
3	6/206 (3%)	1/39 (3%)	0.77 [#]
4	3/206 (2%)	0/39 (0%)	
5	1/206 (1%)	0/39 (0%)	
6	1/206 (1%)	0/39 (0%)	
Clinical manifestations			
Symptomatic disease	193/206 (94%)	39/43 (93%)	0.51
Fever	134/206 (65%)	26/43 (61%)	0.57
Cough	124/205 (61%)	25/43 (58%)	0.78
Fatigue	122/198 (62%)	25/41 (61%)	0.94
Dyspnea	110/200 (55%)	21/41 (51%)	0.66
Myalgia	70/198 (35%)	12/41 (29%)	0.46
Headache	70/198 (35%)	13/41 (31%)	0.66
Diarrhea	68/206 (33%)	12/43 (28%)	0.52
Anosmia and/or ageusia	53/198 (27%)	11/41 (27%)	0.99
Nasal congestion / rhinorrhea	30/162 (18%)	3/29 (10%)	0.28
Sore throat / odynophagia	31/198 (16%)	9/41 (22%)	0.33
Nausea and/or vomiting	30/205 (15%)	6/43 (14%)	0.91
Hospitalization			
Days of hospitalization**	11 (6 – 20)	12 (5 – 19)	0.66
Severity of the disease			
Asymptomatic / paucisymptomatic	13/206 (6%)	6/43 (14%)	
Mild	74/206 (36%)	21/43 (49%)	
Moderate	48/206 (23%)	6/43 (14%)	0.13 [#]
Severe	44/206 (21%)	6/43 (14%)	
Very severe / critically ill	27/206 (13%)	4/43 (9%)	
Treatment			
Treated patients (any drug treatment)	132/204 (65%)	23/43 (54%)	0.17
Oxygen therapy	83/166 (50%)	18/40 (45%)	0.57
Aggressive pharmacological treatment ¹	47/200 (24%)	10/43 (23%)	0.97
ICU support	20/206 (10%)	2/43 (5%)	0.39
Outcome			
Deaths (directly related to COVID-19)	5/206 (2%)	1/43 (2%)	0.86

Results expressed as number of cases (percentage), or *as mean ± one standard deviation (SD) and median (IQR), or **as median (IQR) of days from admission until either discharged from hospital or death. Statistically significant p-values (≤ 0.05 or [#]Bonferroni-adjusted p-values) are highlighted in bold. ¹Anti-interleukin receptor drugs and/or i.v. corticosteroids.

Abbreviations (alphabetical order): AI, autoimmune; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; i.v., intravenous; SD, standard deviation; y, years.

Supplementary Table 2. Laboratory characteristics of COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR vs. COVID-19 patients diagnosed by positive serology.

<i>Biological parameters (Reference range)</i>	COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR (n=206)	COVID-19 patients diagnosed by serology (n=43)	P-value
Blood cell counts			
Hemoglobin (12 – 18 g/dL)	14 (12 – 15)	14 (13 – 16)	0.15
Leukocyte count (4.5 – 10x10 ⁹ /L)	6.9 (5.1 – 11)	7.6 (5 – 9.3)	0.90
Lymphocyte count (1.2 – 3.5x10 ⁹ /L)	1.04 (0.76 – 1.5)	0.96 (0.93 – 1.51)	0.75
Platelet count (150 – 450x10 ⁹ /L)	190 (148 – 244)	181 (131 – 230)	0.49
Coagulation markers			
Prothrombin time (0.79 – 1.2 INR)	1.1 (1 – 1.19)	1.1 (1.05 – 1.28)	0.31
APTT (27 – 40 seconds)	33 (29 – 35)	34 (31 – 64)	0.20
D-dimer (0 – 1 µg/L)	0.6 (0.3 – 1.3)	1.1 (0.6 – 4)	0.04
Fibrinogen (130 – 400 mg/dL)	523 (398 – 676)	542 (413 – 662)	0.70
Biochemical serum biomarkers			
Creatinine (0.5 – 0.9 mg/dL)	1 (0.83 – 1.28)	1.04 (0.83 – 1.29)	0.88
eGFR (> 90 mL/min/1.73m ²)	72 (52 – 88)	73 (46 – 89)	0.82
Total bilirubin (0.15 – 1.2 mg/dL)	0.51 (0.35 – 0.69)	0.53 (0.37 – 0.70)	0.75
ALT (0 – 33 U/L)	23 (15 – 43)	33 (19 – 47)	0.30
AST (0 – 32 U/L)	33 (23 – 47)	43 (30 – 49)	0.24
GGT (0 – 40 U/L)	34 (21 – 63)	41 (26 – 83)	0.23
Alkaline phosphatase (40 – 129 U/L)	63 (50 – 84)	82 (60 – 98)	0.07
Ferritin (15 – 150 ng/mL)	802 (372 – 1424)	884 (676 – 1702)	0.30
LDH (135 – 214 U/L)	277 (218 – 368)	292 (242 – 391)	0.24
CRP (0 – 0.5 mg/dL)	5.5 (1.7 – 11)	7.9 (1.4 – 20)	0.51
IL6 (0 – 3.4 pg/mL)	11 (7 – 21)	22 (15 – 41)	0.10
Procalcitonin (0 – 0.5 ng/mL)	0.11 (0.07 – 0.31)	0.18 (0.05 – 0.58)	0.40
Total serum proteins (6.4 – 8.3 g/dL)	7.4 (6.9 – 7.8)	7.4 (7.1 – 7.8)	0.74
Albumin (3.5 – 5.5 g/dL)	3.8 (3.5 – 4.2)	3.7 (3.4 – 3.9)	0.40
IgM (40 – 230 mg/dL)	97 (70 – 128)	117 (87 – 166)	0.05
IgG (700 – 1600 mg/dL)	1045 (846 – 1215)	1010 (809 – 1160)	0.62
IgA (70 – 400 mg/dL)	233 (172 – 300)	215 (150 – 278)	0.41
Oxygenation parameters			
SpO ₂ /FiO ₂ ratio (> 445)	438 (336 – 457)	438 (336 – 452)	0.61

Results expressed as median values (IQR). Laboratory parameters collected at admission to the hospital or at emergency, during the acute phase of the disease. Statistically significant p-values (≤ 0.05) are highlighted in bold. Abbreviations (alphabetical order): ALT, alanine aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; CRP, C-reactive protein; FiO₂, fraction of inspired oxygen; eGFR, estimated glomerular filtration rate calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPD) equation; GGT, gammaglutamil transpeptidase; Ig, immunoglobulin; IL6, interleukin 6; INR, international normalized ratio; LDH, lactate dehydrogenase; SpO₂, arterial oxygen saturation measured by pulse-oximetry; y, years.

Supplementary Table 3. Combinations of fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometric identification of subsets of leucocytes and B cells in blood of each subject included in this study.

LST (EuroFlow® Lymphocyte Screening Tube) BD OneFlow LST™ 8-color tube used for the identification of the leucocyte populations in PB.

	Fluorochrome conjugate							
	V450	V500-C	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD20 +	CD45	CD8 +	CD56 +	CD5	CD19 +	CD3	CD38
	CD4		Anti-λ	Anti-κ		anti-TCRγδ		
Clone	L27 +	2D1	SK1 +	MY31 +	L17F12	SJ25-C1 +	SK7	HB7
	SK3		1-155-2	TB28-2		11F2		

EuroFlow® IMM BIgH 13-color tube used for the identification of different subsets of B cells in PB.

	Fluorochrome conjugate												
	BV421	BV510	BV605	BV650	BV711	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD27	sm/cyIgM	CD62L	CD24	CD21	CD19	sm/cyIgG3 +	sm/cyIgA1 +	sm/cyIgG1 +	CD20	CD138 +	sm/cyIgG4 +	CD38
							sm/cyIgG2 +	sm/cyIgA2	sm/cyIgG2		CD5	sm/cyIgA1 +	
							sm/cyIgD					sm/cyIgD	
Clone	M-T271	MHM-88	DREG56	ML5	B-ly4	SJ25C1	SAG3 +	SAA1 +	SAG1 +	2H7	MI15 +	SAA1 +	HB7
							SAG2 +	SAA2	SAG2		L17F12	SAG4 +	
							IA6-2					IA6-2	
Source	BD	Biologend	Biologend	BD	BD	BD	Cytognos Biologend	Cytognos	Cytognos	BD	Biologend BD	Cytognos BD	BD

Abbreviations (alphabetical order): APC: allophycocyanine; APC-H7: allophycocyanine-hilite®7; BD: Becton/Dickinson Biosciences; BV: brilliant violet; cy: cytoplasmic; FITC: fluorescein isothiocyanate; IMM, immune monitoring; PB, peripheral blood; PE: phycoerythrin; PE-CF594: phycoerythrin-carboxyfluorescein594; PECy7: phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5: peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5; sm: surface membrane.

Supplementary Table 4. Clinical characteristics of COVID-19 patients grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} in blood at referral to the hospital.

	Non-MBL patients (n=176)	MBL ^{lo} patients (n=73)	P-value
Age (years)*	56 ± 20; 55 (40 – 70)	72 ± 15; 74 (61 – 86)	<0.0001
Sex (male/female)	88 / 88 (50% / 50%)	45 / 28 (62% / 38%)	0.09
Comorbidities			
Presence of any comorbidity	83/176 (47%)	51/73 (70%)	0.001
Hypertension	44/176 (25%)	38/73 (52%)	<0.0001
Obesity	28/176 (16%)	13/73 (18%)	0.71
Immunosuppressive therapy / AI disease	15/173 (9%)	8/71 (11%)	0.53
Cardiovascular disease	18/176 (10%)	22/73 (30%)	<0.0001
Chronic pulmonary disease	19/176 (11%)	10/73 (14%)	0.52
Diabetes	20/176 (11%)	14/73 (19%)	0.10
Cancer (non-active)	11/176 (6%)	12/73 (16%)	0.01
Chronic kidney disease	12/176 (7%)	5/73 (7%)	1
Updated Charlson comorbidity index			
0	127/165 (77%)	36/65 (55%)	
1	19/165 (12%)	9/65 (14%)	
2	15/165 (9%)	12/65 (19%)	
3	3/165 (2%)	4/65 (6%)	0.003 [#]
4	0/165 (0%)	3/65 (5%)	
5	0/165 (0%)	1/65 (2%)	
6	1/165 (1%)	0/65 (0%)	
Clinical manifestations			
Symptomatic disease	162/176 (92%)	70/73 (96%)	0.41
Fever	114/176 (65%)	46/73 (63%)	0.79
Cough	107/175 (61%)	42/73 (58%)	0.60
Fatigue	111/171 (65%)	36/68 (53%)	0.09
Dyspnea	85/172 (49%)	46/69 (67%)	0.02
Myalgia	70/171 (41%)	12/68 (18%)	0.001
Headache	69/171 (40%)	14/68 (21%)	0.004
Diarrhea	63/176 (36%)	17/73 (23%)	0.05
Anosmia and/or ageusia	56/171 (33%)	8/68 (12%)	0.001
Nasal congestion / rhinorrhea	31/137 (23%)	2/54 (4%)	0.002
Sore throat / odynophagia	31/171 (18%)	8/68 (12%)	0.23
Nausea and/or vomiting	32/175 (18%)	4/73 (6%)	0.009
Hospitalization			
Days of hospitalization**	10 (5 – 19)	14 (7 – 24)	0.03
Severity of the disease			
Asymptomatic / paucisymptomatic	11/176 (6%)	8/73 (11%)	
Mild	84/176 (48%)	11/73 (15%)	
Moderate	32/176 (18%)	22/73 (30%)	<0.0001[#]
Severe	30/176 (17%)	20/73 (27%)	
Very severe / critically ill	11/176 (11%)	12/73 (16%)	
Treatment			
Treated patients (any drug treatment)	104/176 (59%)	51/71 (72%)	0.06
Oxygen therapy	56/142 (39%)	45/64 (70%)	<0.0001
Aggressive pharmacological treatment ¹	53/172 (31%)	30/69 (44%)	0.06
ICU support	11/176 (6%)	11/73 (15%)	0.02
Outcome			
Deaths (directly related to COVID-19)	4/132 (3%)	2/73 (3%)	0.95

Results expressed as number of cases (percentage), or *as mean ± one standard deviation (SD) and median (IQR), or **as median (IQR) of days from admission until either discharged from hospital or death. Statistically significant p-values or #Bonferroni-adjusted p-values (≤0.05) are highlighted in bold. ¹ Anti-interleukin receptors drugs and/or intravenous corticosteroids. Abbreviations (alphabetical order): AI, autoimmune; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SD, standard deviation.

Supplementary Table 5. Laboratory characteristics of COVID-19 patients grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} at referral to the hospital.

<i>Biological parameters (Reference range)</i>	Non-MBL patients (n=176)	MBL^{lo} patients (n=73)	P-value
Blood cell counts			
Hemoglobin (12 – 18 g/dL)	14 (12 – 15)	14 (12 – 15)	0.33
Leukocyte count (4.5 – 10x10 ⁹ /L)	6.9 (5 – 9.7)	7.1 (5.2 – 12)	0.25
Lymphocyte count (1.2 – 3.5x10 ⁹ /L)	1.07 (0.84 – 1.57)	0.96 (0.73 – 1.47)	0.25
Platelet count (150 – 450x10 ⁹ /L)	186 (145 – 232)	192 (153 – 256)	0.33
Coagulation markers			
Prothrombin time (0.79 – 1.2 INR)	1.09 (1 – 1.18)	1.06 (1.01 – 1.2)	0.96
APTT (27 – 40 seconds)	33 (30 – 35)	33 (29 – 36)	0.96
D-dimer (0 – 1 μ g/L)	0.6 (0.4 – 1.4)	0.7 (0.4 – 1.5)	0.95
Fibrinogen (130 – 400 mg/dL)	517 (354 – 615)	600 (438 – 744)	0.02
Biochemical serum biomarkers			
Creatinine (0.5 – 0.9 mg/dL)	0.94 (0.81 – 1.21)	1.05 (0.9 – 1.38)	0.02
eGFR (> 90 mL/min/1.73m ²)	75 (58 – 94)	69 (35 – 80)	0.02
Total bilirubin (0.15 – 1.2 mg/dL)	0.5 (0.34 – 0.65)	0.55 (0.37 – 0.84)	0.21
ALT (0 – 33 U//L)	23 (15 – 38)	28 (17 – 47)	0.34
AST (0 – 32 U/L)	33 (23 – 47)	33 (24 – 48)	0.86
GGT (0 – 40 U/L)	34 (21 – 59)	39 (22 – 85)	0.49
Alkaline phosphatase (40 – 129 U/L)	62 (52 – 80)	69 (51 – 97)	0.18
Ferritin (15 – 150 ng/mL)	769 (338 – 1665)	850 (466 – 1327)	0.96
LDH (135 – 214 U/L)	277 (223 – 369)	288 (221 – 369)	0.73
CRP (0 – 0.5 mg/dL)	4.4 (1.7 – 10.6)	7.9 (2.2 – 15)	0.14
IL6 (0 – 3.4 pg/mL)	15 (7.3 – 25)	19 (6.9 – 27)	0.94
Procalcitonin (0 – 0.5 ng/mL)	0.11 (0.06 – 0.28)	0.13 (0.07 – 0.34)	0.32
Total serum proteins (6.4 – 8.3 g/dL)	7.4 (6.8 – 7.8)	7.5 (7 – 7.8)	0.79
Albumin (3.5 – 5.5 g/dL)	3.9 (3.6 – 4.2)	3.8 (3.2 – 4.1)	0.25
IgM (40 – 230 mg/dL)	107 (77 – 141)	80 (62 – 125)	0.04
IgG (700 – 1600 mg/dL)	1070 (837 – 1200)	1015 (856 – 1215)	0.56
IgA (70 – 400 mg/dL)	227 (170 – 287)	230 (169 – 352)	0.46
Oxygenation parameters			
SpO ₂ /FiO ₂ ratio (> 445)	443 (343 – 457)	350 (264 – 448)	0.001

Results expressed as median values (IQR). Laboratory parameters collected at admission to the hospital or at emergency, during the acute phase of the disease. Statistically significant p-values (≤ 0.05) are highlighted in bold. Abbreviations (alphabetical order): ALT, alanine aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; CRP, C-reactive protein; FiO₂, fraction of inspired oxygen; eGFR, estimated glomerular filtration rate calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPD) equation; GGT, gammaglutamyl transpeptidase; Ig, immunoglobulin; IL6, interleukin 6; INR, international normalized ratio; LDH, lactate dehydrogenase; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SpO₂, arterial oxygen saturation measured by pulse-oximetry.

Supplementary Table 6. Clinical characteristics of COVID-19 patients aged ≥ 50 years at referral to the hospital grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} in blood.

	Non-MBL patients (n=102)	MBL ^{lo} patients (n=69)	P-value
Age (years)*	70 ± 14; 68 (57 – 83)	74 ± 13; 74 (63 – 86)	0.03
Sex (male/female)	55 / 47 (54% / 46%)	43 / 26 (62% / 38%)	0.28
Comorbidities			
Presence of any comorbidity	66/102 (65%)	48/69 (70%)	0.51
Hypertension	42/102 (41%)	38/69 (55%)	0.07
Obesity	24/102 (24%)	11/69 (16%)	0.23
Immunosuppressive therapy / AI diseases	13/99 (13%)	8/67 (12%)	0.82
Cardiovascular disease	18/102 (19%)	21/69 (30%)	0.05
Chronic pulmonary disease	12/102 (12%)	10/69 (15%)	0.60
Diabetes	20/102 (20%)	14/69 (20%)	0.91
Cancer (non-active)	10/102 (10%)	12/69 (17%)	0.15
Chronic kidney disease	12/102 (12%)	5/69 (7%)	0.33
Updated Charlson comorbidity index			
0	66/95 (70%)	33/62 (53%)	
1	13/95 (14%)	9/62 (15%)	
2	12/95 (13%)	12/62 (19%)	
3	3/95 (3%)	4/62 (7%)	0.11 [#]
4	0/95 (0%)	3/62 (5%)	
5	0/95 (0%)	1/62 (2%)	
6	1/95 (1%)	0/62 (0%)	
Clinical manifestations			
Symptomatic disease	97/102 (95%)	66/69 (96%)	0.87
Fever	64/102 (63%)	44/69 (64%)	0.89
Cough	60/101 (60%)	39/69 (57%)	0.71
Fatigue	59/97 (61%)	34/64 (53%)	0.33
Dyspnea	54/98 (55%)	44/65 (68%)	0.10
Myalgia	36/97 (37%)	12/64 (19%)	0.01
Headache	29/97 (30%)	14/64 (22%)	0.26
Diarrhea	36/102 (35%)	16/69 (23%)	0.09
Anosmia and/or ageusia	23/97 (24%)	8/64 (13%)	0.08
Nasal congestion / rhinorrhea	17/76 (22%)	2/50 (4%)	0.005
Sore throat / odynophagia	16/97 (17%)	8/64 (13%)	0.49
Nausea and/or vomiting	21/101 (21%)	3/69 (4%)	0.002
Hospitalization			
Days of hospitalization**	10 (6 – 19)	15 (7 – 26)	0.15
Severity of the disease			
Asymptomatic / paucisymptomatic	6/102 (6%)	7/69 (10%)	
Mild	29/102 (28%)	10/69 (15%)	
Moderate	27/102 (27%)	20/69 (29%)	0.28 [#]
Severe	25/102 (25%)	20/69 (29%)	
Very severe / critically ill	15/102 (15%)	12/69 (17%)	
Treatment			
Treated patients (any drug treatment)	74/102 (73%)	48/67 (72%)	0.90
Oxygen therapy	45/79 (57%)	44/60 (73%)	0.05
Aggressive pharmacological treatment ¹	42/99 (42%)	29/65 (45%)	0.78
ICU support	7/102 (7%)	11/69 (16%)	0.06
Outcome			
Deaths (directly related to COVID-19)	4/73 (6%)	2/69 (3%)	0.82

Results expressed as number of cases (percentage), or *as mean ± one standard deviation (SD) and median (IQR), or **as median (IQR) of days from admission until either discharged from hospital or death. Statistically significant p-values or #Bonferroni-adjusted p-values (≤ 0.05) are highlighted in bold.¹ Anti-interleukin receptors drugs and/or intravenous corticosteroids.

Abbreviations (alphabetical order): AI, autoimmune; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SD, standard deviation.

Supplementary Table 7. Laboratory characteristics of COVID-19 patients aged ≥ 50 years at referral to the hospital grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} in blood.

<i>Biological parameters (Reference range)</i>	Non-MBL patients (n=102)	MBL^{lo} patients (n=69)	P-value
Blood cell counts			
Hemoglobin (12 – 18 g/dL)	13.7 (12 – 15.2)	13.7 (11.8 – 14.8)	0.87
Leukocyte count (4.5 – 10x10 ⁹ /L)	7.2 (5.1 – 9.9)	7.1 (5.2 – 12.7)	0.48
Lymphocyte count (1.2 – 3.5x10 ⁹ /L)	0.98 (0.74 – 1.3)	0.96 (0.74 – 1.49)	0.85
Platelet count (150 – 450x10 ⁹ /L)	176 (142 – 227)	191 (153 – 256)	0.20
Coagulation markers			
Prothrombin time (0.79 – 1.2 INR)	1.1 (1 – 1.2)	1.08 (1.01 – 1.25)	0.91
APTT (2 – 40 seconds)	32 (30 – 35)	33 (29 – 36)	0.64
D-dimer (0 – 1 μ g/L)	0.7 (0.4 – 1.8)	0.7 (0.3 – 1.8)	0.40
Fibrinogen (130 – 400 mg/dL)	531 (402 – 644)	602 (438 – 744)	0.12
Biochemical serum biomarkers			
Creatinine (0.5 – 0.9 mg/dL)	0.98 (0.8 – 1.28)	1.08 (0.93 – 1.4)	0.05
eGFR (> 90 mL/min/1.73m ²)	68 (54 – 83)	68 (35 – 78)	0.19
Total bilirubin (0.15 – 1.2 mg/dL)	0.53 (0.36 – 0.66)	0.56 (0.37 – 0.89)	0.36
ALT (0 – 33 U/L)	27 (13 – 44)	28 (17 – 47)	0.43
AST (0 – 32 U/L)	39 (26 – 46)	33 (24 – 48)	0.54
GGT (0 – 40 U/L)	40 (21 – 71)	39 (22 – 85)	0.99
Alkaline phosphatase (40 – 129 U/L)	69 (52 – 93)	67 (50 – 97)	0.89
Ferritin (15 – 150 ng/mL)	868 (418 – 1704)	878 (490 – 1387)	0.58
LDH (135 – 214 U/L)	296 (240 – 382)	288 (221 – 390)	0.57
CRP (0 – 0.5 mg/dL)	5.9 (2.4 – 11.9)	7.9 (2.2 – 15)	0.79
IL6 (0 – 3.4 pg/mL)	19 (11 – 38)	20 (7.9 – 30)	0.72
Procalcitonin (0 – 0.5 ng/mL)	0.12 (0.08 – 0.31)	0.15 (0.07 – 0.35)	0.92
Total serum proteins (6.4 – 3 g/dL)	7.3 (6.8 – 7.7)	7.5 (7 – 7.8)	0.27
Albumin (3.5 – 5.5 g/dL)	3.6 (3.5 – 4)	3.8 (3.3 – 4.1)	0.77
IgM (40 – 230 mg/dL)	104 (73 – 142)	80 (62 – 126)	0.10
IgG (700 – 1600 mg/dL)	1005 (831 – 1183)	1015 (852 – 1205)	0.89
IgA (70 – 400 mg/dL)	220 (151 – 285)	230 (166 – 347)	0.48
Oxygenation parameters			
SpO ₂ /FiO ₂ ratio (> 445)	443 (343 – 455)	352 (264 – 448)	0.008

Results expressed as median values (IQR). Laboratory parameters collected at admission to the hospital or at emergency, during the acute phase of the disease. Statistically significant p-values (≤ 0.05) are highlighted in bold.

Abbreviations (alphabetical order): ALT, alanine aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; CRP, C-reactive protein; FiO₂, fraction of inspired oxygen; eGFR, estimated glomerular filtration rate calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPD) equation; GGT, gammaglutamil transpeptidase; Ig, immunoglobulin; IL6, interleukin 6; INR, international normalized ratio; LDH, lactate dehydrogenase; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SpO₂, arterial oxygen saturation measured by pulse-oximetry.

Supplementary Table 8. Distribution of normal leucocyte subsets in blood (n=353) of COVID-19 patients (n=148) grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} during acute infection.

	Non-MBL HC (n=650)	Total COVID-19 samples (n=353)	P-value (HC vs. total patients and patient groups)	Absence vs. presence of MBL ^{lo} in COVID-19 patients		P-value (between patient groups)
				Non-MBL samples (n=199)	MBL ^{lo} samples (n=154)	
Neutrophils	3722 (3017–4576)	5945 (4281–8289)	< 0.0001 ^{a,b,c}	5858 (4227–8156)	5996 (4308–8387)	0.50
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	25 (4%) / 29 (5%)	31 (9%) / 152 (43%)	0.002 ^{a,b} / < 0.0001 ^{a,b,c}	22 (11%) / 87 (44%)	9 (6%) / 65 (42%)	0.09 / 0.83
Monocytes	321 (245–426)	499 (364–721)	< 0.0001 ^{a,b,c}	491 (368–725)	512 (360–699)	0.68
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	29 (5%) / 29 (5%)	21 (6%) / 95 (27%)	0.19 / < 0.0001 ^{a,b,c}	14 (7%) / 52 (26%)	7 (5%) / 43 (28%)	0.37 / 0.72
Eosinophils	159 (101–250)	16.1 (1.5–86)	< 0.0001 ^{a,b,c}	13 (1.3–76.4)	18.3 (1.5–100)	0.33
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 29 (5%)	226 (64%) / 9 (3%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.05 ^a	130 (65%) / 3 (2%)	96 (62%) / 6 (4%)	0.58 / 0.19
Basophils	36.7 (22.6–51)	15.6 (2.5–37.5)	0.0009 ^{a,b,c}	12.9 (1.9–33.6)	19.4 (3.8–41.4)	0.15
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	2 (4%) / 2 (4%)	87 (39%) / 16 (7%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.52	51 (39%) / 11 (8%)	36 (40%) / 5 (6%)	0.89 / 0.6
Lymphocytes	1665 (1305–2181)	1071 (745–1499)	< 0.0001 ^{a,b,c}	1099 (741–1508)	1065 (754–1499)	0.75
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 33 (5%)	134 (38%) / 2 (1%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.01 ^{a,b,c}	76 (38%) / 1 (1%)	58 (38%) / 1 (1%)	1 / 1
T cells	1212 (912–1606)	708 (492–1073)	< 0.0001 ^{a,b,c}	722 (500–1085)	699 (459–1069)	0.45
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 32 (5%)	164 (47%) / 5 (1%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.05 ^{a,b,c}	91 (46%) / 3 (2%)	73 (47%) / 2 (1%)	0.83 / 1
CD4+ T cells	701 (545–941)	442 (311–679)	< 0.0001 ^{a,b,c}	461 (322–678)	429 (265–683)	0.43
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	30 (5%) / 28 (4%)	114 (32%) / 6 (2%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.03 ^a	67 (34%) / 3 (2%)	47 (31%) / 3 (2%)	0.57 / 1
CD8+ T cells	393 (282–575)	210 (127–361)	< 0.0001 ^{a,b,c}	212 (126–387)	208 (127–319)	0.57
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 28 (4%)	117 (33%) / 5 (1%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.03 ^{a,b}	65 (33%) / 2 (1%)	52 (34%) / 3 (2%)	0.91 / 0.66
CD4-CD8-Taβ cells	24.3 (14.5–36.2)	5.9 (2.7–12.1)	< 0.0001 ^{a,b,c}	6 (2.8–13.4)	5.8 (2.4–10.8)	0.49
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	171 (48%) / 11 (3%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.2	97 (49%) / 3 (2%)	74 (48%) / 8 (5%)	0.91 / 0.06
CD38++CD4-CD8-Taβ cells	–	0.76 (0.28–1.7)	–	0.62 (0.23–1.3)	1 (0.39–2.1)	0.01
Tγδ cells	54.8 (31–108)	15.6 (6–32.1)	< 0.0001 ^{a,b,c}	19.4 (5.4–36.9)	13.1 (7–29.4)	0.17
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	142 (40%) / 5 (1%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.07	72 (36%) / 2 (1%)	70 (46%) / 3 (2%)	0.08 / 0.66
NK cells	271 (174–387)	152 (96.4–233)	< 0.0001 ^{a,b,c}	148 (99.7–233)	155 (92.2–237)	0.70
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	30 (5%) / 28 (4%)	65 (18%) / 0 (0%)	< 0.0001 ^{a,b,c} / 0.005 ^{a,b,c}	36 (18%) / 0 (0%)	29 (19%) / 0 (0%)	0.89 / 1
B-cells	143 (97.6–213)	122 (62.8–208)	0.005 ^{a,b,c}	124 (63.5–197)	117 (59.5–221)	0.95
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 29 (5%)	47 (13%) / 42 (12%)	0.0002 ^{a,b,c} / 0.002 ^{a,b,c}	26 (13%) / 24 (12%)	21 (14%) / 18 (12%)	0.88 / 1
Pre-GC B-cells	92.6 (57.1–139)	80.6 (37–141)	0.05 ^{a,b,c}	81.3 (36.8–141)	75.6 (37.7–144)	0.57
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	7 (4%) / 7 (4%)	46 (13%) / 34 (10%)	0.002 ^{a,b,c} / 0.007 ^{a,b}	27 (14%) / 23 (12%)	19 (13%) / 11 (7%)	0.87 / 0.2
Memory B-cells	56 (39.1–91.6)	36.8 (18.6–62.4)	< 0.0001 ^{a,b,c}	34.9 (19.6–52.9)	40.7 (18.2–76.2)	0.08
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	8 (4%) / 7 (4%)	49 (14%) / 19 (6%)	0.004 ^{a,b,c} / 0.06	30 (15%) / 6 (3%)	19 (13%) / 13 (9%)	0.54 / 0.03
Plasma cells	1.7 (0.79–3)	14.5 (5.2–36.6)	< 0.0001 ^{a,b,c}	14.5 (4.9–39.5)	14.4 (5.4–32.5)	0.99
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	4 (1%) / 241 (68%)	0.05 ^{a,b} / < 0.0001 ^{a,b,c}	1 (1%) / 136 (68%)	3 (2%) / 105 (68%)	0.32 / 1

Results expressed as median values (IQR) of cells/μL of blood or as *n (%) of samples lower than the 5th percentile (5thp) and higher than the 95th percentile (95thp) observed for each cell subset in age-matched healthy controls. ^a P-value ≤0.05 HC vs. total patients; ^b P-value ≤0.05 HC vs. non-MBL; ^c P-value ≤0.05 HC vs. MBL. Statistically significant p-values (≤0.05) are highlighted in bold. Abbreviations (alphabetical order): GC, germinal center; HC, healthy control; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer.

Supplementary Table 9. Distribution of normal leucocyte subsets in blood (n=155) of COVID-19 patients (n=101) after recovery from infection grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo}.

	Non-MBL HC (n=650)	Total COVID-19 samples (n=155)	P-value (HC vs. total patients and patient groups)	Absence vs. presence of MBL ^{lo} in COVID-19 patients		P-value (between patient groups)
				Non-MBL samples (n=128)	MBL ^{lo} samples (n=27)	
Neutrophils	3722 (3017–4576)	3497 (2826–4652)	0.02^c	3580 (2937–4685)	3256 (2339–4337)	0.07
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	25 (4%) / 29 (5%)	16 (10%) / 7 (5%)	0.003^{a,c} / 0.82^c	10 (8%) / 6 (5%)	6 (22%) / 1 (4%)	0.04 / 1
Monocytes	321 (245–426)	433 (368–553)	0.0002^{a,b,c}	434 (368–563)	423 (340–531)	0.63
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	29 (5%) / 29 (5%)	4 (3%) / 10 (7%)	0.37 ^a / 0.26 ^a	4 (3%) / 9 (7%)	0 (0%) / 1 (4%)	1 / 1
Eosinophils	159 (101–250)	98.3 (66.7–172)	<0.0001^{a,b,c}	106 (69.4–187)	78.9 (55.4–150)	0.07
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 29 (5%)	24 (16%) / 1 (1%)	0.01^{a,b,c} / 0.05^{a,b}	19 (15%) / 1 (1%)	5 (19%) / 0 (0%)	0.57 / 1
Basophils	36.7 (22.6–51)	44.7 (28.8–60.3)	0.05^{a,b}	44.7 (28.1–59.7)	44.7 (34.3–69.2)	0.59
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	2 (4%) / 2 (4%)	3 (3%) / 14 (14%)	0.65 / 0.07	3 (3%) / 11 (12%)	0 (0%) / 3 (21%)	1 / 0.4
Lymphocytes	1665 (1305–2181)	1966 (1494–2494)	0.04^{a,b,c}	1958 (1478–2491)	2033 (1507–2561)	0.91
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 33 (5%)	4 (3%) / 12 (8%)	0.28 / 0.21	4 (3%) / 10 (8%)	0 (0%) / 2 (7%)	1 / 1
T cells	1212 (912–1606)	1529 (1143–1937)	0.004^{a,b,c}	1494 (1136–1929)	1576 (1162–1981)	0.52
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 32 (5%)	3 (2%) / 8 (5%)	0.18 / 0.51	3 (2%) / 8 (6%)	0 (0%) / 0 (0%)	1 / 0.35
CD4+ T cells	701 (545–941)	867 (609–1155)	<0.0001^{a,b}	871 (637–1151)	862 (561–1232)	0.74
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	30 (5%) / 28 (4%)	6 (4%) / 14 (9%)	0.83 / 0.03	5 (4%) / 11 (9%)	1 (4%) / 3 (11%)	1 / 0.71
CD8+ T cells	393 (282–575)	491 (363–645)	0.001^{a,b,c}	486 (350–638)	505 (447–674)	0.13
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 28 (4%)	4 (3%) / 10 (7%)	0.28 / 0.29	4 (3%) / 8 (6%)	0 (0%) / 2 (7%)	1 / 0.69
CD4-CD8-Tαβ cells	24.3 (14.5–36.2)	18.5 (10.9–34)	0.07	18.8 (11–33.6)	16.5 (9.4–34.2)	0.71
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	12 (8%) / 12 (8%)	0.4 / 0.03^{a,b,c}	11 (9%) / 7 (6%)	1 (4%) / 5 (19%)	0.69 / 0.04
CD38++CD4-CD8-Tαβ cells	–	1.9 (1.1–3.2)	–	1.9 (1.1–3)	2.6 (0.84–3.3)	0.61
Tγδ cells	54.8 (31–108)	57.8 (30.7–96.7)	0.74	56.5 (27.7–97.5)	60.7 (36.6–82.5)	0.73
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	2 (1%) / 17 (11%)	0.19 / 0.09	2 (2%) / 15 (12%)	0 (0%) / 2 (7%)	1 / 0.74
NK cells	271 (174–387)	214 (146–321)	0.0008^{a,b}	214 (148–308)	214 (110–412)	0.87
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	30 (5%) / 28 (4%)	12 (8%) / 4 (3%)	0.0019^c / 0.49	6 (5%) / 4 (3%)	6 (22%) / 0 (0%)	0.007 / 1
B-cells	143 (97.6–213)	200 (144–297)	<0.0001^{a,b}	203 (155–300)	149 (111–263)	0.04
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	31 (5%) / 29 (5%)	5 (3%) / 16 (10%)	0.52 / 0.02^{a,b}	4 (3%) / 13 (10%)	1 (4%) / 3 (11%)	1 / 1
Pre-GC B-cells	92.6 (57.1–139)	117 (73.2–195)	0.0005^{a,b}	120 (79–200)	78.7 (56.4–159)	0.10
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	7 (4%) / 7 (4%)	6 (5%) / 17 (14%)	0.37 / 0.0008^{a,b}	6 (6%) / 15 (15%)	0 (0%) / 2 (10%)	0.59 / 0.74
Memory B-cells	56 (39.1–91.6)	76.4 (51.2–116)	0.0003^{a,b}	76.4 (51.4–116)	71.7 (42.9–125)	0.86
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	8 (4%) / 7 (4%)	2 (2%) / 16 (13%)	0.33 / 0.006^{a,b}	2 (2%) / 13 (13%)	0 (0%) / 3 (15%)	1 / 0.73
Plasma cells	1.7 (0.79–3)	1.7 (0.85–3.2)	0.46	1.7 (0.85–3.1)	1.9 (0.85–3.8)	0.51
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (5%) / 4 (5%)	11 (7%) / 18 (12%)	0.41 / 0.09	11 (9%) / 16 (13%)	0 (0%) / 2 (7%)	0.21 / 0.74

Results expressed as median values (IQR) of cells/μL of blood or as *n (%) of samples lower than the 5th percentile (5thp) and higher than the 95th percentile (95thp) observed for each cell subset in age-matched healthy controls. ^a P-value ≤0.05 HC vs. total patients; ^b P-value ≤0.05 HC vs. non-MBL; ^c P-value ≤0.05 HC vs. MBL. Statistically significant p-values (≤0.05) are highlighted in bold. Abbreviations (alphabetical order): GC, germinal center; HC, healthy control; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer.

Supplementary Table 10. Distribution of normal leucocyte subsets in blood (n=301) of COVID-19 patients ≥50 years (n=131) during the acute phase of the disease grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo}.

	Non-MBL HC ≥50y (n=455)	Total COVID-19 samples (n=301)	P-value (HC vs. total patients and patient groups)	Absence vs. presence of MBL ^{lo} in COVID-19 patients		P-value (between patient groups)
				Non-MBL samples (n=160)	MBL ^{lo} samples (n=141)	
Neutrophils	3703 (3041–4550)	6390 (4547–8540)	<0.0001^{a,b,c}	6451 (4657–8465)	6368 (4281–8637)	0.63
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	18 (4%) / 20 (4%)	17 (6%) / 139 (46%)	0.29 / <0.0001^{a,b,c}	9 (6%) / 76 (48%)	8 (6%) / 63 (45%)	1 / 0.64
Monocytes	303 (236–412)	499 (357–729)	<0.0001^{a,b,c}	502 (360–737)	492 (357–713)	0.80
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 23 (5%)	18 (6%) / 84 (28%)	0.21 / <0.0001^{a,b,c}	11 (7%) / 45 (28%)	7 (5%) / 39 (28%)	0.63 / 1
Eosinophils	159 (101–251)	15.6 (1.3–83.8)	<0.0001^{a,b,c}	14 (1.2–82.3)	15.8 (1.5–88.8)	0.66
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 21 (5%)	192 (64%) / 8 (3%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.16	101 (63%) / 3 (2%)	91 (65%) / 5 (4%)	0.81 / 0.48
Basophils	37.9 (22.7–51.3)	16 (2.1–40.5)	0.001^{a,b,c}	15 (1–36.9)	18.9 (3.2–41.5)	0.18
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	2 (5%) / 2 (5%)	78 (40%) / 13 (7%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.72	42 (39%) / 8 (7%)	36 (41%) / 5 (6%)	0.88 / 0.78
Lymphocytes	1648 (1285–2124)	1041 (718–1457)	<0.0001^{a,b,c}	1056 (709–1476)	993 (738–1446)	0.71
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	22 (5%) / 23 (5%)	117 (39%) / 1 (0%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.009^{a,b,c}	60 (38%) / 1 (1%)	57 (40%) / 0 (0%)	0.64 / 1
T cells	1170 (888–1554)	673 (458–1031)	<0.0001^{a,b,c}	663 (461–1054)	681 (445–972)	0.53
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	23 (5%) / 22 (5%)	145 (48%) / 4 (1%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.02^{a,c}	74 (46%) / 3 (2%)	71 (50%) / 1 (1%)	0.49 / 0.63
CD4+ T cells	680 (538–912)	432 (288–660)	<0.0001^{a,b,c}	444 (305–673)	416 (254–658)	0.34
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 20 (4%)	97 (32%) / 5 (2%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.06	51 (32%) / 3 (2%)	46 (33%) / 2 (1%)	0.9 / 1
CD8+ T cells	379 (272–561)	193 (119–336)	<0.0001^{a,b,c}	193 (112–387)	193 (123–299)	0.87
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 22 (5%)	104 (35%) / 4 (1%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.01^a	53 (33%) / 2 (1%)	51 (36%) / 2 (1%)	0.63 / 1
CD4-CD8-Tαβ cells	15.7 (11.5–27.5)	5.2 (2.3–10.9)	<0.0001^{a,b,c}	4.8 (2.4–11.2)	5.6 (2.3–10.9)	0.46
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	155 (52%) / 11 (4%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.58	85 (53%) / 3 (2%)	70 (50%) / 8 (6%)	0.57 / 0.12
CD38++CD4-CD8-Tαβ cells	–	0.76 (0.27–1.7)	–	0.59 (0.22–1.3)	1 (0.4–2.1)	0.01
Tγδ cells	37.1 (18.6–104)	15.2 (5.2–30.6)	<0.0001^{a,b,c}	18 (4.3–33.5)	13.1 (6.9–27.6)	0.65
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	123 (41%) / 5 (2%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.47	59 (37%) / 2 (1%)	64 (45%) / 3 (2%)	0.16 / 0.67
NK cells	286 (185–416)	155 (96.4–237)	<0.0001^{a,b,c}	147 (93.6–233)	157 (104–239)	0.43
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 21 (5%)	53 (18%) / 0 (0%)	<0.0001^{a,b,c} / 0.007^{a,b,c}	30 (19%) / 0 (0%)	23 (16%) / 0 (0%)	0.65 / 1
B-cells	129 (87.1–196)	111 (56.7–197)	0.01^{a,b,c}	116 (58.7–195)	106 (54.6–198)	0.57
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 22 (5%)	42 (14%) / 37 (12%)	0.0008^{a,b,c} / 0.01^{a,b,c}	21 (13%) / 21 (13%)	21 (15%) / 16 (11%)	0.74 / 0.73
Pre-GC B-cells	81.7 (53.7–136)	70.5 (30.9–132)	0.02^{a,c}	75.4 (31.7–141)	68.2 (30.8–125)	0.24
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (3%) / 5 (4%)	43 (15%) / 24 (8%)	0.004^{a,b,c} / 0.03^b	24 (15%) / 19 (12%)	19 (14%) / 5 (4%)	0.87 / 0.01
Memory B-cells	48.9 (33.8–85.3)	34.5 (17.9–58.9)	0.002^{a,b,c}	32.4 (18.1–49.1)	37 (17.2–77.5)	0.11
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	5 (4%) / 4 (3%)	42 (14%) / 16 (5%)	0.01^{a,b,c} / 0.12	23 (15%) / 4 (3%)	19 (14%) / 12 (9%)	1 / 0.02
Plasma cells	1.2 (0.63–2.8)	14.3 (5.3–37.3)	<0.0001^{a,b,c}	15.6 (5.8–40)	13.3 (5.2–34.2)	0.45
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	4 (1%) / 206 (68%)	0.33 / <0.0001^{a,b,c}	1 (1%) / 113 (71%)	3 (2%) / 93 (66%)	0.34 / 0.39

Results expressed as median values (IQR) of cells/μL of blood or as *n (%) of samples lower than the 5th percentile (5thp) and higher than the 95th percentile (95thp) observed for each cell subset in age-matched healthy controls. ^a P-value ≤0.05 HC vs. total patients; ^b P-value ≤0.05 HC vs. non-MBL; ^c P-value ≤0.05 HC vs. MBL. Statistically significant p-values (≤0.05) are highlighted in bold.

Abbreviations (alphabetical order): GC, germinal center; HC, healthy control; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer.

Supplementary Table 11. Distribution of normal leucocyte subsets in blood (n=81) of COVID-19 patients ≥50 years (n=49) after recovery from infection grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo}.

	Non-MBL HC ≥50y (n=455)	Total COVID-19 samples (n=81)	P-value (HC vs. total patients and patient groups)	Absence vs. presence of MBL ^{lo} in COVID-19 patients		P-value (between patient groups)
				Non-MBL samples (n=55)	MBL ^{lo} samples (n=26)	
Neutrophils	3703 (3041–4550)	3591 (2817–4773)	0.05^c	3776 (2978–4807)	3287 (2322–4416)	0.08
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	18 (4%) / 20 (4%)	8 (10%) / 2 (3%)	0.04^{a,c} / 0.71	2 (4%) / 1 (2%)	6 (23%) / 1 (4%)	0.01 / 0.55
Monocytes	303 (236–412)	416 (344–506)	<0.0001^{a,b,c}	415 (345–491)	421 (336–531)	0.66
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 23 (5%)	0 (0%) / 5 (6%)	0.06 / 0.59	0 (0%) / 3 (6%)	0 (0%) / 2 (8%)	1 / 0.66
Eosinophils	159 (101–251)	94.2 (62.9–163)	<0.0001^{a,b,c}	100 (70.1–180)	82.7 (53.8–150)	0.17
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 21 (5%)	13 (16%) / 0 (0%)	0.01^{a,b,c} / 0.06	8 (15%) / 0 (0%)	5 (19%) / 0 (0%)	0.75 / 1
Basophils	37.9 (22.7–51.3)	45.8 (28.8–67.2)	0.04^a	45.6 (28.7–67.7)	45.8 (34.1–73.4)	0.74
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	2 (5%) / 2 (5%)	0 (0%) / 5 (11%)	0.23 / 0.22	0 (0%) / 3 (9%)	0 (0%) / 2 (15%)	1 / 0.61
Lymphocytes	1648 (1285–2124)	1924 (1404–2444)	0.02^{a,c}	1867 (1373–2417)	2083 (1493–2582)	0.39
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	22 (5%) / 23 (5%)	2 (3%) / 6 (8%)	0.56 / 0.42	2 (4%) / 4 (7%)	0 (0%) / 2 (8%)	1 / 1
T cells	1170 (888–1554)	1518 (1125–1934)	0.006^{a,b,c}	1368 (1060–1870)	1649 (1157–1987)	0.24
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	23 (5%) / 22 (5%)	0 (0%) / 5 (6%)	0.04^a / 0.51	0 (0%) / 4 (7%)	0 (0%) / 1 (4%)	1 / 1
CD4+ T cells	680 (538–912)	869 (588–1185)	0.001^{a,b}	859 (606–1174)	914 (552–1245)	0.79
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 20 (4%)	3 (4%) / 11 (14%)	1 / 0.006^{a,b}	2 (4%) / 8 (15%)	1 (4%) / 3 (12%)	1 / 1
CD8+ T cells	379 (272–561)	465 (369–622)	0.001^{a,c}	452 (331–595)	493 (443–707)	0.02
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 22 (5%)	1 (1%) / 2 (3%)	0.23 / 0.15	1 (2%) / 0 (0%)	0 (0%) / 2 (8%)	1 / 0.1
CD4-CD8-Taβ cells	15.7 (11.5–27.5)	14.9 (9.7–28)	0.25	14.9 (9.8–24)	15.4 (9.3–32.5)	0.36
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	5 (6%) / 17 (21%)	0.4 / 0.02^{a,b,c}	4 (7%) / 10 (19%)	1 (4%) / 7 (27%)	1 / 0.4
CD38++CD4-CD8-Taβ cells	–	2 (0.93–3)	–	1.9 (1–2.8)	2.6 (0.8–3.4)	0.33
Tγδ cells	37.1 (18.6–104)	46.5 (27.7–78.6)	0.14	42.6 (24.6–76)	62.9 (35.9–85.2)	0.08
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	0 (0%) / 5 (6%)	0.32 / 0.56	0 (0%) / 3 (6%)	0 (0%) / 2 (8%)	1 / 0.66
NK cells	286 (185–416)	211 (145–320)	0.001^{a,b}	208 (148–307)	220 (132–415)	0.77
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	20 (4%) / 21 (5%)	8 (10%) / 1 (1%)	0.008^c / 0.23	3 (6%) / 1 (2%)	5 (19%) / 0 (0%)	0.1 / 1
B-cells	129 (87.1–196)	173 (116–270)	0.0005^{a,b}	179 (119–271)	148 (109–231)	0.39
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	21 (5%) / 22 (5%)	5 (6%) / 11 (14%)	0.32 / 0.009^{a,b}	4 (7%) / 8 (15%)	1 (4%) / 3 (12%)	1 / 1
Pre-GC B-cells	81.7 (53.7–136)	99.4 (64.7–164)	0.07	109 (67.4–167)	77.9 (53.4–164)	0.41
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	4 (3%) / 5 (4%)	4 (7%) / 6 (11%)	0.09 / 0.18	4 (11%) / 4 (11%)	0 (0%) / 2 (11%)	0.29 / 1
Memory B-cells	48.9 (33.8–85.3)	66.1 (36–101)	0.08	60.3 (34.9–98.4)	66.9 (42.4–109)	0.39
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	5 (4%) / 4 (3%)	1 (2%) / 5 (9%)	0.67 / 0.15	1 (3%) / 3 (8%)	0 (0%) / 2 (11%)	1 / 1
Plasma cells	1.2 (0.63–2.8)	1.3 (0.68–2.8)	0.13	1.1 (0.56–2.1)	2.2 (1.1–3.9)	0.02
% cases ↓5 th p/↑95 th p*	1 (3%) / 1 (3%)	8 (10%) / 5 (6%)	0.08 / 0.03^c	8 (15%) / 2 (4%)	0 (0%) / 3 (12%)	0.05 / 0.32

Results expressed as median values (IQR) of cells/μL of blood or as *n (%) of samples lower than the 5th percentile (5thp) and higher than the 95th percentile (95thp) observed for each cell subset in age-matched healthy controls. ^a P-value ≤0.05 HC vs. total patients; ^b P-value ≤0.05 HC vs. non-MBL; ^c P-value ≤0.05 HC vs. MBL. Statistically significant p-values (≤0.05) are highlighted in bold.

Abbreviations (alphabetical order): GC, germinal center; HC, healthy control; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer.

Supplementary Table 12. Univariate and multivariate analysis of predictive factors for milder (non-hospitalized) vs. more severe (hospitalized) COVID-19.

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis	
	Non-hospitalized	Hospitalized	P-value	OR (95%CI)	P-value
Sex (male)	42/114 (37%)	91/135 (67%)	<0.0001	2.83 (1.29 – 6.21)	0.01
Any comorbidity	43/114 (38%)	91/135 (67%)	<0.0001		
Anosmia/ageusia	41/106 (39%)	23/133 (17%)	<0.0001		
Dyspnea	36/107 (33%)	95/134 (71%)	<0.0001	4.88 (2.17 – 10.93)	<0.0001
Fever	56/114 (49%)	104/135 (77%)	<0.0001	3.71 (1.52 – 9.06)	0.004
Headache	51/106 (48%)	32/133 (24%)	<0.0001		
Presence of MBL ^o	18/114 (16%)	53/135 (39%)	<0.0001	2.97 (1.19 – 7.42)	0.02
Procalcitonin >0.07 ng/mL	10/23 (44%)	71/87 (82%)	<0.0001		
ALT >32 U/L	3/30 (10%)	52/112 (46%)	<0.0001		
LDH >250 U/L	7/30 (23%)	84/118 (71%)	<0.0001		
CRP >8 mg/dL	7/32 (22%)	89/121 (74%)	<0.0001		
SpO ₂ /FiO ₂ ratio <445	8/40 (20%)	80/117 (50%)	<0.0001		
Anti-SARS-CoV-2 N-protein IgM ≥12 AU/mL	16/114 (14%)	57/134 (43%)	<0.0001		
Anti-SARS-CoV-2 N-protein IgA ≥24 AU/mL	61/114 (54%)	112/134 (84%)	<0.0001	5.36 (2.13 – 13.52)	<0.0001
N. of eosinophils <20/μL	17/114 (15%)	71/135 (53%)	<0.0001	6.16 (2.37 – 16.04)	<0.0001
N. of neutrophils >6000/μL	14/114 (12%)	55/135 (41%)	<0.0001	4.09 (1.48 – 11.3)	0.007
N. of lymphocytes <1000/μL	15/114 (13%)	64/135 (47%)	<0.0001		
N. of T cells <700/μL	15/114 (13%)	64/135 (48%)	<0.0001		
N. of CD4+ T cells <500/μL	23/114 (20%)	81/135 (60%)	<0.0001		
N. of CD8+ T cells <250/μL	27/114 (24%)	67/135 (50%)	<0.0001		
N. of Tγδ cells <20/μL	24/114 (21%)	68/135 (50%)	<0.0001		
N. of CD4-CD8-Tαβ cells <10/μL	45/114 (40%)	93/135 (69%)	<0.0001		
N. of B-cells <100/μL	18/114 (16%)	63/135 (47%)	<0.0001	3.6 (1.3 – 9.99)	0.01
N. of Pre-GC B-cells <60/μL	23/114 (21%)	69/135 (53%)	<0.0001		
N. of Memory B-cells <40/μL	24/114 (22%)	82/135 (63%)	<0.0001		
N. of Plasma cells >10/μL	14/114 (12%)	66/135 (49%)	<0.0001		
Age ≥75y	22/114 (19%)	51/135 (38%)	0.001		
AST >32 U/L	3/18 (17%)	58/97 (60%)	0.001		

Fibrinogen >500 mg/dL	8/28 (29%)	67/105 (64%)	0.001		
GGT >50 U/L	4/28 (14%)	47/113 (42%)	0.007		
Ferritin >800	5/21 (24%)	53/95 (56%)	0.008		
eGFR <65	28/35 (80%)	67/117 (57%)	0.02		
N. of NK cells <150/μL	32/114 (28%)	54/135 (40%)	0.05	3.14 (1.21 – 8.13)	0.02

Results of the univariate analysis are expressed as number of cases (percentage). Abbreviations (alphabetical order): ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; eGFR, estimated glomerular filtration rate calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPD) equation; FiO₂, fraction of inspired oxygen; GC, germinal center; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; Ig, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenase; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; N, number; NK, natural killer; N-protein, nucleocapsid protein; OR, odds ratio; SpO₂, arterial oxygen saturation measured by pulse-oximetry.

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

ARTÍCULO 2

“Cinética de la respuesta inmune celular y humoral en pacientes COVID-19 con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 8).
- iii) Figuras suplementarias (Figuras 1 – 8).

American Journal of Hematology, 4 de octubre de 2023; disponible sólo en versión on-line.
DOI: 10.1002/ajh.27119
PMID: 37792579

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Title: Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

Authors: Guillermo Oliva-Ariza, Blanca Fuentes-Herrero, Quentin Lecrevisse, Cristina Carbonell, Alba Pérez-Pons, Alba Torres-Valle, Julio Pozo, José Ángel Martín-Oterino, Óscar González-López, Amparo López-Bernús, Marta Bernal-Ribes, Moncef Belhassen-García, Oihane Pérez-Escorza, Martín Pérez-Andrés, Lourdes Vazquez, Guillermo Hernández-Pérez, Francisco Javier García Palomo, Pilar Leoz, Pilar Costa-Alba, Elena Pérez-Losada, Ana Yeguas, Miryam Santos Sánchez, Marta García-Blázquez, F. Javier Morán-Plata, Daniela Damasceno, Vitor Botafogo, Noemí Muñoz-García, Rafael Fluxa, Jacques J.M. van Dongen, Miguel Marcos, Julia Almeida, Alberto Orfao.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Patients, controls, and samples. All COVID-19 patients included in this study were attended at the University Hospital of Salamanca between 27th March 2020 and 15th July 2021. The following inclusion criteria were used for this study: age ≥ 18 years, suspected COVID-19 by clinical, laboratory and radiological features and subsequent confirmation of the presence of SARS-CoV-2 by RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) in a nasopharyngeal swab and/or a positive serology for anti-nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2 IgM and/or IgG antibodies when a PCR-assay was not available. Exclusion criteria included: presence of active neoplastic disease or hematologic malignancy, prior diagnosis of a primary or secondary immunodeficiency, confirmed or suspected acute infection other than COVID-19, an expected survival of < 24 hours, and prior vaccination against SARS-CoV-2. COVID-19 patients carrying MBL clones were classified according to the immunophenotypic features of B-cells into:^{1,2} i) 67/94 (91%) COVID-19 patients with CLL-type MBL^{lo} (38 men and 29 women; median age of 68 years [range: 38-95 years]) and ii) 7/74 (9%) as COVID-19 patients with non-CLL MBL (3 men and 4 women; median age of 84 years [range: 54-93 years])². The major clinical features of the patient cohort (both MBL^{lo} and non-MBL patients) are described in Supplementary Table 1.

Patient data and samples included in the study were collected after the patient (or their relatives, in case of disability due to severe illness) had given his/her informed consent to participate in the study, according to the Declaration of Helsinki and the Spanish law for Biomedical Research, and the study had been approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca / IBSAL (approval codes: CEIC PI4705/2017 and PI 2020 03 468).

Immunophenotypic studies. Peripheral blood (PB) samples (30mL) were collected in K3-EDTA Vacutainer tubes (Becton/Dickinson Biosciences (BD), San José, CA) and immediately (<6 hours) stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST), the Immunemonitoring (IMM) BIgH tube, and the EuroFlow IMM Innate Myeloid Cell (IMC) tube, using the EuroFlow bulk-lyse-stain-and-then-fix standard operating procedure (SOP) available at www.euroflow.org.^{3,4} Briefly, non-nucleated red blood cells were lysed with an ammonium chloride solution and washed twice in phosphate buffered saline (PBS; pH=7.4). Then, $>10^7$ WBC were stained for 30 minutes with the LST (BD OneFlow LST™ reagent, BD), the BIgH, and the EuroFlow IMC antibody combinations (Supplementary Tables 2A, C, E). Stained cells were subsequently fixed and, in case of the IMM-BIgH tube, stained with the cytoplasmic antibodies using the Fix & Perm Reagent Kit (Nordic-MUBio, Susteren, The Netherlands). For each antibody combination, $\geq 10^7$ cells/tube were measured per sample, either in a FACSCanto II (BD) or a FACSLyric (BD) flow cytometer for LST, and an LSRFortessa X-20 (BD) or a FACSsymphony (BD) instrument for the EuroFlow IMM-BIgH and IMC tubes. For data analysis, the Automated Gating and Identification (AGI) tool of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used in combination with the EuroFlow LST and IMM-BIgH data bases.⁵ Absolute cell counts/ μ L of blood were calculated using a dual-platform approach, as previously described.⁶ For the identification of MBL clones, the presence of ≥ 20 clustered cells with an aberrant -e.g. CD5⁺ CD20^{lo} surface membrane immunoglobulin (smIg)^{lo} -and/or clonal (e.g. smIg κ ⁺ or smIg λ ⁺)- immunophenotype, was required.⁷

Data normalization and plotting using MIDAS (v2.0.5.d) (Cytognos SL, Salamanca, Spain): Age-based normalization of the cell counts for the different leukocyte populations found in each COVID-19 patient was performed against healthy donors (HD) of the same age using the following formula:⁸

- If the value of a given population ($v(i)$) is below the median of the reference subgroup (Bi) (i.e., $v(i) < \text{median}(v(Bi))$):

$$n(i) = \frac{v(i) - \text{median}(v(Bi))}{\text{median}(v(Bi)) - \text{percentile5}(v(Bi))}$$

- If the value of a given population ($v(i)$) is above the median of the reference subgroup (Bi) (i.e., $v(i) \geq \text{median}(v(Bi))$):

$$n(i) = \frac{v(i) - \text{median}(v(Bi))}{\text{percentile95}(v(Bi)) - \text{median}(v(Bi))}$$

Where the symbols and functions (by order of appearance) are defined as follows: $n(i)$: normalized value for a given individual “ i ”; $v(i)$: the actual value of a given cell population (cell/ μ L) obtained for the case to be normalized; Bi : the reference subgroup of all HD with an age ranging from <5 years to >5 years of the age of each given individual “ i ” for those populations with more than 100 HD, and an age ranging from <8 years to >8 years of the age of each given individual “ i ” for those populations with less than 100 HD available in the control HD cohort.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- 1 Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br. J. Haematol.* 2005; **130**: 325–332.
- 2 Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022; **36**: 1720–1748.
- 3 Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Carbonell C, Lecrevisse Q, Pérez-Pons A, Torres-Valle A *et al.* High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients. *Blood* 2023; **141**: 309–314.
- 4 Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; **31**: 2094–2103.
- 5 Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, Hernández J, Fernandez P, Almeida J *et al.* EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods* 2019; **475**: 112662.
- 6 Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O’Gorman MRG, Menendez FA, Borowski L *et al.* Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010; **78**: 194–200.
- 7 Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–37.
- 8 Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Teodosio C, Lecrevisse Q *et al.* Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset Ranges in the General Population Defined with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL Subjects. *Cancers (Basel)* 2022; **15**: 58.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of COVID-19 patients grouped according to the presence vs. absence of MBL^{lo} in blood at referral to the hospital.

	Non-MBL patients (n=262)	MBL ^{lo} patients (n=74)	P-value
Age (years)*	53 ± 17; 52 (41 – 62)	71 ± 14; 69 (60 – 84)	<0.0001
Sex (male/female)	108 / 154 (41% / 59%)	41 / 33 (55% / 45%)	0.03
Comorbidities			
Presence of any comorbidity	98/211 (46%)	53/68 (78%)	<0.0001
Hypertension	50/262 (19%)	39/74 (53%)	<0.0001
Obesity	41/262 (16%)	14/74 (19%)	0.50
Immunosuppressive therapy / AI disease	15/180 (8%)	8/64 (13%)	0.33
Cardiovascular disease	18/262 (7%)	23/74 (31%)	<0.0001
Chronic pulmonary disease	17/192 (9%)	10/66 (15%)	0.15
Diabetes	19/262 (7%)	15/74 (20%)	0.001
Cancer (non-active)	11/262 (4%)	11/74 (15%)	0.001
Chronic kidney disease	11/192 (6%)	5/66 (8%)	0.59
Updated Charlson comorbidity index			
0	206/246 (84%)	40/68 (59%)	
1	21/246 (9%)	10/68 (15%)	
2	15/246 (6%)	11/68 (16%)	
3	3/246 (1%)	3/68 (4%)	<0.0001
4	0/246 (0%)	3/68 (4%)	
5	0/246 (0%)	1/68 (2%)	
6	1/246 (0.4%)	0/68 (0%)	
Clinical manifestations			
Symptomatic disease	260/262 (99%)	74/74 (100%)	0.45
Fever	179/262 (68%)	48/74 (65%)	0.73
Cough	170/261 (65%)	48/74 (65%)	0.96
Fatigue	187/259 (72%)	42/70 (60%)	0.05
Dyspnea	131/260 (50%)	47/71 (66%)	0.02
Myalgia	128/259 (42%)	14/70 (20%)	<0.0001
Headache	137/259 (53%)	22/70 (31%)	0.001
Diarrhea	110/262 (42%)	23/74 (31%)	0.09
Anosmia and/or ageusia	109/259 (42%)	15/70 (20%)	0.002
Nasal congestion / rhinorrhea	35/138 (25%)	3/50 (6%)	0.003
Sore throat / odynophagia	72/258 (28%)	13/70 (119%)	0.11
Nausea and/or vomiting	51/261 (20%)	7/74 (10%)	0.04
Hospitalization			
Days of hospitalization**	10 (5 – 18)	15 (8 – 24)	0.006
Severity of the disease¹			
Asymptomatic / paucisymptomatic	5/262 (2%)	4/74 (5%)	
Mild	177/262 (68%)	18/74 (24%)	
Moderate	31/262 (12%)	21/74 (28%)	<0.0001
Severe	30/262 (12%)	20/74 (27%)	
Very severe / critically ill	19/262 (7%)	11/74 (15%)	
Treatment			
Treated patients (any drug treatment)	113/174 (65%)	49/63 (78%)	0.06
Oxygen therapy	53/137 (39%)	40/56 (71%)	<0.0001
Aggressive pharmacological treatment ²	34/202 (17%)	23/64 (36%)	0.001
Anti-viral therapy ³	10/121 (8%)	13/47 (28%)	0.002
ICU support	10/192 (5%)	9/65 (14%)	0.02
Outcome			
Deaths (directly related to COVID-19)	3/187 (2%)	2/63 (3%)	0.95

None of the patients included in the study had been previously vaccinated against SARS-CoV-2. Results expressed as number of cases (percentage), or *as mean ± one standard deviation (SD) and median (IQR), or **as median (IQR) of days from admission until either discharged from hospital or death. Statistically significant p-values (≤0.05) are highlighted in bold. ¹Criteria for disease classification: asymptomatic/paucisymptomatic, absence of symptoms during the infection; mild, patients who had mild symptomatic disease and did not require admission to the hospital; moderate, patients who were hospitalized with symptoms of moderate disease requiring no or low-flow oxygen therapy; severe, patients with severe

disease due to respiratory failure or other organ dysfunction, as determined by a Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score >2, who received per protocol tocilizumab and/or intravenous corticosteroids; and very severe/critically ill, patients with critical disease who required mechanical ventilation, admission to an intensive care unit (ICU) and/or died because of COVID-19 ²Anti-interleukin receptors drugs and/or intravenous corticosteroids. ³Lopinavir/Ritonavir or Remdesivir. Abbreviations (alphabetical order): AI, autoimmune; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SD, standard deviation.

Supplementary Table 2. Fluorochrome-conjugated antibody combinations and gating strategy used for flow cytometric identification of subsets of leukocytes and B cells in blood of each subject included in this study.

A. LST (EuroFlow[®] Lymphocyte Screening Tube) BD OneFlow LST[™] 8-color tube used for the identification of PB leukocyte populations.

Fluorochrome	V450	V500-C	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD20 CD4	CD45	CD8 Anti-λ	CD56 Anti-κ	CD5	CD19 Anti-TCRγδ	CD3	CD38
Clone	L27 SK3	2D1	SK1 1-155-2	MY31 TB28-2	L17F12	SJ25-C1 11F2	SK7	HB7
Source	BD							

Abbreviations (alphabetical order), APC, allophycocyanine; APC-H7, allophycocyanine-hilite[®]7; BD, Becton/Dickinson Biosciences; FITC, fluorescein isothiocyanate; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PECy7, phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5.

B. Immunophenotypic profiles and criteria used for the identification of the major white blood cell subpopulations identified with LST.

Cell population	T-cells	B-cells	NK-cells	Plasma cells	Neutrophils	Eosinophils	Basophils	Monocytes	Dendritic cells
FSC	low	low	low	int	int / high	int	low	int	low / int
SSC	low	low	low	int	high	very high	low	int	low / int
CD45	++	++	++	low	+	+	low	+	+
CD3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CD19	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CD4	- / +	-	-	-	-	-	-	+	+
CD8	- / +	-	low / +	-	-	-	-	-	-
TCRγδ	- / +	-	-	-	-	-	-	-	-
CD20	-	+	-	- / low	-	-	-	-	-
CD5	+++	- / low	-	-	-	-	-	-	het
CD56	het	-	low / +	-	-	-	-	-	-
CD38	het	- / low	het	++	-	-	+	low / +	+

Data on phenotypic profiles summarized according to reference 5 of Supplementary References. Abbreviations (alphabetical order): FSC, forward light scatter; het, heterogeneous; int, intermediate; NK, natural killer; SSC, side light scatter.

C. EuroFlow® IMM-BIgh 13-color tube used for the identification of different PB B-cell subsets.

Fluoro-chrome	BV421	BV510	BV605	BV650	BV711	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PECy7	APC	AF700	APC-H7
Marker	CD27	sm/cyIgM	CD62L	CD24	CD21	CD19	sm/cyIgG3 sm/cyIgG2 sm/cyIgD	sm/cyIgA1 sm/cyIgA2	sm/cyIgG1 sm/cyIgG2	CD20	CD138 CD5	sm/cyIgG4 sm/cyIgA1 sm/cyIgD	CD45	CD38
Clone	M-T271	MHM-88	DREG 56	ML5	B-ly4	SJ25C1	SAG3 SAG2 IA6-2	SAA1 SAA2	SAG1 SAG2	2H7	MI15 L17F12	SAA1 SAG4 IA6-2	HI30	HB7
Source	BD	Bio-legend	Bio-legend	BD	BD	BD	Cytognos Biolegend	Cytognos	Cytognos	BD	Bio-legend BD	Cytognos BD	BD	BD

Abbreviations (alphabetical order), AF, alexa fluor; APC, allophycocyanine; APC-H7, allophycocyanine-hilite®7; BV, brilliant violet; cy, cytoplasmic; FITC, fluorescein isothiocyanate; IMM, immune monitoring; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PE-CF594, phycoerythrin-carboxyfluorescein594; PECy7, phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5; sm, surface membrane.

D. Immunophenotypic profiles and criteria used for the subsetting of the different B-cell and plasma cell subpopulations identified with IMM-BIgh tube.

Cell population	Pre-GC B-cells		Memory B-cells		Plasma cells
	Immature	Naïve	Unswitched memory	Switched memory	
FSC	low	low	low	low	int
SSC	low	low	low	low	int
CD45	++	++	++	++	low
CD19	+	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+	- / +
CD21	+	- / +	- / +	- / +	-
CD24	++	-	-	-	-
CD27	-	-	+	- / +	+
CD38	+	-	-	-	++
CD138	-	-	-	-	- / +
CD5	+	- / +	-	-	-
IgM/D	+	+	+	-	- / +

Data on the phenotypic profiles of individual cell populations is summarized according to reference 24 of the main text. Further subdivisions of memory B-cells and plasma cells were performed according to IgH subclass expression (IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2). Abbreviations (alphabetical order): FSC, forward light scatter; GC, germinal center; int, intermediate; NK, natural killer; SSC, side light scatter.

E. EuroFlow® IMM-IMC 13-color tube used for the identification of different PB dendritic cell subsets.

Fluoro- chrome	BV421	BV510	BV605	BV650	BV711	BV786	BB515	PerCP- Cy5.5	PE	PE- CF594	PECy7	APC	AF700	APC-H7
Marker	CD141	CD5	CD192	CD62L	HLA- DR	CD16	CD1c	CD36	Slan FcεRI	CD34	CD33	CD300e CD303	CD45	CD14
Clone	1A4	UCHT-2	K036C2	DREG56	G46-6	3G8	F10/21 A3	CLB- IVC7	DD-1 AER-37	581	P67.6	UP-H2 AC144	HI30	MφP9
Source	BD	BD	Bio- legend	Bio- legend	BD	BD	BD	Immuno- step	Miltenyi BD	BD	BD	Immuno- step Miltenyi	BD	BD

Abbreviations (alphabetical order): AF, alexa fluor; APC, allophycocyanine; APC-H7, allophycocyanine-hilite®7; BB, brilliant blue; BV, brilliant violet; cy, cytoplasmic; FcεRI, high affinity IgE receptor; IMC, immune myeloid cells; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PE-CF594, phycoerythrin-carboxyfluorescein594; PECy7, phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5.

F. Immunophenotypic profiles and criteria used for the subsetting of the different dendritic cell subpopulations identified in with EuroFlow IMM- IMC tube.

Cell population	pDC	mDC	
		CD1c	CD141
FSC	low / int	low / int	low / int
SSC	low / int	low / int	low / int
CD45	+	+	+
CD1c	-	+	-
CD5	-	het	low
CD14	-	-	-
CD16	-	-	-
CD33	-	++	++
CD141	+	low	++
CD192	+	+	+
HLA-DR	++	++	++
FcεRI	low / +	+	-

Data on the phenotypic profiles of the different cell populations is summarized according to reference 25 of the main text. Abbreviations (alphabetical order): FSC, forward scatter; int, intermediate; mDC, myeloid dendritic cells; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid dendritic cells; SSC, side scatter.

Supplementary Table 3. Percentage of MBL^{lo} samples showing altered numbers in blood of the major leukocyte subpopulations at each time-point evaluated during and after COVID-19.

Cell population	Time since the onset of COVID-19 symptoms					P-value
	Week +1 (n=20)	Week +2 (n=57)	Week +3-4 (n=35)	Week +5-7 (n=23)	Week +8-43 (n=44)	
WBC						
% cases ↑95 th p	65%**	28%	40%*	13%	14%	0.0002
% cases ↓5 th p	5%	11%	6%	9%	0%	0.27
Neutrophils						
% cases ↑95 th p	70%	46%	51%**	13%	9%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	5%	3%	17%	16%	0.05
Eosinophils						
% cases ↑95 th p	0%	4%	0%	9%	0%	0.13
% cases ↓5 th p	60%**	89%***	49%	30%	25%	≤0.0001
Basophils						
% cases ↑95 th p	10%	2%	0%***	30%	16%	0.0003
% cases ↓5 th p	45%**	79%*	54%	26%**	11%	≤0.0001
Monocytes						
% cases ↑95 th p	35%	26%	26%	39%	34%	0.72
% cases ↓5 th p	10%	5%	3%	0%	0%	0.22
Dendritic cells						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	9%	16%	0.002
% cases ↓5 th p	60%	70%	71%***	17%	11%	≤0.0001
Lymphocytes						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	9%	16%	N.A.
% cases ↓5 th p	40%	42%	31%	22%*	2%	0.0002
T-cells						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	0%	11%	N.A.
% cases ↓5 th p	45%	54%	40%	26%*	5%	≤0.0001
Total TCRαβ						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	4%	16%	N.A.
% cases ↓5 th p	45%	53%	37%	26%*	5%	≤0.0001
TCRαβ CD4+						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	0%*	18%	N.A.
% cases ↓5 th p	35%	37%	26%	17%	5%	0.003
TCRαβ CD8+						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	4%	14%	N.A.
% cases ↓5 th p	25%	32%	23%	13%	5%	0.01
TCRαβ CD4-CD8-						
% cases ↑95 th p	0%	2%	0%	0%	5%	N.A.
% cases ↓5 th p	80%	67%	60%*	26%	11%	≤0.0001
TCRγδ						
% cases ↑95 th p	10%	2%	0%	0%	5%	N.A.
% cases ↓5 th p	35%	46%	37%	22%*	5%	0.0002
NK-cells						
% cases ↑95 th p	0%	0%	0%	0%	9%	N.A.
% cases ↓5 th p	5%	26%	14%	0%	7%	0.006
B-cells						
% cases ↑95 th p	5%	9%	9%	0%	14%	0.41
% cases ↓5 th p	10%	12%	14%	13%	2%	0.38
Plasma cells						
% cases ↑95 th p	60%*	86%	89%***	26%**	2%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	0%	0%	0%	0%	N.A.

Results expressed as percentage of samples with values for each cell subset above the 95th percentile and below the 5th percentile observed in age-matched non-MBL healthy donors. Numbers colored in red or blue denote statistically significant differences ($p \leq 0.05$) vs. the percentage of healthy donors above or under the 95th percentile and 5th percentile values, respectively. Numbers in bold show statistically significant differences ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$) vs. the immediately subsequent time-interval. P-value in the last column indicates whether the general trendline per cell population significantly ($p \leq 0.05$) changed throughout the period of time analyzed. Abbreviations (alphabetical order): MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis; N.A., not applicable; NK, natural killer; p, percentile; TCR, T-cell receptor; WBC, white blood cells.

Supplementary Table 4. Percentage of MBL^{lo} samples showing altered numbers of different subsets of B-cell in blood at each time-point evaluated during and after COVID-19.

Cell population	Time since the onset of COVID-19 symptoms					P-value
	Week +1 (n=20)	Week +2 (n=54)	Week +3-4 (n=35)	Week +5-7 (n=20)	Week +8-43 (n=40)	
Pre-GC B-cells						
% cases ↑95 th p	0%	11%	11%	0%	10%	0.31
% cases ↓5 th p	30%	13%	14%	15%	8%	0.23
Immature B-cells						
% cases ↑95 th p	0%	15%	11%	0%	15%	0.16
% cases ↓5 th p	40%**	9%	9%*	40%*	10%	0.0003
CD5+ Naive B-cells						
% cases ↑95 th p	10%	15%	11%	0%	18%	0.38
% cases ↓5 th p	45%	31%	20%	25%	8%	0.01
CD5- Naive B-cells						
% cases ↑95 th p	0%	11%	11%	0%	8%	0.30
% cases ↓5 th p	35%*	13%	17%	20%	10%	0.14
Memory B-cells						
% cases ↑95 th p	10%	19%	26%	5%	5%	0.06
% cases ↓5 th p	35%	26%**	3%	10%	13%	0.008
<i>MBC IgH isotype and subclass expression</i>						
IgMD MBC						
% cases ↑95 th p	5%	9%	11%	5%	5%	0.79
% cases ↓5 th p	20%	30%	11%	25%	18%	0.31
IgG1 MBC						
% cases ↑95 th p	5%	17%	26%	5%	10%	0.11
% cases ↓5 th p	45%	33%**	9%	10%	13%	0.001
IgG2 MBC						
% cases ↑95 th p	0%	7%	14%	0%	5%	0.17
% cases ↓5 th p	25%	9%	3%	15%	8%	0.10
IgG3 MBC						
% cases ↑95 th p	5%	11%	20%	10%	13%	0.55
% cases ↓5 th p	55%	31%	14%	35%*	10%	0.001
IgG4 MBC						
% cases ↑95 th p	0%	6%	9%	0%	5%	N.A.
% cases ↓5 th p	10%	6%	6%	15%	13%	0.60
IgA1 MBC						
% cases ↑95 th p	15%	24%	20%	10%	18%	0.69
% cases ↓5 th p	25%	24%	9%*	35%*	10%	0.05
IgA2 MBC						
% cases ↑95 th p	10%	9%	6%	5%	10%	0.93
% cases ↓5 th p	25%	24%	17%	20%	13%	0.65
IgD MBC						
% cases ↑95 th p	5%	11%	9%	10%	8%	0.93
% cases ↓5 th p	0%	7%	0%	5%	8%	N.A.
<i>MBC CD27 and CD21 expression</i>						
CD27⁺CD21⁺ MBC						
% cases ↑95 th p	10%	15%	14%	5%	5%	0.48
% cases ↓5 th p	25%	26%*	9%	30%	13%	0.13
CD27⁺CD21⁻ MBC						
% cases ↑95 th p	10%	13%	20%	10%	18%	0.76
% cases ↓5 th p	15%	13%	6%	5%	8%	0.61
CD27⁻CD21⁺ MBC						
% cases ↑95 th p	5%	13%	20%*	0%	10%	0.18
% cases ↓5 th p	45%*	19%	17%	20%	20%	0.13
CD27⁻CD21⁻ MBC						
% cases ↑95 th p	5%	19%	26%	20%	13%	0.32
% cases ↓5 th p	65%	46%	26%	35%	18%	0.002

Results expressed as percentage of samples with values for each cell subset above the 95th percentile and below the 5th percentile observed in age-matched non-MBL healthy donors. Numbers colored in red, or blue denote statistically significant differences ($p \leq 0.05$) vs. the percentage of healthy donors above or under the 95th percentile and 5th percentile values, respectively. Numbers in bold show statistically significant differences ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$) vs. the immediately subsequent time-interval. P-value in the last column indicates whether the general trendline per cell population significantly ($p \leq 0.05$) changed throughout the period of time analyzed. Abbreviations (alphabetical order): Ig, immunoglobulin; MBC, memory B-cell; MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis; N.A., not applicable; p, percentile.

Supplementary Table 5. Percentage of MBL^{lo} samples showing altered numbers in blood of different subsets of plasma cell at each time-point evaluated during and after COVID-19.

Cell population	Time since the onset of COVID-19 symptoms					P-value
	Week +1 (n=20)	Week +2 (n=54)	Week +3-4 (n=35)	Week +5-7 (n=20)	Week +8-43 (n=40)	
<i>PC IgH isotype and subclass expression</i>						
IgM PC						
% cases ↑95 th p	40%	59%	51%***	5%	0%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	0%	0%	0%	15%	N.A.
IgG1 PC						
% cases ↑95 th p	55%*	85%	86%*	50%**	10%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	0%	0%	0%	18%	N.A.
IgG2 PC						
% cases ↑95 th p	25%	37%	54%	40%**	8%	0.0004
% cases ↓5 th p	0%	2%	3%	0%	8%	N.A.
IgG3 PC						
% cases ↑95 th p	25%**	65%	83%***	15%	8%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	0%	0%	0%	5%	N.A.
IgG4 PC						
% cases ↑95 th p	25%	28%*	54%	35%	15%	0.006
% cases ↓5 th p	5%	0%	0%	0%	5%	N.A.
IgA1 PC						
% cases ↑95 th p	60%	72%	80%***	20%	5%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	0%	0%	0%	0%	8%	N.A.
IgA2 PC						
% cases ↑95 th p	35%	30%	20%	20%	5%	0.03
% cases ↓5 th p	0%	6%	6%	0%	10%	N.A.
IgD PC						
% cases ↑95 th p	30%	26%	46%	25%*	5%	0.002
% cases ↓5 th p	0%	2%	0%	0%	8%	N.A.
<i>PC maturation stage expression</i>						
CD20⁺CD138⁻ PC						
% cases ↑95 th p	15%	19%	26%	25%	15%	0.73
% cases ↓5 th p	0%	13%	23%	5%	15%	0.12
CD20⁻CD138⁻ PC						
% cases ↑95 th p	25%*	56%	49%	35%	15%	0.0007
% cases ↓5 th p	0%	9%	26%	5%	8%	0.02
CD20⁻CD138⁺ PC						
% cases ↑95 th p	65%	85%	89%*	60%***	15%	≤0.0001
% cases ↓5 th p	10%	7%	0%	5%	10%	0.44

Results expressed as percentage of samples with values for each cell subset above the 95th percentile and below the 5th percentile observed in age-matched non-MBL healthy donors. Numbers colored in red, or blue denote statistically significant differences ($p \leq 0.05$) vs. the percentage of healthy donors above or under the 95th percentile and 5th percentile values, respectively. Numbers in bold show statistically significant differences ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$) vs. the immediately subsequent time-interval. P-value in the last column indicates whether the general trendline per cell population significantly ($p \leq 0.05$) changed throughout the period of time analyzed. Abbreviations (alphabetical order): Ig, immunoglobulin; MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis; N.A., not applicable; p, percentile; PC, plasma cell.

Supplementary Table 6. Percentage of MBL^{lo} positive samples of SARS-CoV-2 specific antibodies in plasma at each time-point evaluated during and after COVID-19.

Anti-SARS-CoV-2 Abs	Time since the onset of COVID-19 symptoms						P-value
	Week +1	Week +2	Week +3-4	Week +5-7	Week +8-12	Week +13-43	
Anti-Spike (n=155)	<i>n=20</i>	<i>n=56</i>	<i>n=33</i>	<i>n=21</i>	<i>n=19</i>	<i>n=6</i>	
IgM							
% of positive cases	80%	95%*	100%	100%	95%	67%	<i>N.A.</i>
IgG							
% of positive cases	70%	89%	100%	100%	100%	83%	<i>N.A.</i>
IgA							
% of positive cases	75%	86%	97%	95%	89%	50%	<i>N.A.</i>
Anti-Nucleocapsid (n=176)	<i>n=20</i>	<i>n=56</i>	<i>n=33</i>	<i>n=23</i>	<i>n=28</i>	<i>n=16</i>	
IgM							
% of positive cases	35%*	66%	85%***	35%	18%	0%	≤0.0001
IgG							
% of positive cases	85%	88%*	100%	96%	93%	81%	<i>0.18</i>
IgA							
% of positive cases	70%*	91%	100%*	83%	75%**	25%	≤0.0001

Results expressed as percentage of positive cases for each antibody analyzed. Numbers in bold show statistically significant differences (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$) vs. the immediately subsequent time-interval. P-value in the last column indicates whether the general trendline of positive cases significantly ($p \leq 0.05$) changed throughout the period of time analyzed, per specific Ab isotype. Abbreviations (alphabetical order): Abs, antibodies; Ig, immunoglobulin; MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis; N.A., not applicable.

Supplementary Table 7. Distribution of the major populations of white blood cell identified with a hematological analyzer in both MBL^{lo} and non-MBL COVID-19 patients during and after COVID-19.

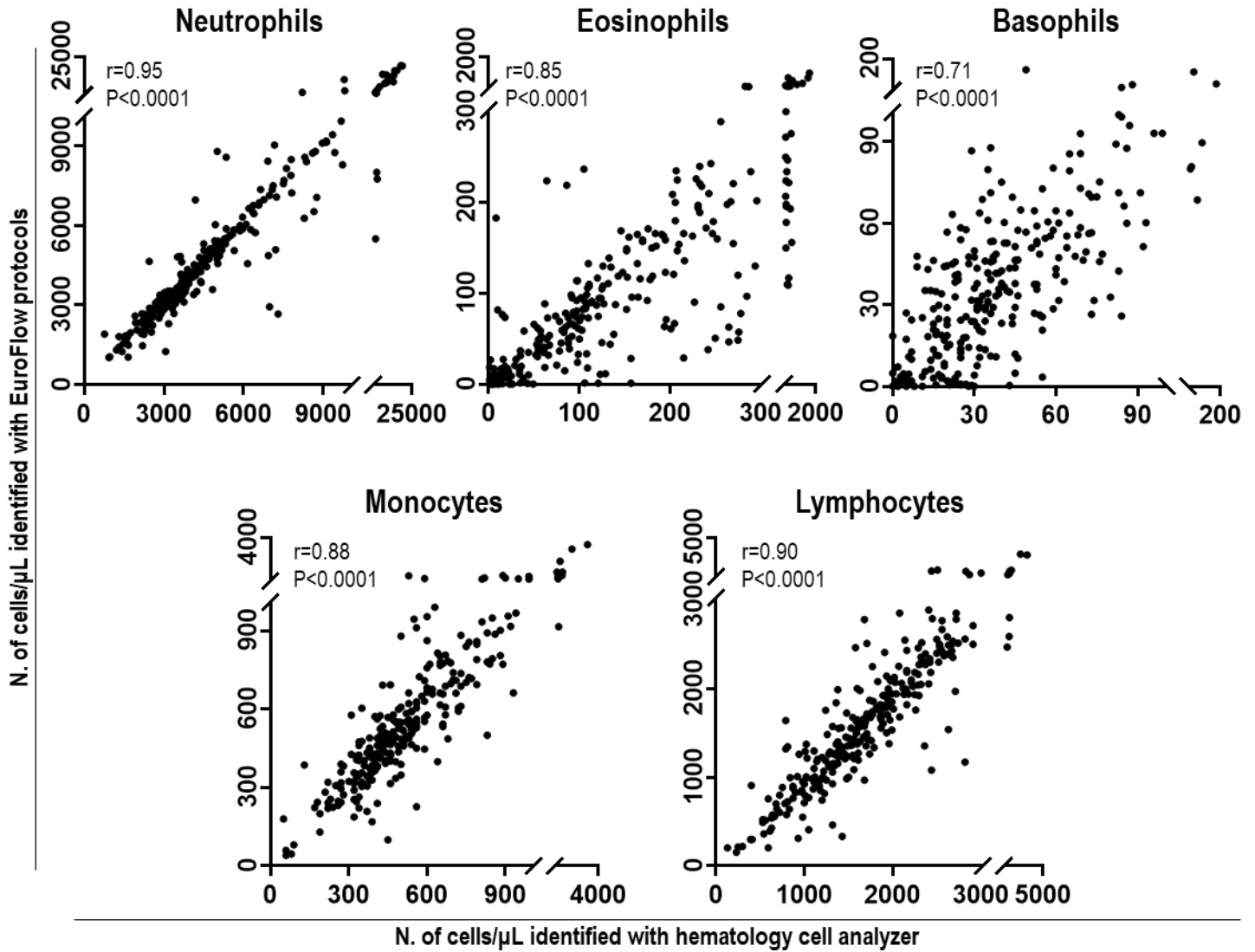
Cell population	<i>Time since the onset of COVID-19 symptoms</i>											
	Week +1		Week +2		Week +3-4		Week +5-7		Week +8-12		Week +13-43	
	Non-MBL (n=58)	MBL ^{lo} (n=20)	Non-MBL (n=90)	MBL ^{lo} (n=57)	Non-MBL (n=34)	MBL ^{lo} (n=35)	Non-MBL (n=61)	MBL ^{lo} (n=23)	Non-MBL (n=137)	MBL ^{lo} (n=28)	Non-MBL (n=117)	MBL ^{lo} (n=16)
WBC	6510 (4595 – 8340)	10775 (8788 – 14275)	7950 (5770 – 9980)	7820 (6125 – 10210)	7370 (6063 – 10060)	8400 (7070 – 11500)	6640 (5310 – 7895)	5730 (5170 – 8420)	6360 (5590 – 7430)	5760 (5000 – 8118)	6560 (5390 – 7755)	7925 (6545 – 9245)
Neutrophils	4432 (2850 – 7078)	9421 (5787 – 12445)	6191 (3588 – 8403)	6577 (4199 – 7801)	5562 (3237 – 7836)	6492 (4391 – 10017)	4076 (2823 – 5095)	3888 (2547 – 5036)	3594 (2937 – 4462)	3426 (2499 – 5187)	3560 (2847 – 4650)	4389 (3640 – 5126)
Eosinophils	18.4 (1.25 – 66.6)	11.5 (1.55 – 206)	6.1 (0.85 – 47.9)	2.77 (0.45 – 20.3)	52.3 (2.6 – 95.3)	48 (10.6 – 110)	120 (75.7 – 222)	113 (44 – 168)	83.3 (46.5 – 160)	104 (53 – 172)	76.9 (47.8 – 121)	97.7 (54.1 – 187)
Basophils	14.2 (4.7 – 33.2)	22.5 (3.76 – 44.6)	4.4 (1.3 – 14.1)	3 (0.65 – 5.7)	6.5 (0.66 – 27.4)	13.5 (1 – 30)	43.9 (29.2 – 64.1)	46.2 (21.4 – 70.7)	40.4 (27.1 – 53)	52.5 (30.4 – 66.3)	44.5 (31.3 – 60.8)	65.2 (35.1 – 86)
Monocytes	479 (349 – 633)	541 (293 – 661)	473 (303 – 740)	458 (320 – 696)	527 (442 – 737)	499 (357 – 688)	506 (395 – 713)	630 (474 – 891)	490 (396 – 619)	540 (431 – 772)	400 (334 – 511)	538 (439 – 796)
Lymphocytes	1110 (787 – 1559)	1126 (625 – 1350)	1088 (729 – 1638)	945 (719 – 1265)	1491 (1008 – 2180)	1131 (788 – 1658)	1878 (1532 – 2131)	1413 (956 – 1961)	2026 (1560 – 2500)	1868 (1482 – 2499)	2348 (1484 – 2911)	2847 (2280 – 3091)

Results expressed as median (IQR) absolute number of cells/ μ L (assessed using the Sysmex XN-1000TM hematology cell analyzer). Numbers in bold denoted statistically significant differences vs. normal ranges, adjusted by age. Abbreviations: IQR, interquartile range; MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis; WBC, white blood cells

Supplementary Table 8. Samples with detectable SARS-CoV-2 viral load in plasma within the non-MBL and MBL^{lo} groups of patients at each time-point evaluated during and after COVID-19.

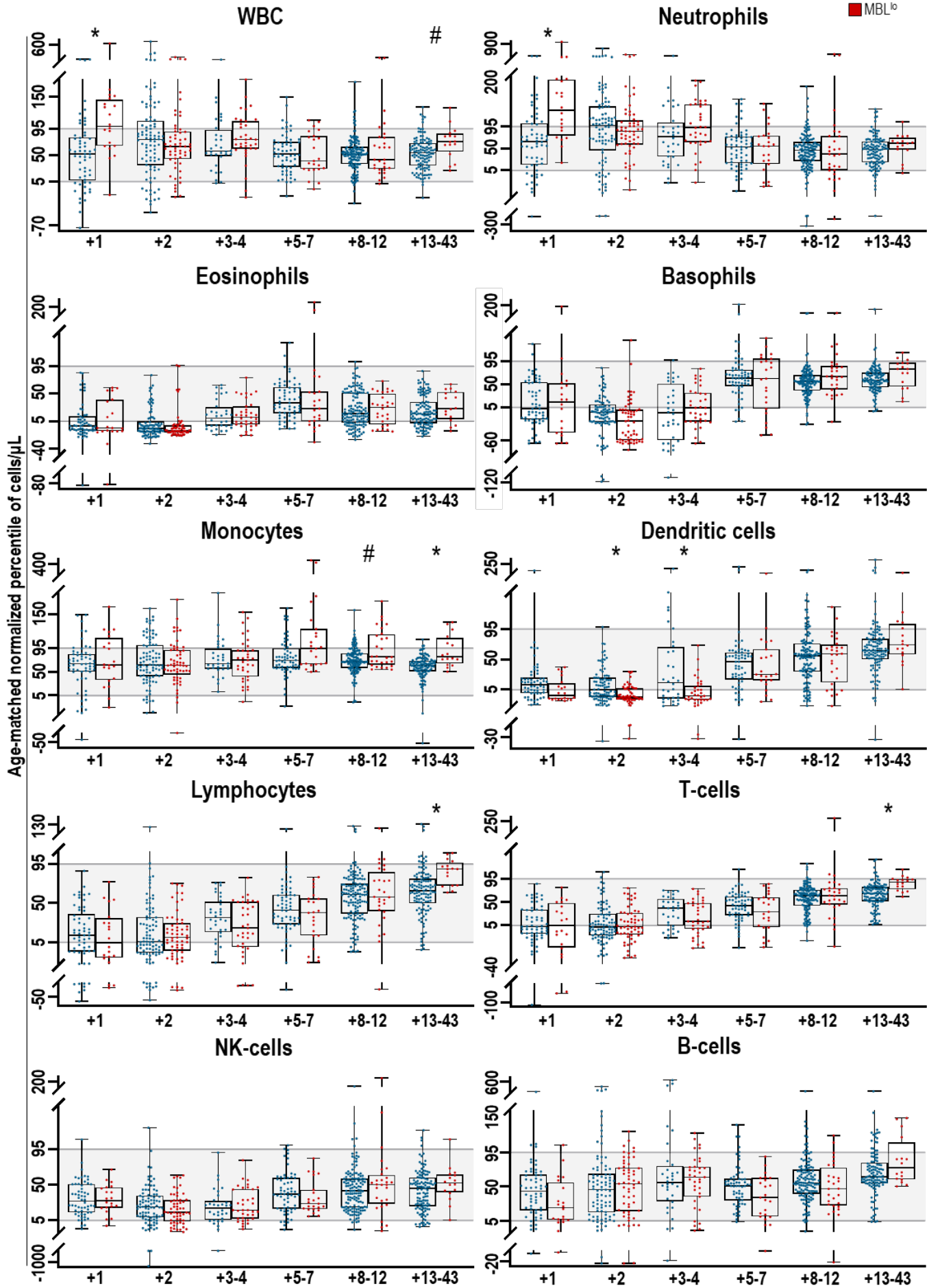
<i>Time since the onset of COVID-19 symptoms</i>	<i>Samples with detectable viral load</i>		
	Non-MBL	MBL ^{lo}	p-value
Week +1	6/46 (13%)	7/20 (35%)	0.05
Week +2	19/76 (25%)	10/52 (19%)	0.52
Week +3-4	3/20 (15%)	4/19 (21%)	0.69
Week +5-43	5/27 (19%)	3/19 (16%)	>0.99

Results expressed as number of positive samples (percentage). Abbreviations: MBL^{lo}, monoclonal B-cell lymphocytosis.



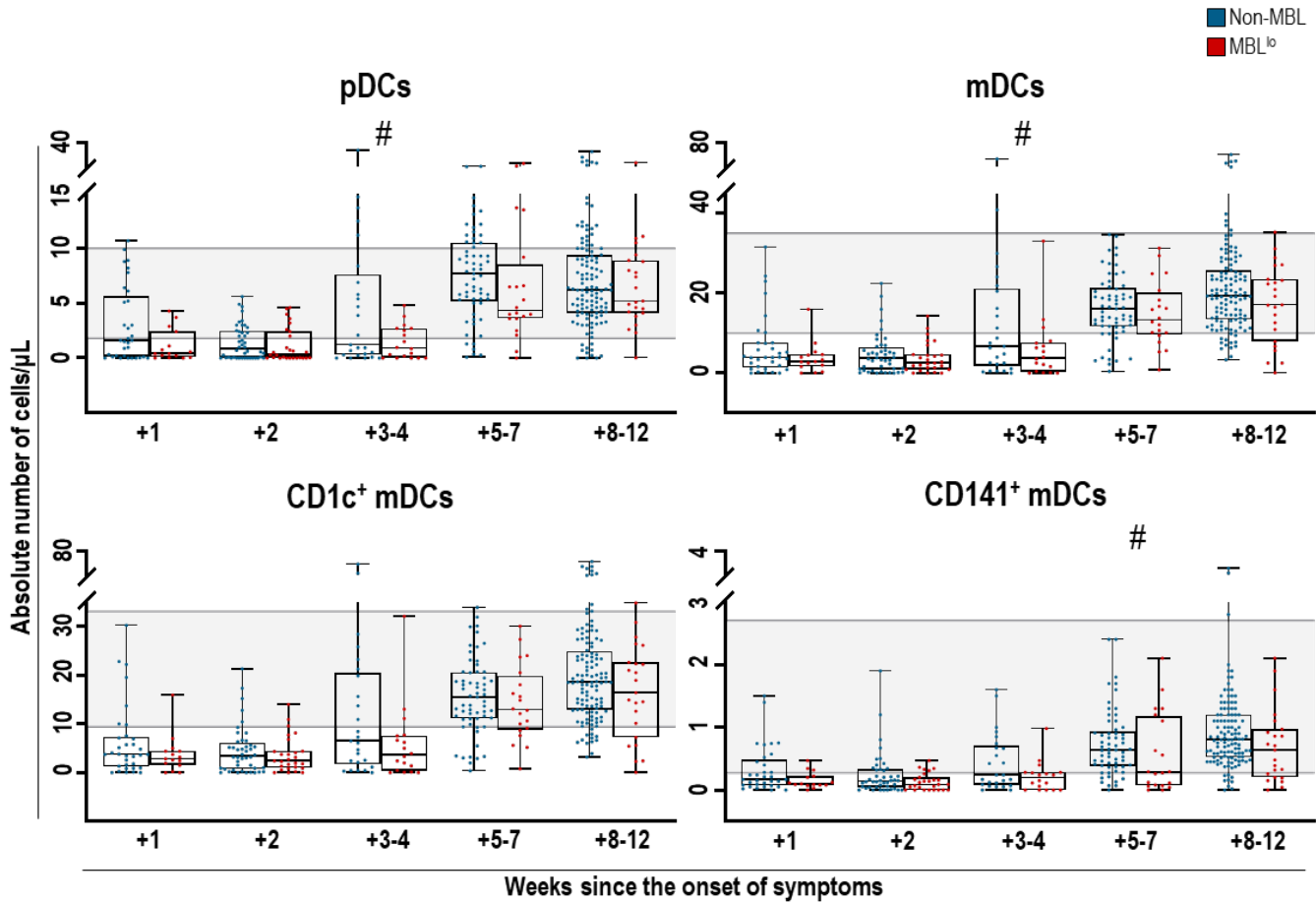
Supplementary Figure 1. Correlation plots between the number of cells/ μ L obtained for the major populations of leukocytes identified in COVID-19 patient samples with a hematology cell analyzer vs. a flow cytometer based on the EuroFlow panels and protocols. Abbreviations: N., number; P, p-value; r, coefficient of correlation (Spearman's Rho coefficient).

■ Non-MBL
■ MBL^{lo}

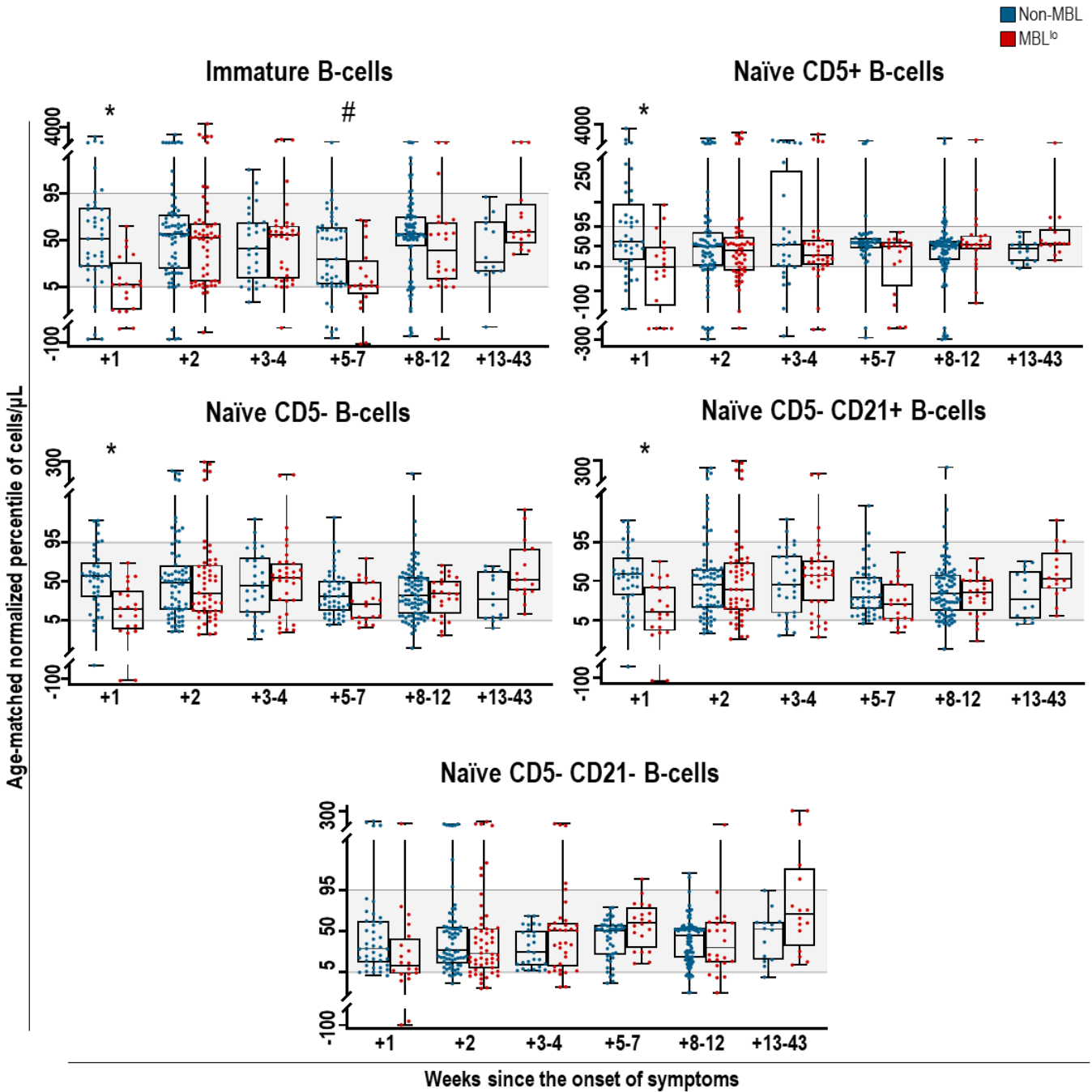


Weeks since the onset of symptoms
Supplementary Material Pg. 15 / 24

Supplementary Figure 2. Kinetics of the major populations of leukocytes in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL patients during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μL for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time-intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between non-MBL vs. MBL^{lo} subjects; # tendency for statistical differences ($p > 0.05$ and ≤ 0.10). Abbreviations: HD, healthy donor; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

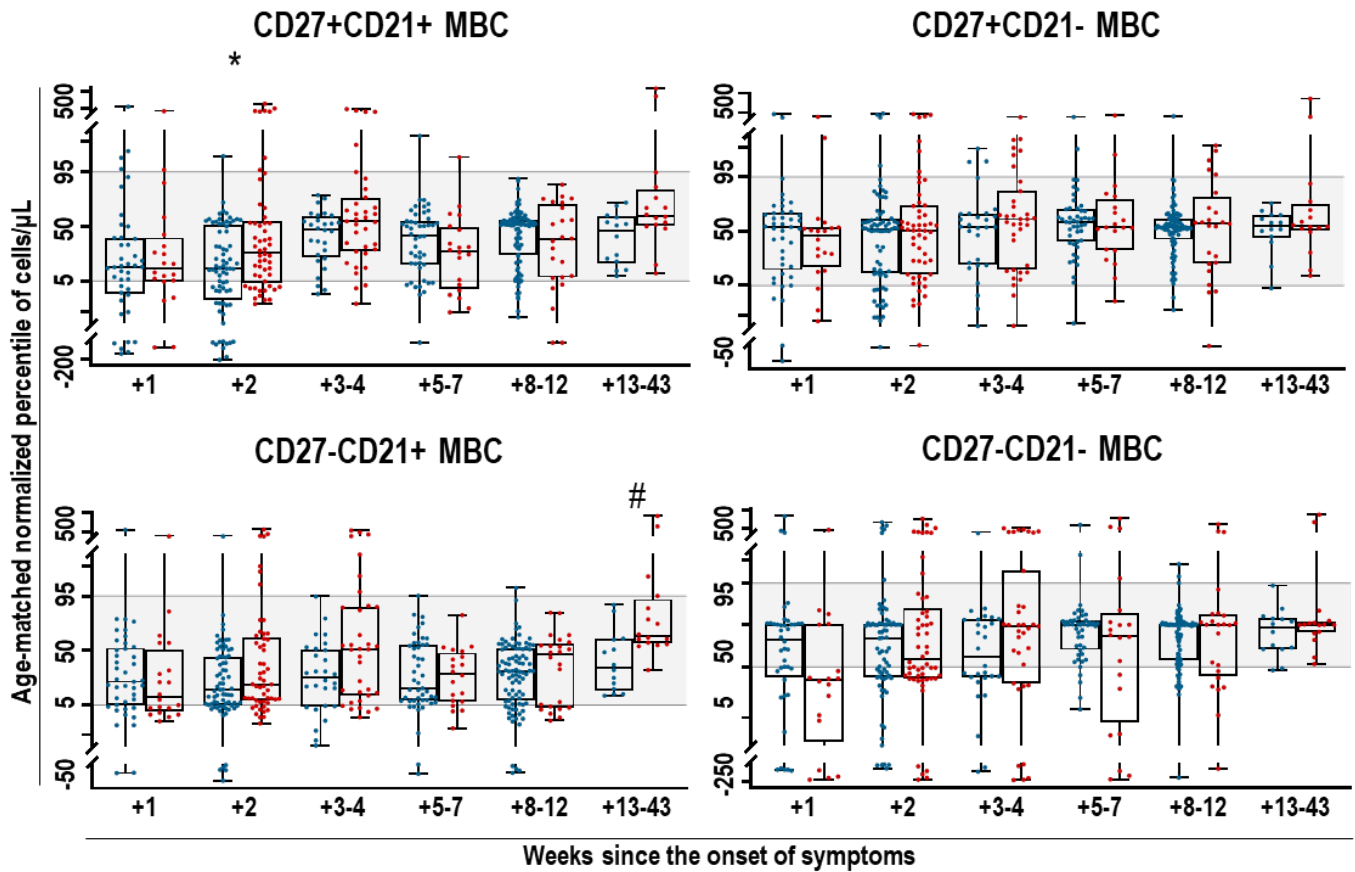


Supplementary Figure 3. Kinetics of the different dendritic cell subsets identified in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL patients during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/μL for each individual cell population analyzed. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time-intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12. Notched boxes represent the 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL HD. # tendency for statistical differences ($p > 0.05$ and ≤ 0.10). Abbreviations: IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; mDC, myeloid dendritic cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells.



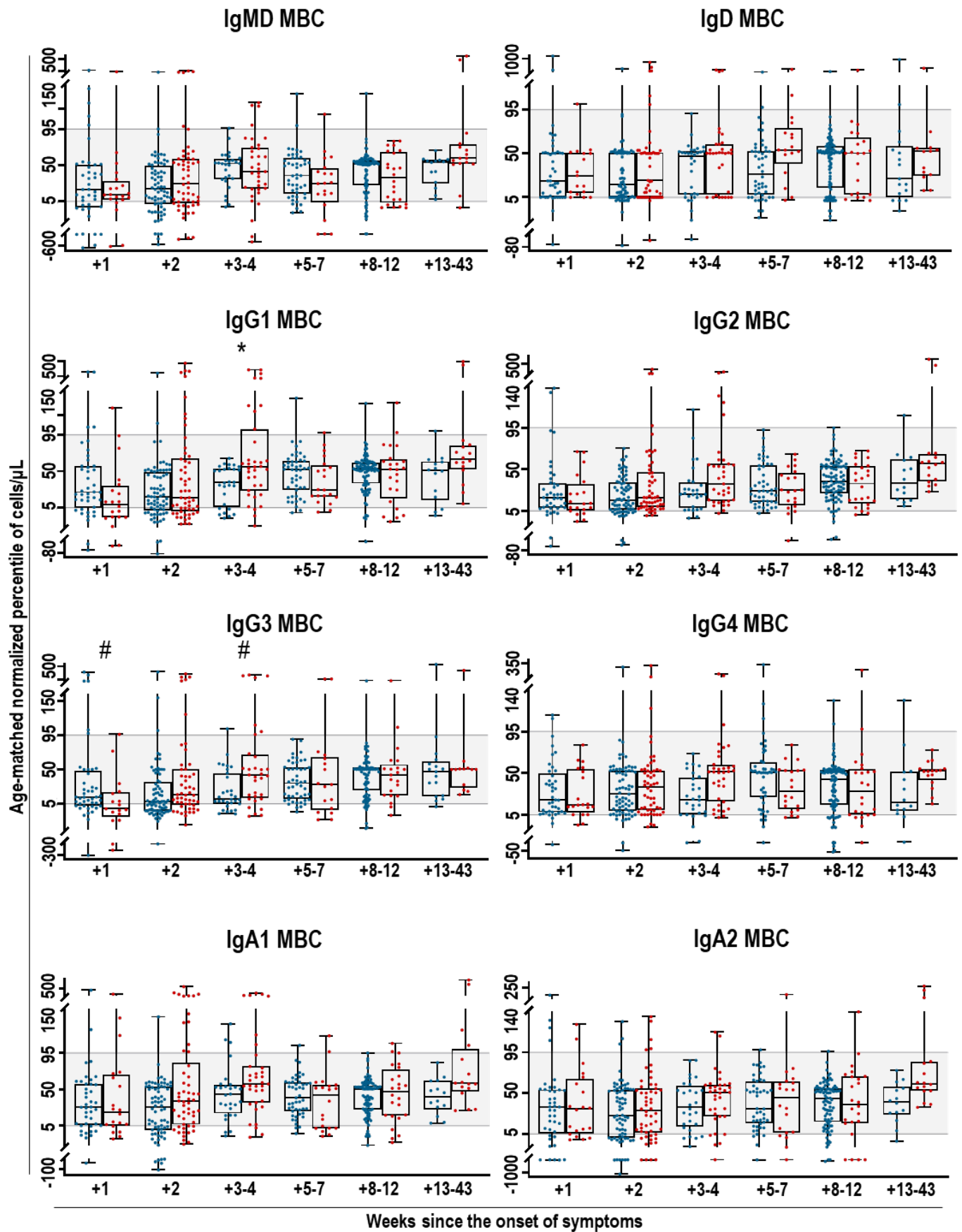
Supplementary Figure 4. Kinetics of pre-germinal center B-cell subsets in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μL for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time-intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between non-MBL vs. MBL^{lo} subjects; # tendency for statistical differences ($p > 0.05$ and ≤ 0.10). Abbreviations: HD, healthy donor; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

■ Non-MBL
 ■ MBL^{lo}

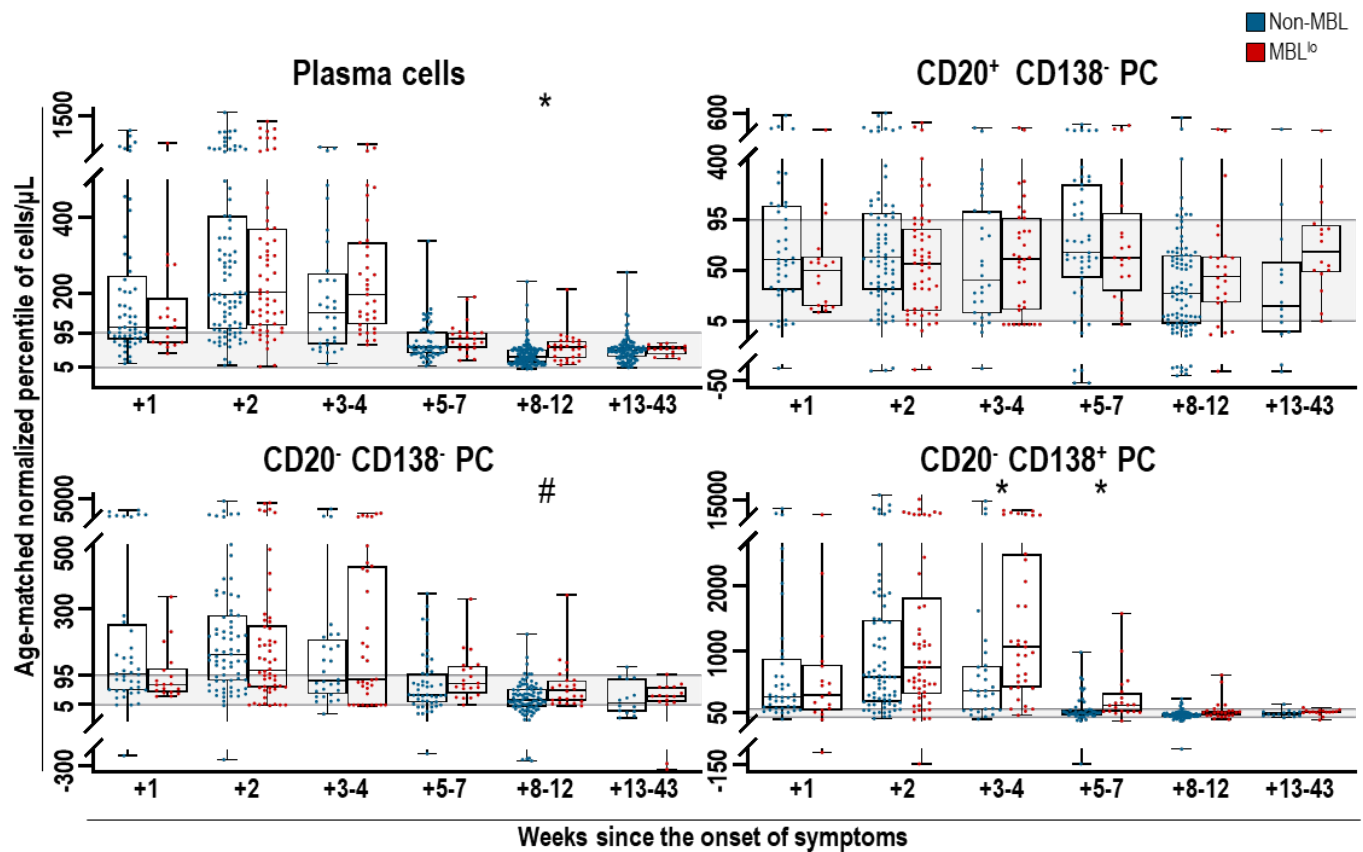


Supplementary Figure 5. Kinetics of memory B-cell subsets defined by their CD27 and CD21 expression profile in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/μL for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/μL for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences (p ≤ 0.05) between non-MBL vs. MBL^{lo} subjects; # tendency for statistical differences (p > 0.05 and ≤ 0.10). Abbreviations: HD, healthy donor; IQR, interquartile range; MBC, memory B-cells; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

■ Non-MBL
■ MBL^{lo}

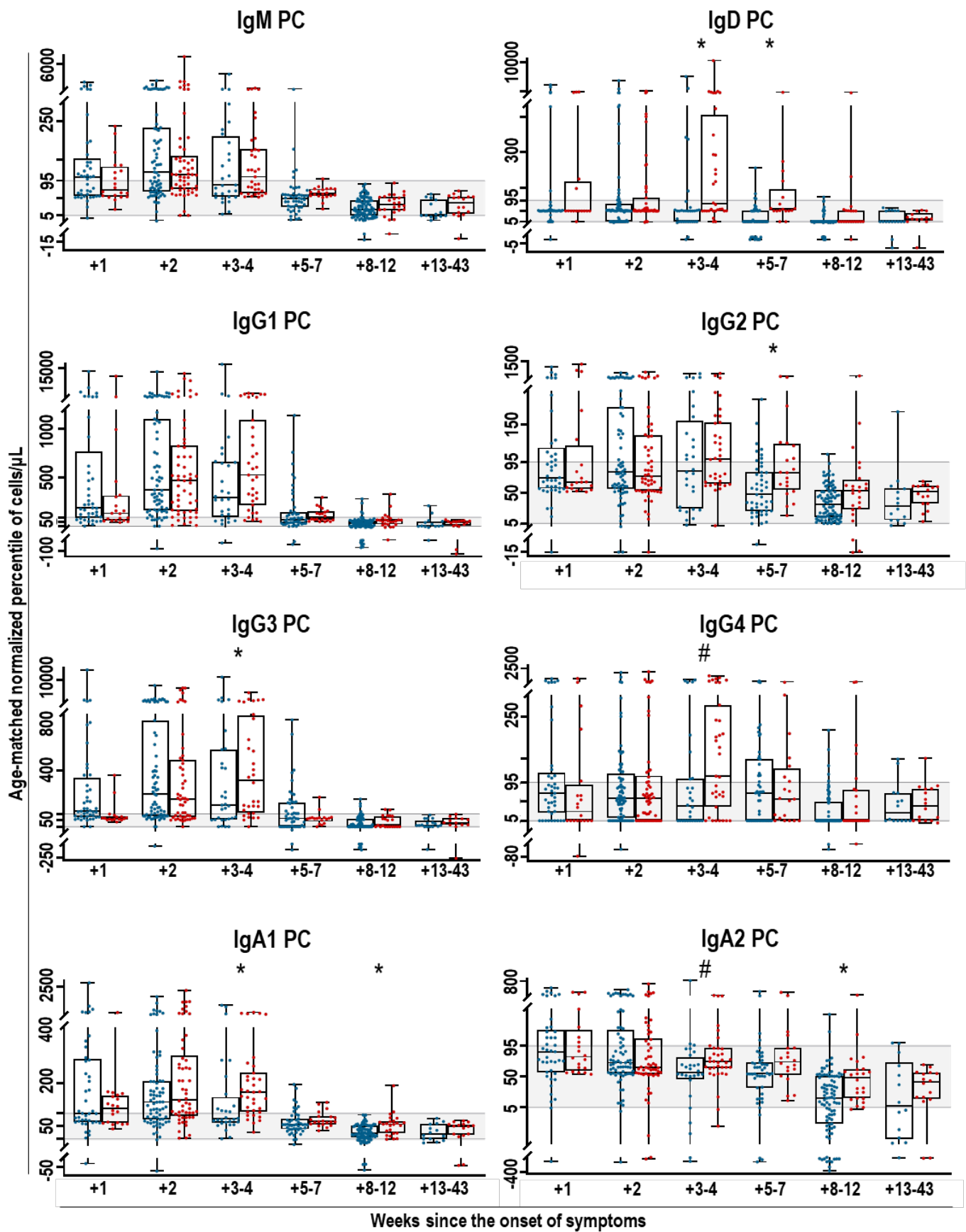


Supplementary Figure 6. Kinetics of memory B-cell subsets defined by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μL for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between non-MBL vs. MBL^{lo} subjects; # tendency for statistical differences ($p > 0.05$ and ≤ 0.10). Abbreviations: HD, healthy donor; IgH, immunoglobulin heavy chain; IQR, interquartile range; MBC, memory B-cells; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.



Supplementary Figure 7. Kinetics of different plasma cell subsets in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Data expressed as absolute number (cells/μL) of total plasma cells and their three maturation-associated subsets (less mature CD20⁺CD138⁻, intermediate CD20⁻CD138⁻, and more mature CD20⁻CD138⁺ plasma cell subsets), normalized by age. Data normalization by age is represented based on the absolute number of cells/μL for each population analyzed, using pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum value for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences (p ≤ 0.05) between MBL^{lo} vs. non-MBL subjects; # tendency for statistical differences (p > 0.05 and ≤ 0.10). Abbreviations: AU, arbitrary units; d, days; HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis.

■ Non-MBL
 ■ MBL^{lo}



Weeks since the onset of symptoms

Supplementary Figure 8. Kinetics of different plasma cell subsets defined by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of MBL^{lo} vs. non-MBL subjects during and after COVID-19. Data expressed as absolute cell counts/ μ L for each individual cell population analyzed, normalized by age. Data normalization by age is represented based on the distribution of absolute cell counts/ μ L for each individual population in pre-pandemic age-matched non-MBL HD as reference. Subjects without MBL (blue dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the following time intervals (in weeks) since the onset of symptoms of COVID-19: week +1, +2, +3-4, +5-7, +8-12, and +13-43. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values. Whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 5th-95th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic age-matched non-MBL HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between non-MBL vs. MBL^{lo} subjects; # tendency for statistical differences ($p > 0.05$ and ≤ 0.10). Abbreviations: HD, healthy donor; IgH, immunoglobulin heavy chain; IQR, interquartile range; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; PC, plasma cells.

ARTÍCULO 3

“Cinética a corto plazo de las células del sistema inmune y de anticuerpos específicos de SARS-COV-2 tras vacunación en adultos sanos y en sujetos con linfocitosis B monoclonal de bajo recuento”

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 2).
- iii) Figuras suplementarias (Figuras 1 – 11).

Supplementary Material

1 Supplementary Materials and Methods

Immunophenotypic studies. Peripheral blood (PB) samples (30mL) were collected in K3-EDTA Vacutainer tubes (Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA) and immediately (<6 hours) stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) and the Immunemonitoring (IMM) BIgH tube, using the EuroFlow bulk-lyse-stain-and-then-fix standard operating procedure (SOP), available at www.EuroFlow.org.(1,2) Briefly, non-nucleated red blood cells were lysed with an ammonium chloride solution and washed twice in phosphate buffered saline (PBS; pH=7.4). Then, $>10^7$ white blood cells (WBC) were stained for 30 minutes with the LST (BD OneFlow LST™ reagent, BD), and the BIgH, antibody combinations (Supplementary Table 2A and 2C). Stained cells were subsequently fixed and, in case of the IMM-BIgH tube, stained with the cytoplasmic antibodies using the Fix & Perm Reagent Kit (Nordic-MUBio, Susteren, The Netherlands). For each antibody combination, $\geq 10^7$ cells/tube were measured per sample, in either a FACSCanto II (BD) or a FACSLytic (BD) flow cytometer for the LST stained aliquot of the sample, and in an LSRFortessa X-20 (BD) or a FACSymphony (BD) instrument, for the EuroFlow IMM-BIgH stained sample aliquot. For data analysis, the Automated Gating and Identification (AGI) tool of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used in combination with the EuroFlow LST and IMM-BIgH databases.(3,4) For each cell population, absolute cell counts/ μ L of blood were calculated using a dual-platform approach,(5) based on their relative values (% from all blood leukocytes) obtained with the flow cytometer, and the absolute number of leukocytes measured in a Sysmex XN-1000™ hematology cell analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). For the identification of MBL clones, the presence

of ≥ 20 clustered cells with an aberrant immunophenotype -e.g., CD5⁺ CD20^{lo} surface membrane immunoglobulin (smIg)^{lo} and/or clonal (e.g. smIg κ ⁺ or smIg λ ⁺) restricted profile-, was required.(6)

2 Supplementary References

1. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017 Oct 1;31(10):2094–103. doi: 10.1038/leu.2017.29
2. Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Carbonell C, Lecrevisse Q, Pérez-Pons A, Torres-Valle A, et al. High frequency of low-count monoclonal B-cell lymphocytosis in hospitalized COVID-19 patients. *Blood*. 2023;141(3):309–14. doi: 10.1182/blood.2022017439
3. Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, Hernández J, Fernandez P, Almeida J, et al. EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. *J Immunol Methods*. 2019 Dec 1;475:112662. doi: 10.1016/j.jim.2019.112662
4. Delgado AH, Fluxa R, Perez-andres M, Diks AM, Brink JAMVG Den, Barkoff A, et al. Automated EuroFlow approach for standardized in-depth dissection of human circulating B-cells and plasma cells. *Front Immunol*. 2023;14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1268686
5. Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O’Gorman MRG, Menendez FA, Borowski L, et al. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2010;78(3):194–200. doi: 10.1002/cyto.b.20500
6. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009;114(2):33–7. doi: 10.1182/blood-2009
7. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2208-2219.e16. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.017

3 Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Baseline clinical and biological characteristics of non-MBL HD and MBL^{lo} donors included in the vaccination study against SARS-CoV-2.

	SARS-CoV-2 naïve subjects		Previously infected subjects		P-value
	Non-MBL HD (n=25)	MBL ^{lo} (n=7)	Non-MBL HD (n=25)	MBL ^{lo} (n=9)	
Age (years)*	41 (32–49)	43 (43–46)	43 (36–52)	54 (43–61)	0.007^a
Sex (male/female)	11 / 14 (44% / 56%)	4 / 3 (57% / 43%)	10 / 15 (40% / 60%)	3 / 6 (33% / 67%)	N.S.
Type of vaccine					
ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca)	2/25 (8%)	0/7 (0%)	1/25 (4%)	0 (0%)	
BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	20/25 (80%)	5/7 (71%)	16/25 (64%)	7 (78%)	N.S.
mRNA-1273 (Moderna)	3/25 (12%)	2/7 (22%)	8/25 (32%)	2 (22%)	

Results expressed as number of cases (percentage) or as * median (interquartile range). ^a P-value when comparing non-MBL HD vs. MBL^{lo} among those cases with previous COVID-19.

Abbreviations (alphabetical order): HD, healthy donor; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL^{lo}, low-count monoclonal B-cell lymphocytosis; NS, no statistically significant differences found.

Supplementary Table 2. Fluorochrome-conjugated antibody combinations and gating strategy used for flow cytometric identification of the different subsets of leukocytes and B cells circulating in blood of each subject included in this study.

A. LST (EuroFlow® Lymphocyte Screening Tube) BD OneFlow LST™ 8-color tube used for the identification of PB leukocyte populations.

Antibody reagent	Fluorochrome-conjugate							
	V450	V500-C	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APC-H7
Marker	CD20 CD4	CD45	CD8 Anti-λ	CD56 Anti-κ	CD5	CD19 Anti-TCRγδ	CD3	CD38
Clone	L27 SK3	2D1	SK1 1-155-2	MY31 TB28-2	L17F12	SJ25-C1 11F2	SK7	HB7
Source	BD							

Abbreviations (alphabetical order), APC, allophycocyanine; APC-H7, allophycocyanine-hilite®7; BD, Becton/Dickinson Biosciences; FITC, fluorescein isothiocyanate; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PECy7, phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5.

B. Immunophenotypic profiles and criteria used for the identification of the major subpopulations of white blood cell identified with the LST antibody combination.

FCM marker	Cell population								
	T-cells	B-cells	NK-cells	Plasma cells	Neutrophils	Eosinophils	Basophils	Monocytes	Dendritic cells
FSC	low	low	low	int	int / high	int	low	int	low / int
SSC	low	low	low	int	high	very high	low	int	low / int
CD45	++	++	++	low	+	+	low	+	+
CD3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CD19	-	+	-	+	-	-	-	-	-
CD4	- / +	-	-	-	-	-	-	+	+
CD8	- / +	-	- / low	-	-	-	-	-	-
TCRγδ	- / +	-	-	-	-	-	-	-	-
CD20	-	+	-	- / low	-	-	-	-	-
CD5	+++	- / low	-	-	-	-	-	-	het
CD56	het	-	low / +	-	-	-	-	-	-
CD38	het	- / low	het	++	-	-	+	low / +	+

Data on the phenotypic profiles of each individual cell population summarized according to reference 3 of Supplementary References. Abbreviations (alphabetical order): FCM, flow cytometry; FSC, forward light scatter; het, heterogeneous expression levels; int, intermediate expression levels; NK, natural killer; SSC, sideward light scatter.

C. EuroFlow® IMM-BIgh 13-color tube used for the identification of different subsets of PB B-cells and plasma cells.

	Fluorochrome-conjugate													
Antibody reagent	BV421	BV510	BV605	BV650	BV711	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PECy7	APC	AF700	APC-H7
Marker	CD27	sm/cyIgM	CD62L	CD24	CD21	CD19	sm/cyIgG3 sm/cyIgG2 sm/cyIgD	sm/cyIgA1 sm/cyIgA2	sm/cyIgG1 sm/cyIgG2	CD20	CD138 CD5	sm/cyIgG4 sm/cyIgA1 sm/cyIgD	CD45	CD38
Clone	M-T271	MHM-88	DREG56	ML5	B-ly4	SJ25C1	SAG3 SAG2 IA6-2	SAA1 SAA2	SAG1 SAG2	2H7	MI15 L17F12	SAA1 SAG4 IA6-2	HI30	HB7
Source	BD	Bio-legend	Bio-legend	BD	BD	BD	Cytognos Biolegend	Cytognos	Cytognos	BD	Bio-legend BD	Cytognos BD	BD	BD

Abbreviations (alphabetical order), AF, alexa fluor; APC, allophycocyanine; APC-H7, allophycocyanine-hilite®7; BV, brilliant violet; cy, cytoplasmic; FITC, fluorescein isothiocyanate; IMM, immune monitoring; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PE-CF594, phycoerythrin-carboxyfluorescein594; PECy7, phycoerythrin-cyanine7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine5.5; sm, surface membrane.

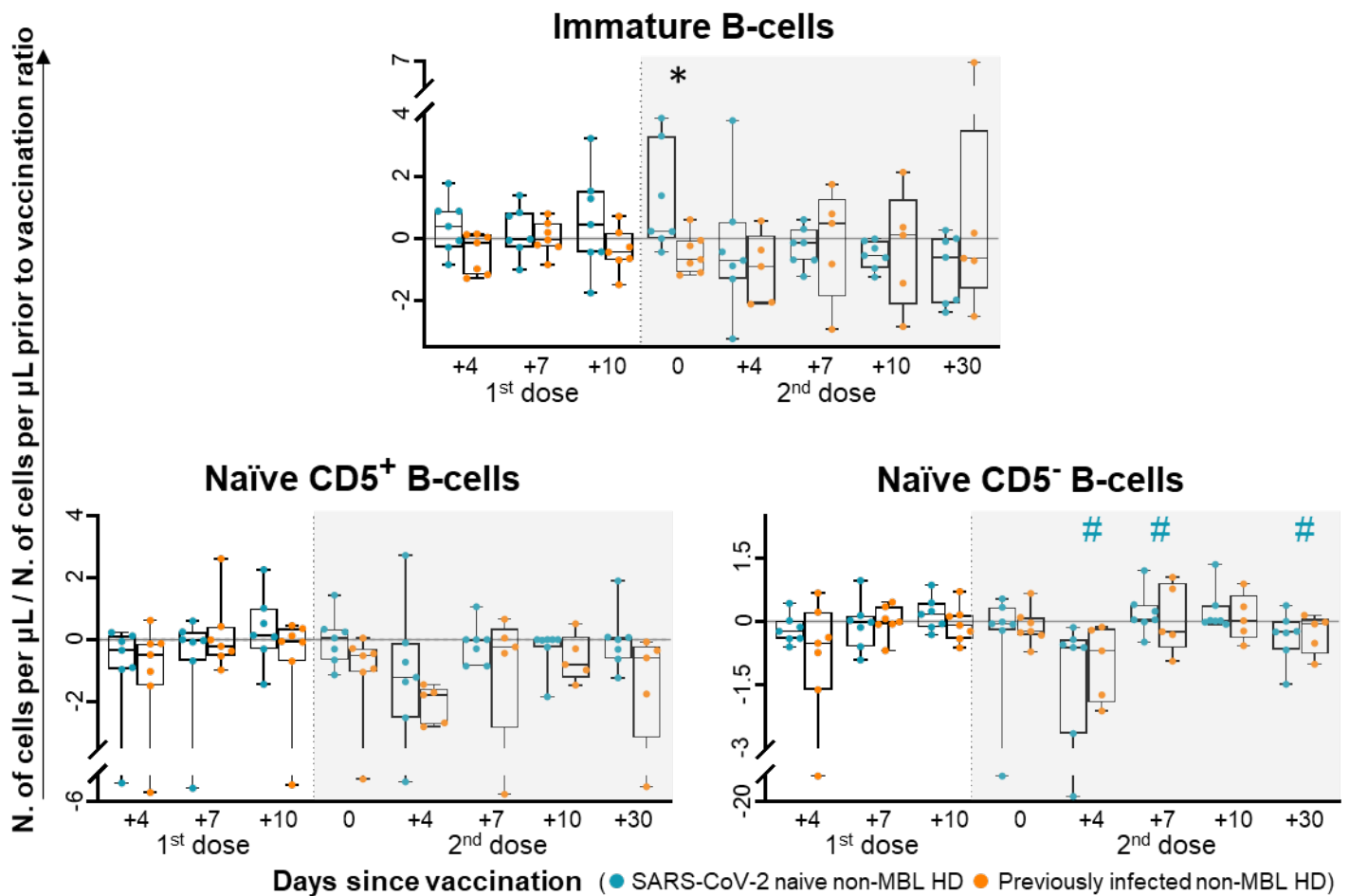
D. Immunophenotypic profiles and criteria used for the subsetting of the different B-cell and plasma cell subpopulations identified with IMM-BIgh tube.

FCM marker	Cell population				
	Pre-GC B-cells		Memory B-cells		Plasma cells
	Immature	Naïve	Unswitched memory	Switched memory	
FSC	low	low	low	low	int
SSC	low	low	low	low	int
CD45	++	++	++	++	low
CD19	+	+	+	+	+/low
CD20	+	+	+	+	-/+
CD21	+	-/+	-/+	-/+	-
CD24	++	-	-	-	-
CD27	-	-	+	-/+	+
CD38	+	-	-	-	++
CD138	-	-	-	-	-/+
CD5	+	-/+	-	-	-
IgM/D	+	+	+	-	-/+

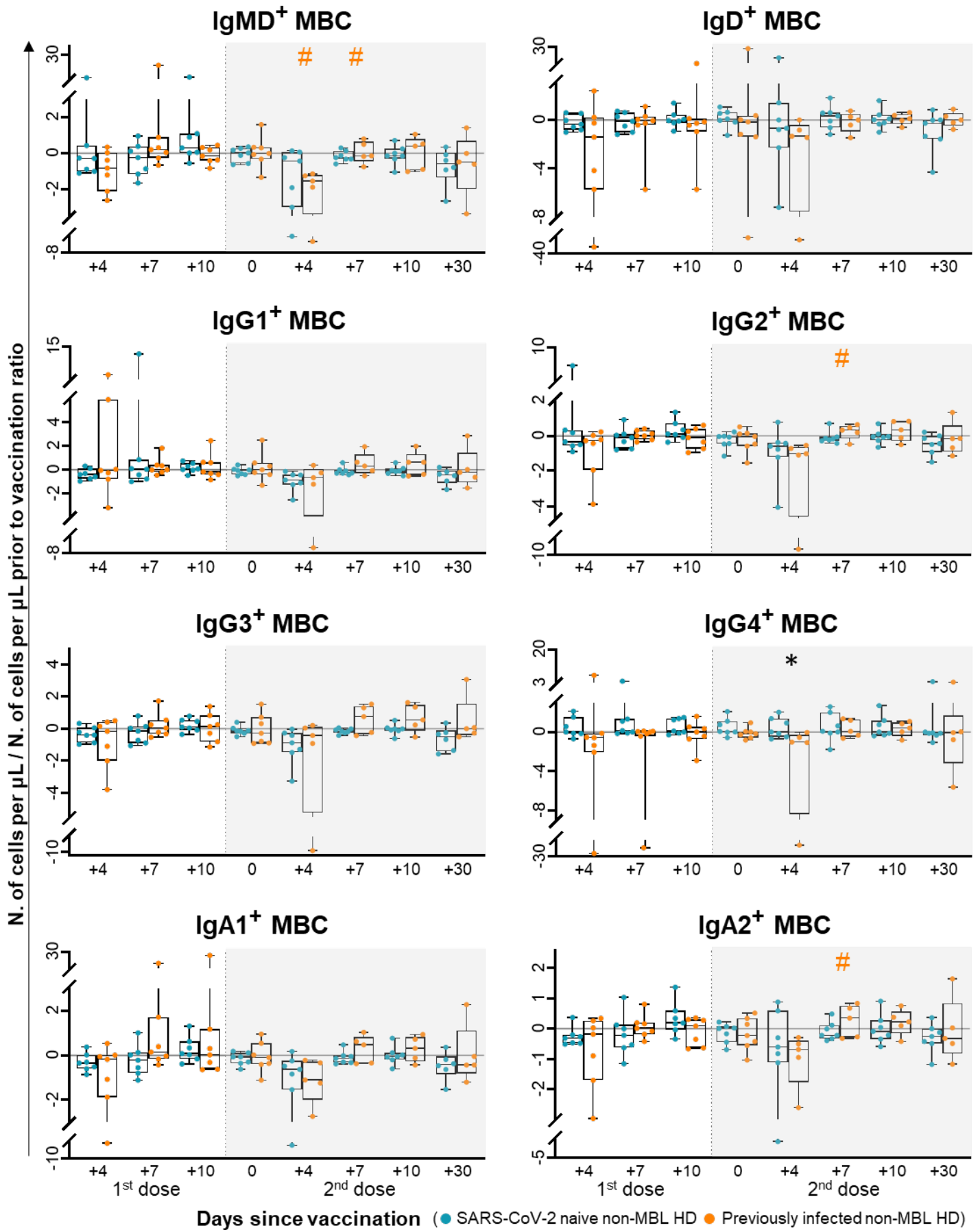
Data on the phenotypic profiles of each individual cell population summarized according to reference 6 of Supplementary References.(7) Further subdivisions of

memory B-cells and plasma cells were performed according to the IgH subclass expressed (IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2). Abbreviations (alphabetical order): FCM, flow cytometry; FSC, forward light scatter; GC, germinal center; int, intermediate expression levels; NK, natural killer; SSC, sideward light scatter.

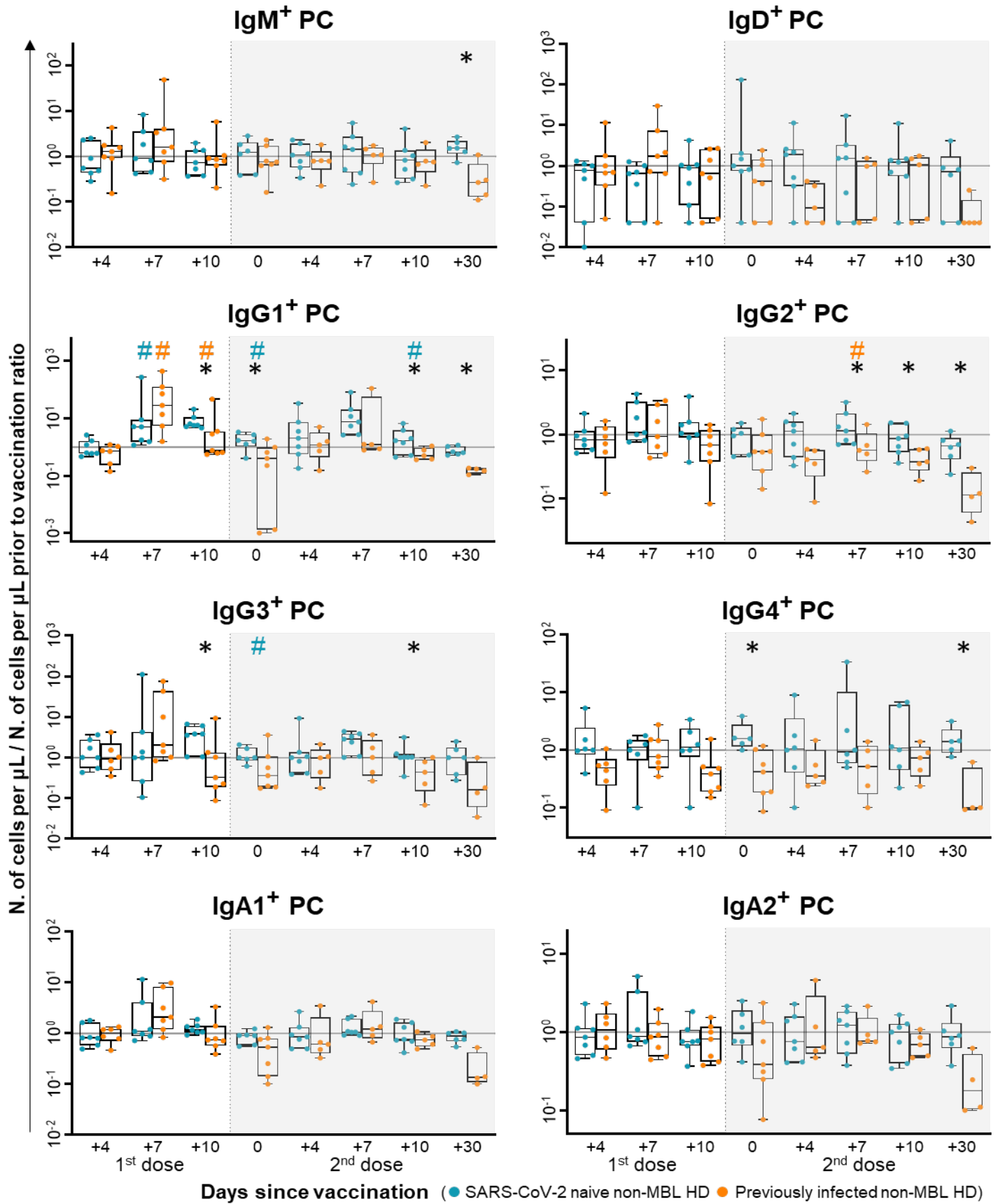
4 Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Kinetics of pre-germinal center B-cell subsets in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis.

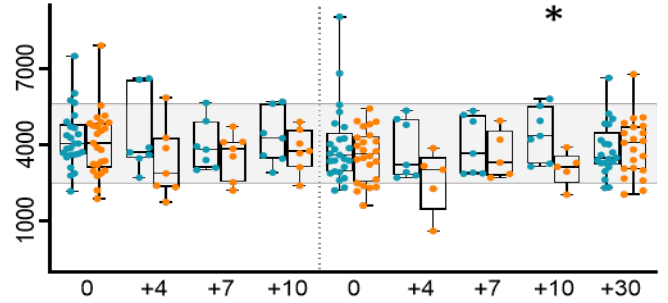


Supplementary Figure 2. Kinetics of memory B-cell subsets in blood grouped by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBC, memory B-cells; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis.

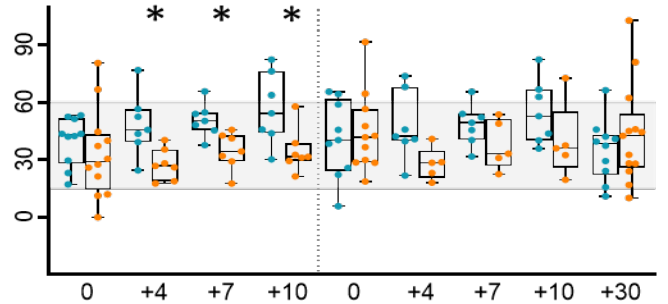


Supplementary Figure 3. Kinetics of plasma cell subsets in blood grouped by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD; #Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the time-point analyzed and the previous one for each (color-coded) group of individuals. Abbreviations: HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; PC, plasma cell.

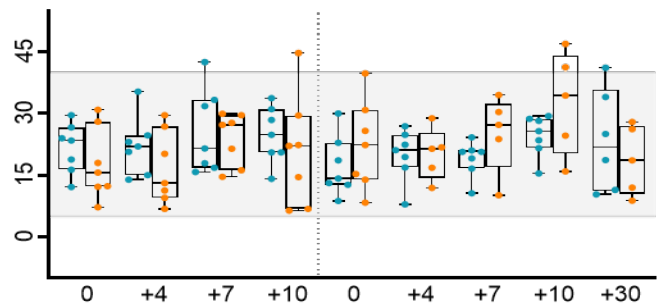
Neutrophils



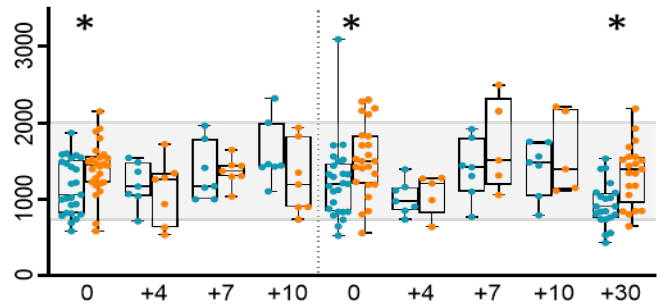
Basophils



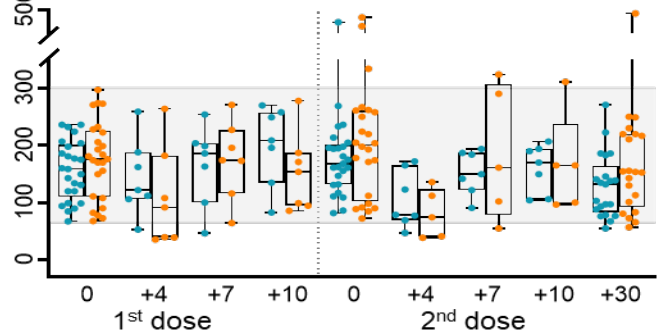
Dendritic cells



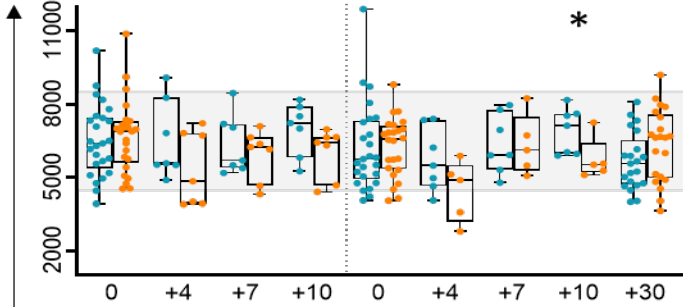
T-cells



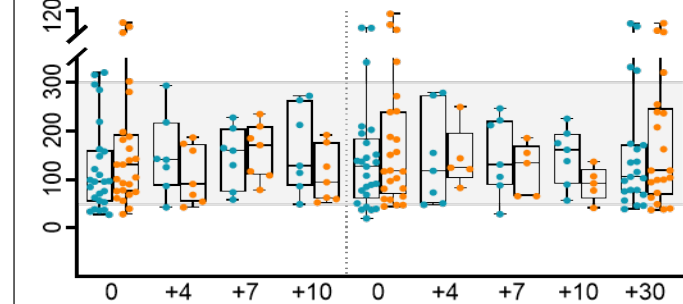
B-cells



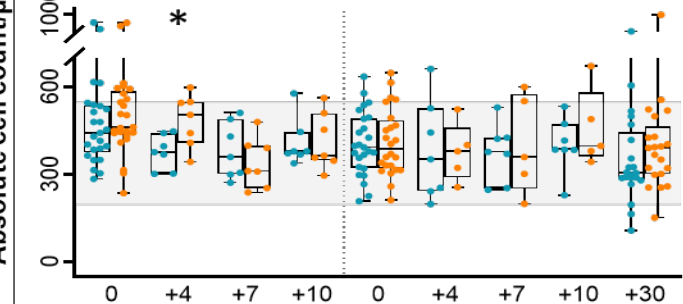
WBC



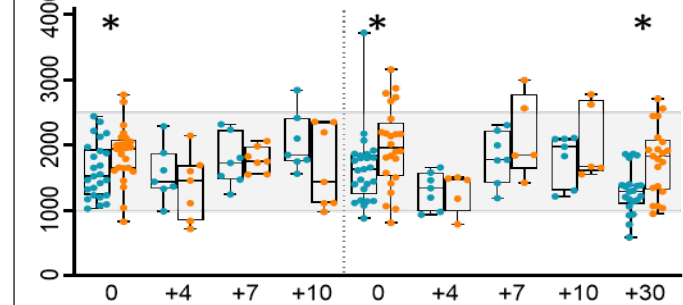
Eosinophils



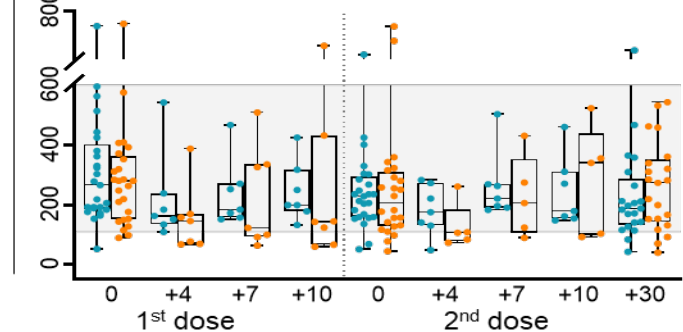
Monocytes



Lymphocytes



NK-cells



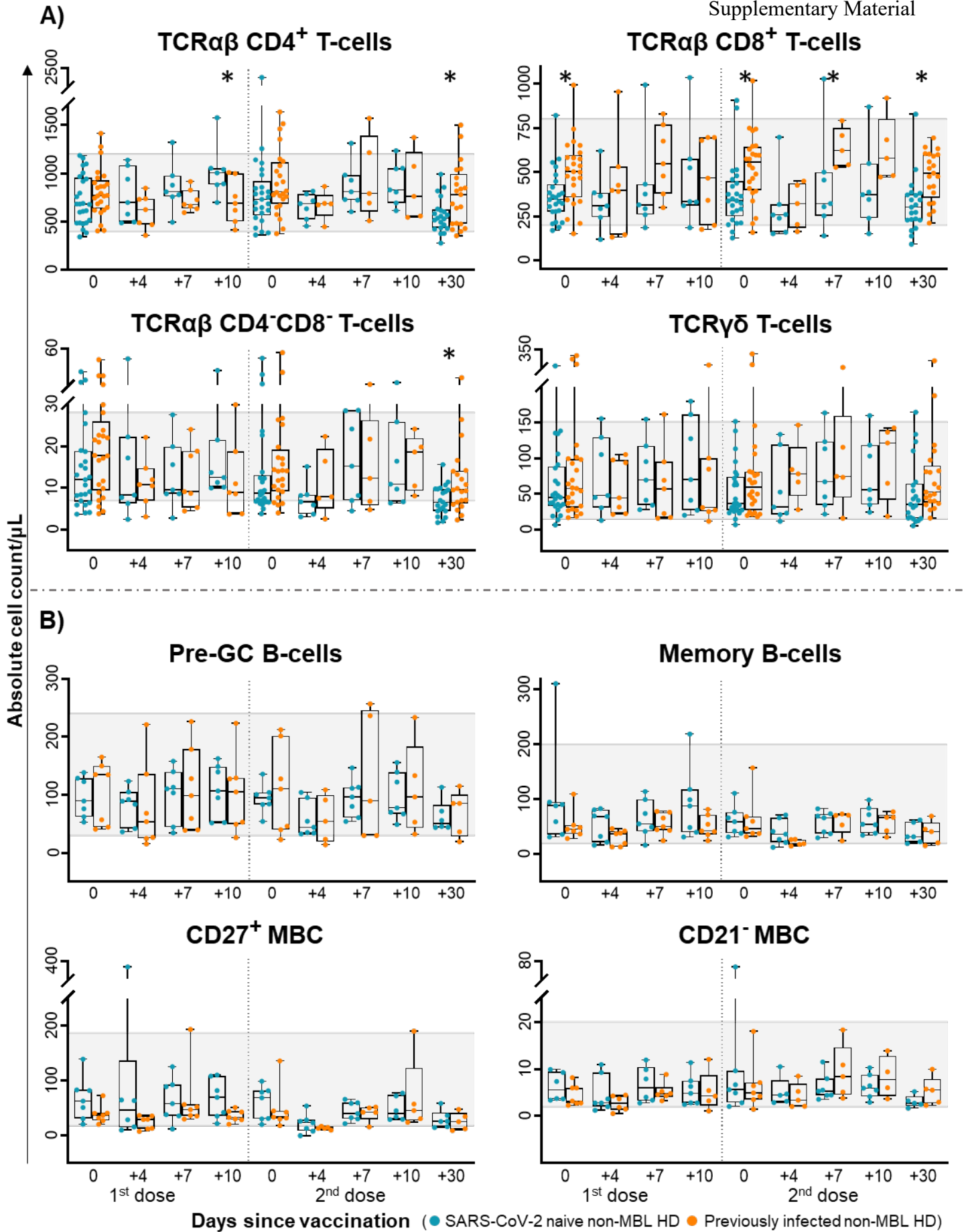
Absolute cell count/ μ L

1st dose

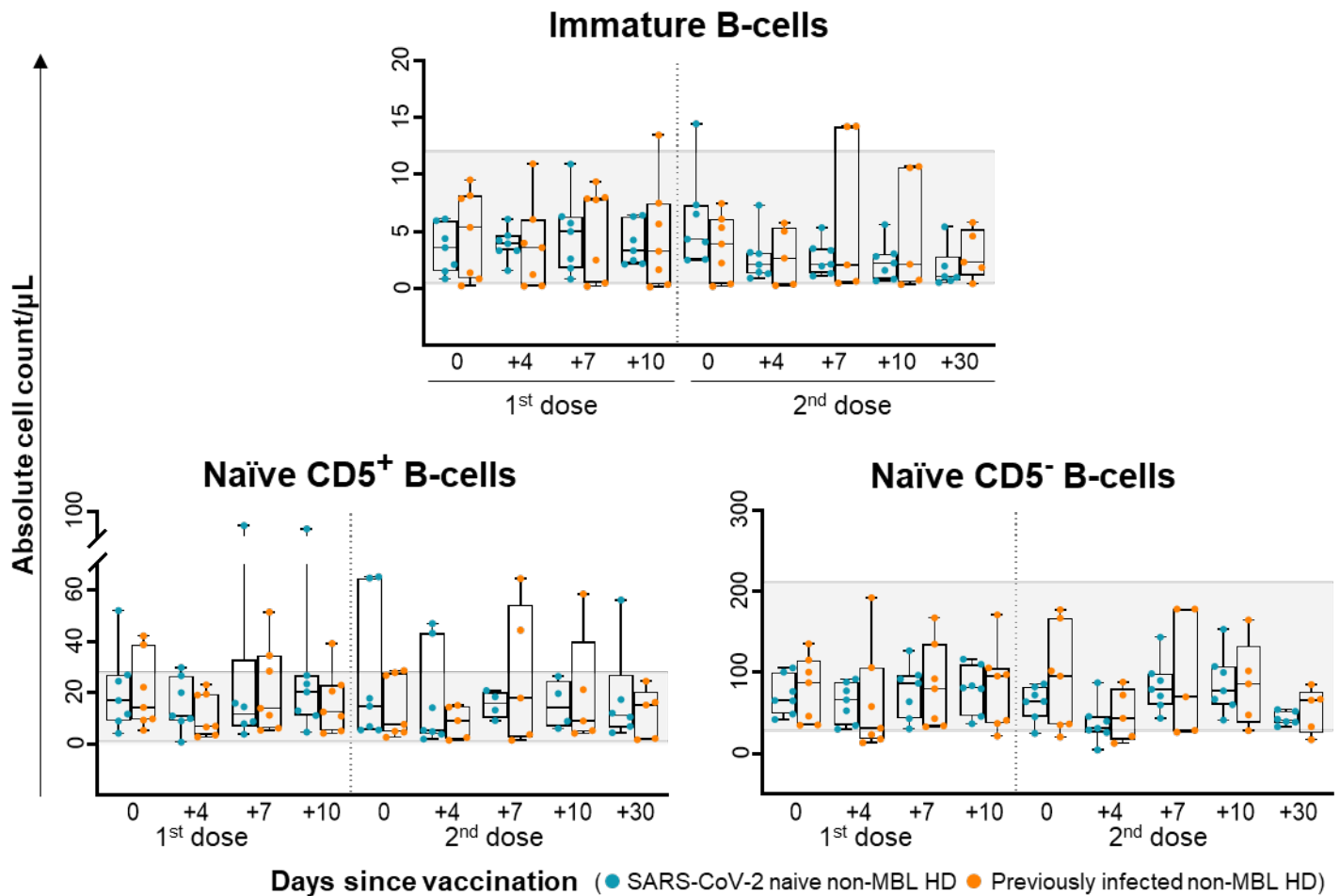
2nd dose

Days since vaccination (● SARS-CoV-2 naive non-MBL HD ● Previously infected non-MBL HD)

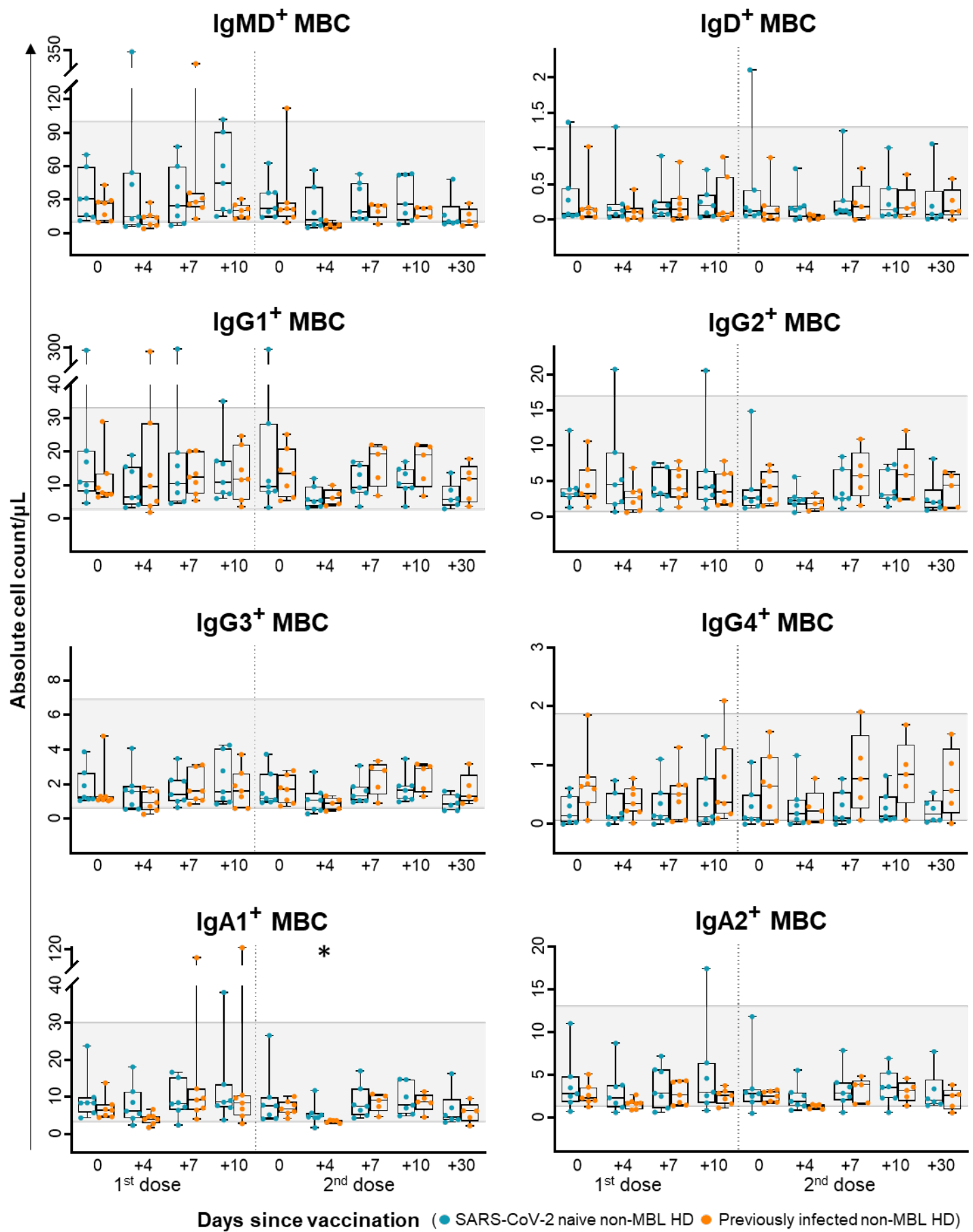
Supplementary Figure 4. Major leukocyte subset kinetics in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer; WBC, white blood cells.



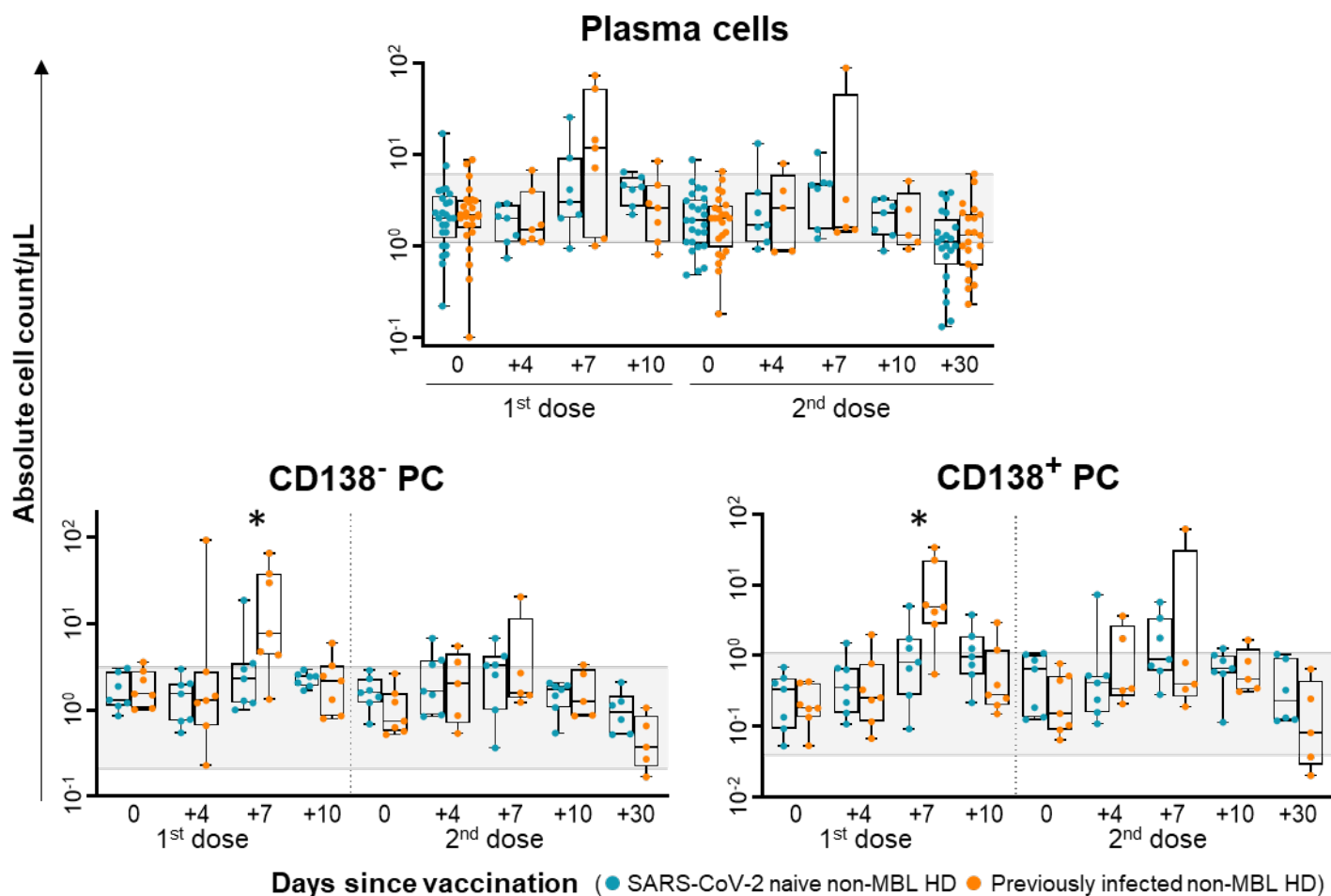
Supplementary Figure 5. Kinetics of T-cell (A) and B-cell (B) subsets in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: GC, germinal center; HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; MBC, memory B-cells; TCR, T-cell receptor.



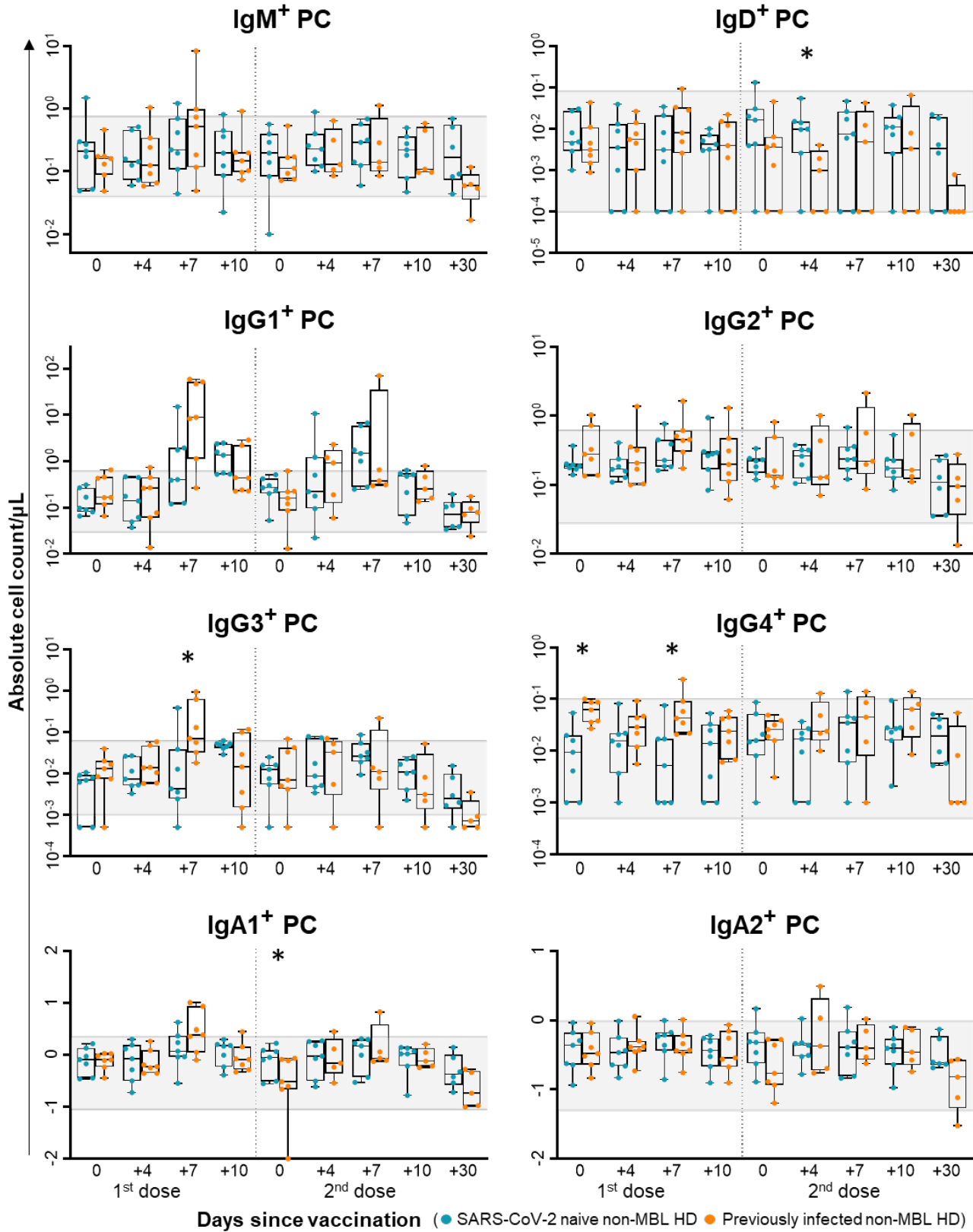
Supplementary Figure 6. Pre-germinal center B-cell subset kinetics in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis.



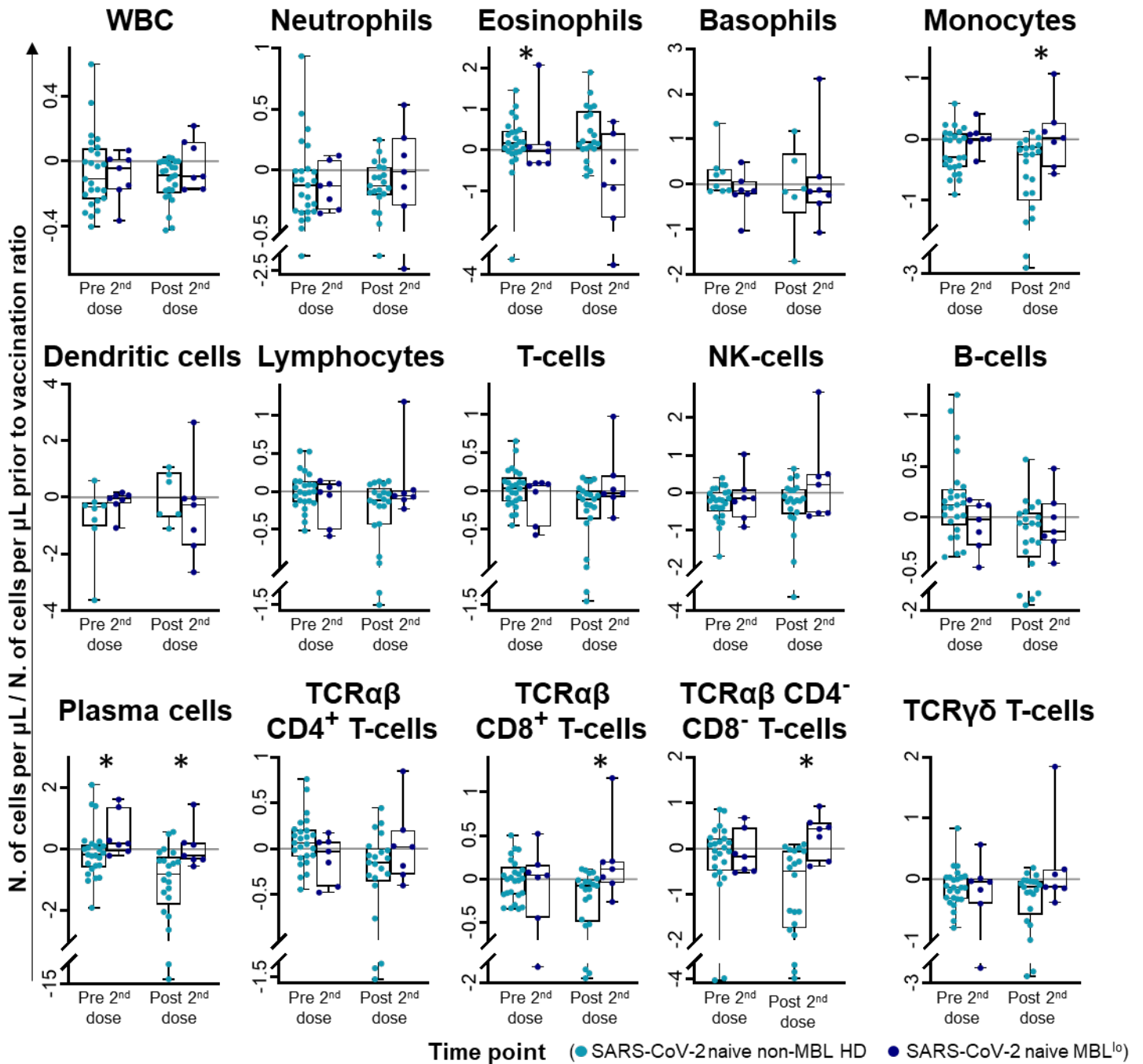
Supplementary Figure 7. Memory B-cell subset kinetics grouped by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBC, memory B-cell; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis.



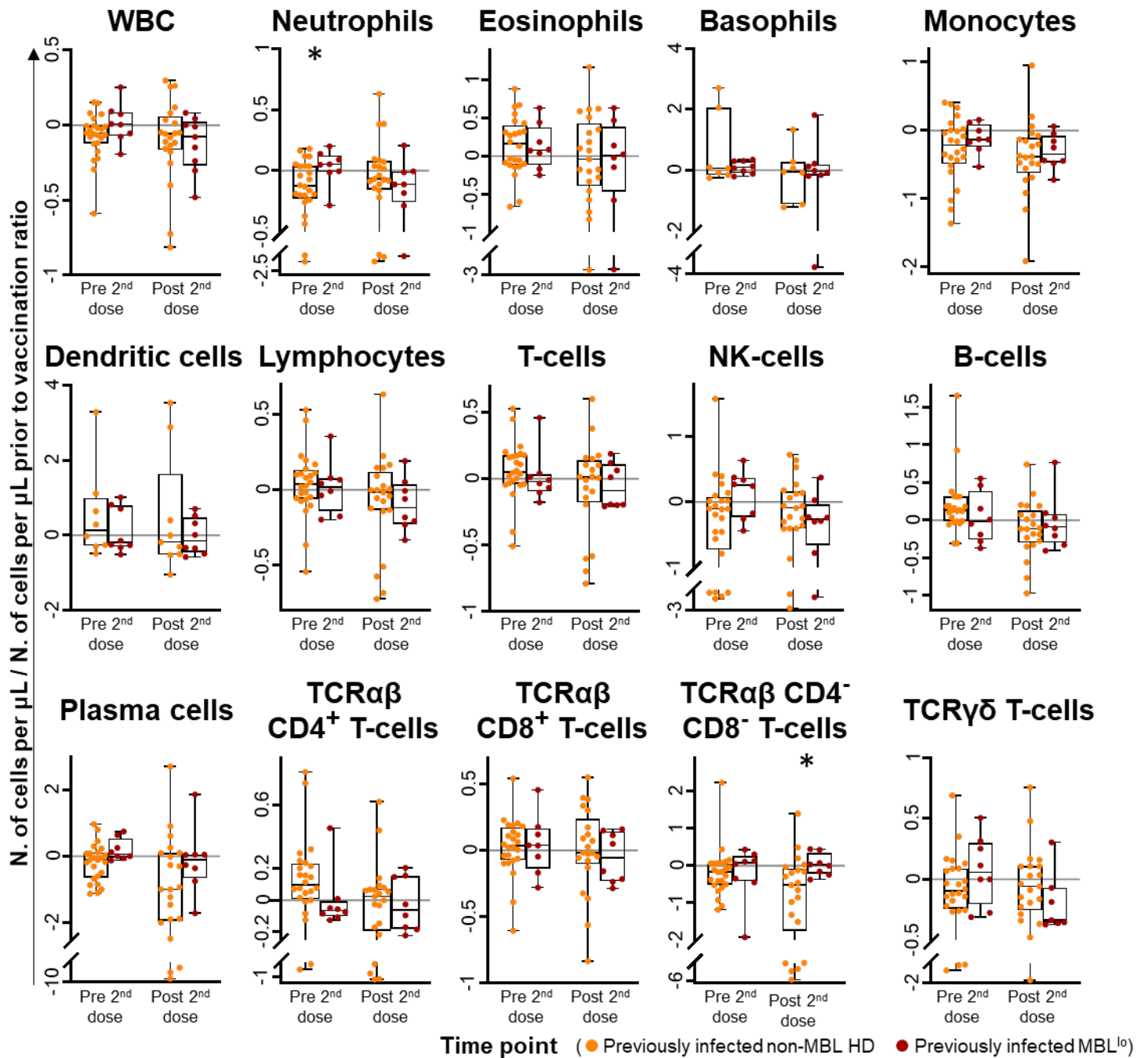
Supplementary Figure 8. Plasma cell subset kinetics grouped by their maturation subsets in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; PC, plasma cells.



Supplementary Figure 9. Plasma cell subset kinetics defined by their IgH isotype and subclass expression profile in blood of SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as absolute cell counts/ μL for each individual cell population analyzed, using a logarithmic scale. Subjects without previous contact with SARS-CoV-2 (blue dots) and previously infected (orange dots) are grouped according to the number of days from the administration of the vaccine. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. Gray horizontal bands represent the 10th-90th percentile values (normality range) in blood of pre-pandemic non-MBL age-matched HD. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between SARS-CoV-2 naïve vs. previously infected non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; Ig, immunoglobulin; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; PC, plasma cells.



Supplementary Figure 10. Leukocyte subset kinetics in blood of SARS-CoV-2 naïve MBL^{lo} vs. non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between absolute cell count/ μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without MBL (light blue dots) and with MBL^{lo} (dark blue dots) are grouped according to the time from the vaccine administration. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between MBL^{lo} vs. non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer; TCR, T-cell receptor.



Supplementary Figure 11. Leukocyte subset kinetics in blood of previously infected MBL^{lo} vs. non-MBL HD following SARS-CoV-2 vaccination. Data expressed as the ratio (considering 0 as no change vs. pre-vaccination time-point) between absolute cell count/μL of each cell population and the cell count detected for the same cell population at baseline, prior to vaccination. Subjects without MBL (orange dots) and with MBL^{lo} (red dots) are grouped according to the time from the vaccine administration. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values (IQR), whereas the line in the middle corresponds to median values, and whiskers represent the maximum and minimum values observed for each group. *Statistically significant differences (p≤0.05) between MBL^{lo} vs. non-MBL HD. Abbreviations: HD, healthy donors; IQR, interquartile range; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; NK, natural killer; TCR, T-cell receptor.