

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Inmunidad del huésped frente al SARS-CoV-2: implicación en la infección y la
progresión clínica de la COVID-19

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Octavio Carretero Vicario

DIRECTORES

María del Pilar Pérez Romero
José María Aguado García
Rafael San Juan Garrido



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología

TESIS DOCTORAL

**Inmunidad del huésped frente al SARS-CoV-2:
implicación en la infección y la progresión clínica de la
COVID-19**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Octavio Carretero Vicario

DIRECTORES

María del Pilar Pérez Romero

José María Aguado García

Rafael San Juan Garrido

MADRID, 2023

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y FINANCIACIÓN

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Código: 20/269. A 26 de mayo de 2020) y se llevó a cabo siguiendo la Declaración de Helsinki y la Guía de Buenas Prácticas Clínicas.

Los financiadores han sido la Fundación Mutua Madrileña (2020/0056), el Plan Nacional de I+D+I y el Instituto de Salud Carlos III (COV20/00181 y COV20_00679) dependientes del Ministerio de Ciencia e Innovación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis la Dra. María del Pilar Pérez Romero, el Dr. José María Aguado García, y el Dr. Rafael San Juan Garrido por permitirme llevar a cabo este proyecto de tesis doctoral, por su apoyo y tesón para que este barco haya llegado a buen puerto, por sus inestimables consejos y por haberme facilitado al máximo posible la elaboración de un proyecto de tesis doctoral que habitualmente suele complicarse muchísimo.

Agradecer especialmente a la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario 12 de Octubre el haberme acogido en su servicio como uno más del equipo, a pesar de las diferencias de procedencia y ámbito académico de los que venía. Gracias a Rafa por enseñarme tantísimo y pelear por que este trabajo marchase adecuadamente. Gracias a Francisco, Mario, Manolo, Isa, Laura, María, Pilar, Thiago, Tamara, Virginia, Natalia y Patricia por haberme hecho sentir como en casa y compartir conmigo sus enormes conocimientos. Mencionar especialmente a José María, Jefe de la Unidad, la primera persona con la que planteé la posibilidad de hacer la tesis, mi padrino y uno de mis principales valedores en este periplo, ejemplo de líder por encima de jefe, esa figura inspiradora capaz de sacar lo mejor de uno mismo y del grupo en conjunto.

Al maravilloso equipo de Pilar y Michael en el Centro Nacional de Microbiología. Gracias a Ana, Fani, Marcos, Paco, Mireia, Montse y Clara por haberme ayudado y enseñado tantísimo, son un ejemplo brillante de superación y compañerismo. Por su puesto, dar las gracias a Pilar, base fundamental de esta tesis doctoral, le agradezco enormemente el esfuerzo realizado con este proyecto, haberme abierto las puertas de su laboratorio y el haberme enseñado su capacidad extraordinaria de superación ante las adversidades, por muy grandes que sean.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, al personal técnico (Manoli, Juani, Eli, Marcos, Sonia, Yolanda, Lupe, Noelia, Elena, Mamen, Merce, Antonia, Mar, Esther, Mari Luz, Carmen, Ana, Maribel, Alicia, Marisa, M^a Ángeles, Charo, M^a Jesús, Rafa, M^a José, Rosa, Rosaura, Paquita y Sagrario), residentes (M^a Cruz, Lourdes, Isa, Lucía, Jaime, Irene, Raúl, Alhena, M^a Ángeles, Gonzalo, Mayra, Isa y Mamen) y facultativos (Rafa, Alfredo, Fernando, M^a Ángeles, Jenny, Ana, Lola, Mónica y Paula), mi

casa durante cuatro estupendos años en los que senté las bases académicas y personales que ahora me han permitido finalizar la tesis doctoral.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Móstoles, por haberme aceptado en su casa en esta última fase de la tesis doctoral, por el ambiente respetuoso y amable que hacen posible todos los días y que le hace sentir a uno muy a gusto. Gracias a facultativos y residentes (Teresa, Marta, Laura, Yolanda, Raquel, Maite, Fátima, Arturo, Pablo, Fer, Gabi y Gustavo) y a todo el personal técnico (Ana, Teresa, María, David, Rober, Miguel, Alba, Laura, Sonia, Alberto, Nydia, Elena, Mercedes, Julia, Beni, Maribel, Elena, Teresa, Toñi, Eli, Arantxa, Julia y Virginia).

Agradecer a mi familia, a mis padres, Felipe y Felicidad, y a mi hermano, César, el haber estado siempre a mi lado desde el principio, en los momentos buenos y en los malos, ayudándome en todo lo posible. A mi tía, Purita. A mis abuelos, Alberto, Mari, Epi y Luci, por su eterno y valioso ejemplo de honradez, sacrificio y generosidad.

A Irene, mi compañera de viaje todos estos años atrás, por su cariño y apoyo incondicional.

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Características generales del Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2).....	16
1.2 Taxonomía.....	16
1.3 Características genéticas del SARS-CoV-2.....	18
1.4 Características proteómicas del SARS-CoV-2.....	19
1.5 Epidemiología.....	23
1.6 Patogenia y respuesta inmune.....	24
1.6.1 Consideraciones generales.....	24
1.6.2 Inmunopatogenia.....	25
1.6.3 Respuesta inmune humoral.....	27
1.6.3.1 Cinética de la respuesta inmune humoral, isotipos y subclases de inmunoglobulinas.....	27
1.6.3.2 Magnitud de la respuesta humoral y su relación con la gravedad clínica.....	28
1.6.3.3 Respuesta humoral frente a coronavirus estacionales en la infección por SARS-CoV-2.....	29
1.6.3.4 Anticuerpos neutralizantes.....	29
1.7 Variabilidad genética del SARS-CoV-2.....	31
1.7.1 Variante Alfa (linaje B.1.1.7).....	31
1.7.2 Variante Beta (linaje B.1.351).....	32
1.7.3 Variante Gamma (linaje P.1).....	32
1.7.4 Variante Delta (linaje B.1.617.2).....	32
1.7.5 Variante Ómicron (linaje B.1.1.529) y sublinajes.....	33
1.8 Características clínicas, letalidad y factores de riesgo.....	36
1.8.1 Características clínicas.....	36
1.8.1.1 Generalidades y clasificación de gravedad.....	36
1.8.1.2 Período de incubación.....	38
1.8.1.3 Sintomatología inicial.....	38
1.8.1.4 Hallazgos en las pruebas de imagen.....	38
1.8.1.5 Características analíticas y exploración física.....	39

1.8.1.6	Progresión de la enfermedad y complicaciones	41
1.8.2	Letalidad	42
1.8.3	Factores de riesgo.....	42
1.9	Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.....	44
1.9.1	Sospecha clínica.....	44
1.9.2	Selección de muestra.....	44
1.9.3	Técnicas de diagnóstico microbiológico	45
1.9.3.1	Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT)	45
1.9.3.2	Test antigénicos	48
1.9.3.3	Técnicas serológicas	48
1.9.3.4	Técnicas de detección de actividad neutralizante	49
1.10	Vacunación frente a la COVID-19	52
1.10.1	Consideraciones generales	52
1.10.2	Principales tipos de vacunas empleadas.....	53
1.10.2.1	Vacunas de RNAm.....	53
1.10.2.1.1	BNT162b2 (Pfizer).....	53
1.10.2.1.2	mRNA-1273 (Moderna)	54
1.10.2.2	Vacunas que utilizan como vector un virus.....	54
1.10.2.2.1	ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 (AstraZeneca)	54
1.10.2.2.2	Ad26.COV2.S (Janssen)	55
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
2.1	Hipótesis.....	57
2.2	Objetivos	58
2.2.1	Principal.....	58
2.2.2	Secundarios	58
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	60
3.1	Reclutamiento de los pacientes y recogida de datos clínicos y muestras.....	60
3.1.1	Cohorte de estudio 1: Pacientes con COVID-19 agudo del Hospital Universitario 12 de Octubre.....	60
3.1.1.1	Planteamiento del estudio y reclutamiento de pacientes, diagnóstico de COVID-19, recogida de muestras de suero y consideraciones éticas.....	60
3.1.1.2	Variables recogidas.....	61
3.1.1.3	Definiciones clínicas.....	63
3.1.1.4	Mediciones de laboratorio.....	63
3.1.1.5	Asignación de los pacientes de la cohorte a un grupo clínico	63

3.1.2	Cohorte de estudio 2: Subcohorte de receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) y subcohorte control de sujetos inmunocompetentes sanos vacunados con ARNm-1273 (Moderna Biotech)	64
3.1.2.1	Planteamiento del estudio, reclutamiento de TOS e inmunocompetentes vacunados y recogida de muestras y consideraciones éticas	64
3.1.2.2	Variables recogidas	65
3.1.2.3	Definiciones clínicas.....	66
3.2	Inactivación de las muestras de suero	66
3.3	Obtención de la proteína S recombinante completa del SARS-CoV-2	66
3.4	Estudio de idoneidad de la proteína S recombinante para la realización de los ensayos planteados	66
3.4.1	Selección de sueros control	67
3.4.2	Realización del western blot.....	67
3.5	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)	68
3.5.1	Resumen del procedimiento.....	68
3.6	Ensayo de neutralización subrogada; inhibición de la unión S/ACE-2 por anticuerpos	68
3.6.1	Resumen del procedimiento.....	68
3.6.2	Protocolo del ensayo de neutralización subrogada	69
3.7	Análisis estadístico	74
4.	RESULTADOS	76
4.1	Estructuración del proyecto de tesis doctoral	76
4.2	Bloque 1: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con infección aguda (Cohorte de estudio 1).....	79
4.2.1	Características demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento frente a la COVID-19 y evolutivas en pacientes hospitalizados con infección aguda por SARS-CoV-2.79	
4.2.2	Asociación entre la severidad de la enfermedad y la magnitud de la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2	84
4.2.2.1	Título de IgM y severidad	84
4.2.2.2	Título de IgG total y severidad. Combinación respuesta IgM/IgG.....	85
4.2.2.3	Títulos de subclases de IgG y severidad. Combinación respuesta IgG1/IgG3 .87	
4.2.2.4	Título de anticuerpos neutralizantes y severidad	90
4.2.3	Correlación entre la respuesta de anticuerpos IgM, IgG, subclases de IgG y la actividad neutralizante, total y por grado de severidad	91
4.2.4	Correlación de la respuesta IgM, IgG total, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes con el tiempo transcurrido desde inicio de síntomas hasta extracción de la muestra de suero, total y por grado de severidad	94

4.2.5	Asociación entre variables demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento, respuesta inmune humoral y evolutivas del paciente con la actividad neutralizante frente a la proteína S del SARS-CoV-2	97
4.2.5.1	Variables predictoras del título de anticuerpos neutralizantes. Análisis univariante y multivariante	98
4.2.5.2	Puntos de corte de variables predictoras para conocer actividad neutralizante	100
4.2.6	Identificación de puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad	102
4.3	Bloque 2: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en sujetos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech) (Cohorte de estudio 2). Comparación de las respuestas entre las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos	103
4.3.1	Características demográficas, clínicas, relacionadas con el trasplante y con el tratamiento inmunosupresor en las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech)	103
4.3.2	Magnitud de la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes	106
4.3.2.1	Título de IgM por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes	106
4.3.2.2	Título de IgG por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes. Combinación respuesta IgM/IgG	110
4.3.2.3	Título de anticuerpos neutralizantes por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes	115
4.3.3	Correlación de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG con la actividad neutralizante frente a la proteína S del SARS-CoV-2 por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes	119
4.3.4	Predicción del desarrollo de actividad neutralizante en suero tras la vacunación mediante la magnitud de la respuesta de anticuerpos totales.....	125
4.3.5	Comparativa entre los títulos de anticuerpos generados por vacunados inmunocompetentes frente a la COVID-19 y los generados por pacientes con COVID-19 agudo	127
5.	DISCUSIÓN.....	135
5.1	Bloque 1: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con infección aguda (Cohorte de estudio 1).....	135
5.2	Bloque 2: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en sujetos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech) (Cohorte de estudio 2). Comparación de las respuestas entre las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos	140
6.	CONCLUSIONES	146
7.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	148
8.	ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO	151

8.1	Resultados del western blot sobre los sueros control	151
8.2	Resultados del ensayo ELISA para la detección de anticuerpos de isotipo IgM e IgG sobre los sueros control	157
8.3	Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM, IgG y subclases de IgG para predecir la actividad neutralizante del suero con su sensibilidad y especificidad	159
8.4	Puntos de corte de las curvas ROC del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con su sensibilidad y especificidad.....	161
8.5	Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM e IgG para predecir la actividad neutralizante del suero tras la vacunación con su sensibilidad y especificidad.....	165
9.	ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	169
9.1	Comunicaciones en congresos	169
9.2	Artículos publicados	170
	BIBLIOGRAFÍA:.....	181

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACE-2: Enzima convertidora de angiotensina de tipo 2.

ADE: Potenciación dependiente de anticuerpos.

ALT: Alanina aminotransferasa.

APS: Persulfato de amonio.

AST: Aspartato aminotransferasa.

AUC: Área bajo la curva.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BSL 2: Nivel de Bioseguridad de tipo 2.

BSL 3: Nivel de Bioseguridad de tipo 3.

BST-2: Antígeno estromal de la médula ósea 2.

CAM: Mucormicosis asociada a COVID-19.

CAM: Complejo de ataque a la membrana.

CAPA: Aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

CE50: Concentración eficaz 50.

CLIA: Inmunoensayo de quimioluminiscencia.

CNM-ISCI: Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019.

CPK: Creatinina fosfoquinasa.

Ct: Ciclo umbral.

CXCL-10: Ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C.

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

DO: Densidad óptica.

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

E: Proteína de la envuelta.

ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

EMA: Agencia Europea del Medicamento.

EPI: Equipo de Protección Individual.

EUA: Autorización de Uso de Emergencia.

Fc: Fracción cristalizable de los anticuerpos.

FDA: Administración de Alimentos y Drogas.

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno.

FR: Fallo respiratorio.

GISAID: Iniciativa Global para Compartir Todos los Datos de Influenza.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas/macrofágicas.

hACE-2. Enzima convertidora de angiotensina de tipo 2 humana.

HR: Hazard ratio.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

IC: Intervalo de confianza.

IDSA: Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas.

IFN- α : Interferón alfa.

IFN- β : Interferón beta.

IFN- γ : Interferón gamma.

IgG: Inmunoglobulina isotipo G.

IgM: Inmunoglobulina isotipo M.

IL- 1 β : Interleucina 1 β .

IL- 1RA: Interleucina 1RA.

IL-6: Interleucina 6.

IL-7: Interleucina 7.

IL-8: Interleucina 8.

IL-10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IL-17: Interleucina 17.

IL-33: Interleucina 33.

IQR: Rango intercuartílico.

IRF-3: Factor regulador del interferón de tipo 3.

JAK: Janus Quinasa.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LR3: Enzima convertidora de angiotensina tipo 2 humana.

LR3d: Enzima convertidora de angiotensina tipo 2 humana digerida.

LR5: Proteína S en conformación prefusión cerrada (down).

LR18: Proteína S en conformación prefusión abierta (up).

M: Proteína de la membrana.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MERS: Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio.

MF4C: Versión quimérica de anticuerpo monoclonal anti-Foldon.

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I.

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II.

MMF: Micofenolato de mofetilo.

MPS: Micofenolato sódico.

MPA: Ácido micofenólico.

mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos.

N: Proteína de la nucleocápsida.

NAATs: Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NIH: Institutos Nacionales de la Salud.

NSP: Proteínas no estructurales.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPD: Dihidrocloruro de orto-fenilendiamina.

OR: Odds ratio.

ORF: Marco abierto de lectura.

ρ : Rho de Spearman.

P: p valor.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Tampón fosfato salino.

PBS-BSA: Tampón fosfato salino con albúmina de suero bovino al 0,5%.

PBST: Tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,1%.

PBSTM: Tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,1% suplementado con un 5 % de leche en polvo.

PCR: Proteína C reactiva

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PD-1: Receptor de muerte programada 1.

PDGFB: Subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PLpro: Proteasa similar a papaína.

pp: poliproteína.

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones.

RBD: Dominio de unión al receptor.

RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente.

RLRs: Receptores similares a RIG-I

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

ROC: Característica operativa del receptor.

RR: Riesgo relativo.

RRT: Terapia renal sustitutiva.

RST: Tubo rápido separador de suero.

rRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.

S: Proteína de la espícula.

SARS-CoV-1: Coronavirus tipo 1 del síndrome respiratorio agudo severo.

SARS-CoV-2: Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo.

SC +: Suero control positivo.

SC -: Suero control negativo.

SD: Desviación estándar.

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

suPAR: Receptor activador del plasminógeno de uroquinasa soluble.

TC: Tomografía computerizada.

Tc: Linfocito T citotóxico.

TCR: Receptor de linfocito T.

TEMED: Tetrametiletilenodiamina.

Th: Linfocito T colaborador.

TIGIT: Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM.

TIM-3: Inmunoglobulina del linfocito T y proteína mucina 3.

TLR-3: Receptor similar a Toll de tipo 3.

TMPRSS-2: Serín proteasa de transmembrana de tipo 2.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TOS: Trasplantados de órgano sólido.

TP: Tiempo de protrombina.

TRI: Tracto respiratorio inferior.

TRS: Tracto respiratorio superior.

UCI: Unidad de Cuidados intensivos.

UI: Unidades Internacionales.

VEGFA: Factor de crecimiento del endotelio vascular A.

VF: Volumen final.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VMI: Ventilación mecánica invasiva.

VSV: Virus de la estomatitis vesicular.

3CLpro: Proteasa similar a 3C o proteasa principal.

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Clasificación taxonómica de los principales coronavirus que producen infección en humanos.....17
- **Figura 2.** Árbol Filogenético de la subfamilia *Orthocoronavirinae* o Coronavirus.....18
- **Figura 3.** Genoma del SARS-CoV-2 y proteínas codificadas.....19
- **Figura 4.** Localización de las proteínas estructurales dentro del virus.....22
- **Figura 5.** Respuesta inmune ante la infección por SARS-CoV-2.....25
- **Figura 6.** Cinética de los anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 a lo largo del período clínico. Se representa magnitud de respuesta frente a días desde la infección.....28
- **Figura 7.** Escala de gravedad de la COVID-19 según la OMS.....37
- **Figura 8.** Imagen de tórax en posición axial por tomografía computerizada (TC) típica de COVID-19. Se observan opacidades periféricas en vidrio deslustrado bilaterales y en lóbulos pulmonares inferiores.....39
- **Figura 9.** Disposición de las proteínas S en conformación abierta y cerrada sobre la placa de 96 pocillos.....72
- **Figura 10.** Esquema de diluciones del suero por paciente y disposición en placa de 96 pocillos.....73
- **Figura 11.** Estructuración del proyecto de tesis doctoral.....77
- **Figura 12.** Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total.....85
- **Figura 13.** Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total.....86
- **Figura 14.** Títulos de anticuerpos de subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total.....89
- **Figura 15.** Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19.....91
- **Figura 16.** Correlación entre el título de anticuerpos y el título neutralizante.....93
- **Figura 17.** Correlación del título de IgM, IgG total, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes con los días transcurridos desde inicio de síntomas hasta extracción de la muestra de suero.....95
- **Figura 18.** Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna....107
- **Figura 19.** Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna....112
- **Figura 20.** Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna.....116
- **Figura 21.** Correlaciones de los títulos de anticuerpos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en las

subcohortes de inmunocompetentes y de trasplantados según la dosis de la vacuna.....	119
– Figura 22. Correlaciones de los títulos de anticuerpos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los tipos de trasplantados según la dosis de la vacuna.....	122
– Figura 23. Curvas de característica operativa del receptor (ROC) para predecir la actividad neutralizante mediante el título de IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2.....	125
– Figura 24. Curvas de característica operativa del receptor (ROC) para predecir la actividad neutralizante mediante el título de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2.....	126
– Figura 25. Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico.....	128
– Figura 26. Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico.....	130
– Figura 27. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico.....	132
– Figura S1. Imágenes de western blot de los sueros control positivo, negativo y del anticuerpo policlonal SARS/SARS-CoV-2.....	152
– Figura S2. Títulos de IgM e IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sueros control positivo (SC +) y control negativo (SC -).....	158

ÍNDICE DE TABLAS

– Tabla 1. Principales variantes de interés del SARS-CoV-2 y sus características....	34
– Tabla 2. Parámetros de laboratorio asociados al COVID-19 severo.....	40
– Tabla 3. Principales técnicas de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.....	51
– Tabla 4. Variables demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento y evolutivas recogidas en la cohorte de pacientes con COVID-19 agudo.....	61
– Tabla 5. Variables recogidas en las cohortes de vacunados TOS e inmunocompetentes.....	65
– Tabla 6. Composición de las soluciones tampón de bloqueo y dilución, MF4C, LR18, LR5, LR3-StrepTactin-HRP, LR3d y del sustrato de la reacción.....	71
– Tabla 7. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes al ingreso.....	82
– Tabla 8. Características demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento, respuesta inmune humoral y evolutivas del paciente que mejor predijeron el título de anticuerpos neutralizantes. Análisis univariante y multivariante.....	99
– Tabla 9. Características demográficas, clínicas y de tratamiento inmunosupresor en la subcohorte de TOS y en la subcohorte de inmunocompetentes sanos.....	105

- **Tabla S1.** Puntos de corte del título de IgM para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.....159
- **Tabla S2.** Puntos de corte del título de IgG1 para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.....159
- **Tabla S3.** Puntos de corte del título de IgG para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.....160
- **Tabla S4.** Puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir mortalidad con valores de sensibilidad y especificidad. En la cohorte total.....161
- **Tabla S5.** Puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con sus valores de sensibilidad y especificidad. En los pacientes que desarrollaron FR.....163
- **Tabla S6.** Puntos de corte del título de IgM para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En inmunocompetentes vacunados.....165
- **Tabla S7.** Puntos de corte del título de IgM para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En TOS vacunados.....165
- **Tabla S8.** Puntos de corte del título de IgG para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En inmunocompetentes vacunados.....166
- **Tabla S9.** Puntos de corte del título de IgG para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En TOS vacunados.....166

RESUMEN

Título de la tesis

Inmunidad del huésped frente al SARS-CoV-2: implicación en la infección y la progresión clínica de la COVID-19.

Introducción

Aunque la mayoría de infecciones por SARS-CoV-2 son asintomáticas o leves, una proporción significativa de pacientes desarrolla una enfermedad grave con elevada mortalidad. La respuesta inmunitaria humoral del huésped es esencial para determinar la evolución de la enfermedad, sin embargo, la magnitud de esta respuesta es heterogénea en función de las características de los pacientes.

A pesar del impacto global de las vacunas, sigue habiendo colectivos más propensos a sufrir formas graves de la COVID-19. Entre ellos los trasplantados de órgano sólido (TOS) que, por el tratamiento inmunosupresor y las comorbilidades asociadas, no solo tienen más riesgo clínico, sino que, además, las tasas de respuesta inmune tras vacunación son generalmente inferiores a las de la población general.

Objetivos

El objetivo principal fue analizar la respuesta inmune humoral en una cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19 y en otra de sujetos vacunados frente al SARS-CoV-2 (TOS e inmunocompetentes). Los objetivos secundarios fueron caracterizar los anticuerpos específicos IgM e IgG totales, subclases de IgG y su funcionalidad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19, además de estudiar su relación con la progresión clínica. Por otra parte, se caracterizó esta respuesta tras la administración de la vacuna en TOS y en individuos inmunocompetentes. Además, se investigó la asociación entre los títulos de anticuerpos específicos y neutralizantes con características de los pacientes. También se quiso identificar un punto de corte del título de IgM o IgG que pudiese predecir la presencia de anticuerpos neutralizantes. Finalmente, se pretendió comparar los niveles de anticuerpos inducidos tras la vacunación con los de pacientes COVID-19.

Material y Métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal prospectivo en dos cohortes de estudio. La cohorte de estudio 1 estaba compuesta por 160 pacientes hospitalizados con COVID-19 durante marzo y abril de 2020. Los pacientes se clasificaron en cuatro grupos clínicos en función de la gravedad: fallo respiratorio (FR) y exitus, FR y supervivencia, oxigenoterapia sin FR y sin oxigenoterapia. Se extrajo suero al ingreso para determinar los títulos de IgM, IgG, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2. La cohorte de estudio 2 estaba compuesta por una subcohorte de 43 TOS (29 renales y 14 hepáticos) y otra subcohorte de 33 sujetos inmunocompetentes, ambas vacunadas con ARNm-1273. Se extrajeron sueros para determinar los títulos de

IgM, IgG, y anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 a cada sujeto en tres momentos: basal (antes de administrar la primera dosis vacunal), primera dosis (cuatro semanas después de la primera dosis) y segunda dosis (dos semanas después de la segunda dosis).

Los títulos de IgM, IgG y subclases de IgG se determinaron mediante ELISA. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se detectaron mediante neutralización subrogada, método basado en un ELISA de inhibición en el que los anticuerpos neutralizantes del suero bloquean la unión entre la proteína S viral y el enzima ACE-2 humano.

Resultados

En la cohorte 1 de pacientes con COVID-19, no poseer al ingreso un título detectable de IgM supuso cuatro veces más riesgo de fallecer ($p = 0,028$). Se pudo observar que los pacientes que desarrollaron FR y sobrevivieron tenían un título de IgM seis veces más alto que el de los que no sobrevivieron ($p = 0,001$) y niveles de IgG total ocho veces más altos que los que fallecieron ($p = 0,003$) y que los que requirieron oxigenoterapia ($p = 0,008$). Además, tenían títulos de IgG1 5 veces más altos que los pacientes fallecidos ($p = 0,003$), que los que necesitaron oxigenoterapia ($p = 0,002$) y que los que no requirieron oxigenoterapia ($p = 0,023$). Los fallecidos tenían unos niveles de anticuerpos neutralizantes más bajos que los supervivientes al FR ($p = 0,03$).

Se encontró correlación entre los títulos de IgM, IgG total, IgG1 e IgG3 y los títulos de anticuerpos neutralizantes en la cohorte total, siendo la de IgM con anticuerpos neutralizantes la de mayor magnitud ($\rho = 0,68$). Sin embargo, al analizar por grupos clínicos, las mayores correlaciones del título de anticuerpos neutralizantes con los de IgG total, IgG1 e IgG3 se observaron entre los grupos de menor gravedad.

Interesantemente, al medir la correlación entre los títulos de IgM, IgG total, IgG1, IgG3 y anticuerpos neutralizantes con los días desde el inicio de síntomas a la extracción del suero, esta fue significativa en los dos grupos clínicos de menor gravedad.

Tras el análisis multivariante se pudo comprobar que las características del paciente que predijeron de forma independiente el título de anticuerpos neutralizantes fueron el título de IgM y el de IgG1.

En la cohorte 2 de pacientes vacunados, los títulos de IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes fueron superiores en inmunocompetentes respecto a TOS, tanto tras la primera ($p \leq 0,005$) como tras la segunda dosis ($p < 0,001$). En TOS e inmunocompetentes, el título de IgM e IgG generado tras la segunda dosis fue superior al generado tras la primera dosis ($p \leq 0,002$) y al de la muestra basal ($p < 0,001$). Además, en inmunocompetentes, el título de IgG tras primera dosis fue superior al de la muestra basal ($p < 0,001$). Respecto al título neutralizante, únicamente los inmunocompetentes generaron un título tras segunda dosis superior al de la primera dosis y al del suero basal ($p < 0,001$). Los trasplantados hepáticos tuvieron unos títulos de IgM e IgG tras segunda dosis superiores a los generados por los receptores renales ($p \leq 0,042$). Tras la primera dosis, solamente los títulos de IgM fueron superiores ($p = 0,035$).

Tanto en trasplantados como en inmunocompetentes, la mayor correlación con el título de anticuerpos neutralizantes fue la observada con el título de IgG, tras primera dosis ($p = 0,55$) y tras segunda dosis ($p \geq 0,65$). Los trasplantados hepáticos lograron la mayor correlación para la primera dosis ($p = 0,82$) y para la segunda ($p = 0,92$).

Para inmunocompetentes el valor de 19.200 de IgG predecía la actividad neutralizante con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 90%. Para TOS el valor de 4.800 predecía la actividad neutralizante con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 91%.

Los vacunados inmunocompetentes mostraron unos títulos IgG superiores a los desarrollados por los pacientes COVID-19, tanto tras primera ($p < 0,001$) como tras segunda dosis ($p < 0,001$). Para el título de anticuerpos neutralizantes y de IgM, fue necesario la administración de la segunda dosis para que los vacunados mostrasen un título neutralizante superior al que generaron los pacientes COVID-19 ($p < 0,001$) o por lo menos similar en el caso IgM ($p = 0,511$).

Conclusiones

En los pacientes con COVID-19 y FR, títulos superiores de anticuerpos totales y de anticuerpos neutralizantes se asociaron con mejor pronóstico de la enfermedad.

La correlación de los títulos de anticuerpos totales y neutralizantes con respecto a los días transcurridos desde el inicio de síntomas se observó en los pacientes con COVID-19 que no sufrieron FR.

Los títulos de IgM e IgG1 fueron las variables que mejor predijeron el título de anticuerpos neutralizantes.

La respuesta humoral a la vacuna fue superior en inmunocompetentes que en TOS. En los trasplantados fue necesario la administración de la segunda dosis de la vacuna para producir un incremento destacado de los títulos de IgM e IgG, sin embargo, no fue suficiente para elevar significativamente el título de anticuerpos neutralizantes. Los trasplantados hepáticos mostraron una respuesta humoral superior a los trasplantados renales.

La utilización de un punto de corte del título de IgG para predecir la presencia de anticuerpos neutralizantes tras la vacunación mostró un desempeño muy elevado, especialmente en TOS.

La administración de la segunda dosis de la vacuna en inmunocompetentes generó una respuesta humoral de elevada magnitud, sobre todo de IgG y anticuerpos neutralizantes, siendo superior a la generada tras la infección natural.

ABSTRACT

Title

Host immunity against SARS-CoV-2: implication for infection and clinical progression of COVID-19.

Introduction

Although most SARS-CoV-2 infections are asymptomatic or mild, a significant proportion of patients develop severe disease with high mortality. Host humoral immune response is essential in determining disease progression; however the magnitude of this response is heterogeneous depending on patient characteristics.

Despite the global impact of vaccines, there are patient groups more prone to severe forms of COVID-19. Due to immunosuppressive treatment and associated comorbidities, solid organ transplant patients (SOT) are at higher clinical risk and also have lower immune response rates after vaccination than those of the general population.

Aims

The main objective was to analyze the humoral immune response in a cohort of hospitalized patients with COVID-19 and in a cohort of subjects vaccinated against SARS-CoV-2 (SOT and immunocompetent). The secondary objectives were to characterize the specific IgM and IgG total antibodies, IgG subclasses and their neutralizing activity against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients, as well as to study their relationship with clinical progression. On the other hand, this response was characterized after vaccine administration in SOT and immunocompetent individuals. In addition, associations between specific and neutralizing antibody titers with patient characteristics were studied and a cut-off point for IgM or IgG titer that could predict the presence of neutralizing antibodies was investigated. Finally, the levels of antibodies induced after vaccination were compared with those of COVID-19 patients.

Material and Methods

A prospective cross-sectional study was conducted in two study cohorts. The cohort 1 was composed of 160 hospitalized patients with COVID-19 during march and april 2020. Patients were classified into four clinical groups according to severity: respiratory failure (RF) and exitus, RF and survival, oxygen therapy without RF, and no oxygen therapy. Serum was drawn at admission to determine the IgM, IgG, IgG subclasses and the SARS-CoV-2 S protein neutralizing antibody titers. The cohort 2 was composed of a subcohort of 43 SOT (29 kidney and 14 liver) and a subcohort of 33 immunocompetent subjects, both groups vaccinated with two dosis of the mRNA-1273

vaccine. IgM, IgG, and SARS-CoV-2 protein S neutralizing antibody titers were determined in sera to from each subject at three time points: at baseline (before administration of the first vaccine dose), after the first dose (four weeks after the first dose), and after the second dose (two weeks after the second dose).

IgM, IgG and IgG subclass titers were determined by ELISA. Neutralizing antibody titers were determined using a surrogate neutralization assay, a method based on determining the neutralizing activity of the antibodies present in the patient serum by quantifying using a ELISA assay, the capacity to block the binding between the viral S protein and the ACE-2 human receptor.

Results

We have demonstrated that COVID-19 patients (cohort 1) with no detectable IgM titers at admission had four times increased risk of death than patients with detectable IgM titers ($p = 0.028$). Patients who developed RF and survived had a 6-fold higher IgM titer than those who did not ($p = 0.001$) and 8-fold higher total IgG levels than those who died ($p = 0.003$) and those who required oxygen therapy ($p = 0.008$). In addition, they had IgG1 titers 5 times higher than those who died ($p = 0.003$), those who required oxygen therapy ($p = 0.002$) and those who did not require oxygen therapy ($p = 0.023$). Deceased patients had lower neutralizing antibody levels than RF survivors ($p = 0.03$).

In the total cohort, we found a correlation between having IgM, total IgG, IgG1 and IgG3 titers and neutralizing antibody titers, with IgM and neutralizing antibodies being the highest in magnitude ($p = 0.68$). However, when analyzing by severity groups, the highest correlations of neutralizing antibody titer with those of total IgG, IgG1 and IgG3 were observed among the lower severity groups.

Interestingly, when measuring the correlation between IgM, total IgG, IgG1, IgG3 and neutralizing antibody titers with days from symptom onset to serum collection, it was significant in the two lowest severity clinical groups.

Multivariate analysis showed that the patient characteristics that independently predicted neutralizing antibody titer were IgM and IgG1 titers.

In the vaccinated cohort (cohort 2), IgM, IgG and neutralizing antibody titers were higher in immunocompetent than in SOT, both after the first ($p \leq 0.005$) and second dose ($p < 0.001$). In SOT and immunocompetents, IgM and IgG titer generated after the second dose was higher than after the first dose ($p \leq 0.002$) and the baseline sample ($p < 0.001$). Furthermore, in immunocompetent patients, IgG titer after the first dose was higher than the baseline sample ($p < 0.001$). Regarding the neutralizing titer, only immunocompetents generated a higher titer after the second dose than the first dose and the baseline serum ($p < 0.001$). Liver transplant recipients had higher IgM and IgG titers after the second dose than those generated by renal recipients ($p \leq 0.042$). After the first dose, only IgM titers were higher ($p = 0.035$).

In both transplant recipients groups and immunocompetent recipients, the highest correlation with neutralizing antibody titers was observed with IgG titer, after the first dose ($\rho = 0.55$) and after the second dose ($\rho \geq 0.65$). Liver transplant recipients achieved the highest correlation for the first dose ($\rho = 0.82$) and for the second dose ($\rho = 0.92$).

For immunocompetent individuals, IgG value of 19,200 predicted neutralizing activity with 94% sensitivity and 90% specificity. For SOT the value of 4,800 predicted neutralizing activity with 95% sensitivity and 91% specificity.

Immunocompetent vaccinated individuals showed higher IgG titers than COVID-19 patients, after the first ($p < 0.001$) and second dose ($p < 0.001$). Administration of the second dose was necessary in this group, to detect neutralizing antibody and IgM titers, higher than COVID-19 patients ($p < 0.001$) or at least at similar levels in the case of IgM ($p = 0.511$).

Conclusions

In COVID-19 patients with RF, higher titers of total and neutralizing antibodies were associated with better disease prognosis.

Correlation of total and neutralizing antibody titers with days since symptom onset was observed in COVID-19 patients without RF.

IgM and IgG1 titers were the variables that best predicted neutralizing antibody titer.

Humoral response to the vaccine was higher in immunocompetent patients than in SOT. In transplant recipients, administration of the second dose of the vaccine was necessary to produce a significant increase in IgM and IgG titers; however, it was not enough to significantly increase the neutralizing antibody titer. Liver transplant recipients had a higher humoral response than renal transplant recipients.

Use of IgG titer cutoff point to predict the presence of neutralizing antibodies after vaccination showed a very high performance, especially in SOT.

Administration of the second dose of the vaccine in immunocompetents generated a humoral response of high magnitude, especially IgG and neutralizing antibodies, being higher than those generated after natural infection.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)

A finales de diciembre de 2019, un nuevo coronavirus fue identificado como un nuevo agente infeccioso causante de la etiología de varios casos de neumonía severa en la ciudad de Wuhan, China y fue nombrado como coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). La enfermedad producida fue denominada COVID-19 (enfermedad infecciosa por coronavirus del año 2019), que se diseminó por todo el mundo dando lugar a la actual pandemia (1,2).

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto de RNA de polaridad positiva, con cápsida helicoidal y de un tamaño de 0,1 micras, aproximadamente. Genéticamente, la secuencia de RNA comparte una mayor similitud con los coronavirus del murciélago; concretamente la mayoría de la evidencia apunta a que el coronavirus del murciélago RaTG13 pudo ser el origen del SARS-CoV-2. Sin embargo, no se sabe con exactitud si este nuevo coronavirus pasó directamente de los murciélagos al hombre o si hubo un hospedador intermedio en el que el SARS-CoV-2 acabó de constituirse como tal (3,4).

Durante la infección de las células diana del huésped, la proteína viral de la espícula (S) se une al receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE-2). En el proceso de entrada también participa otro receptor del huésped, la serín proteasa de transmembrana tipo 2 (TMPRSS-2), que se encarga de catalizar la escisión de las subunidades S1 y S2 de la espícula para permitir la fusión de las membranas del virus y de la célula (5,6).

La COVID-19, enfermedad producida por SARS-CoV-2, es mayoritariamente respiratoria, pero puede hacerse sistémica y afectar a prácticamente cualquier órgano, alterar la respuesta inmune y la homeostasia. De manera general, la COVID-19 tiene dos fases bien diferenciadas en el curso de la infección. Una fase temprana correspondiente a la primera semana tras el contagio, caracterizada por la replicación viral. Y una fase tardía a partir de la segunda y tercera semana, caracterizada por una hiper inflamación sistémica y disminución de la replicación viral (7,8).

1.2 Taxonomía

Los Coronavirus u *Orthocoronavirinae* son una subfamilia dentro de la familia *Coronaviridae*, que se encuadra en el orden de los *Nidovirales* (generan primeramente un RNAm discontinuo que sirve de molde para luego replicar la secuencia continua). La familia *Coronaviridae* se subdivide en cuatro Géneros (Figuras 1 y 2): *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Únicamente los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* son los que infectan al ser humano.

Dentro del género *Alphacoronavirus* destacan las especies de coronavirus estacionales 229E y NL63 y en el género *Betacoronavirus* OC43, HKU1 y los coronavirus pandémicos pertenecientes a los subgéneros Sarbecovirus y Mervecovirus.

INTRODUCCIÓN

La especie del coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) pertenece al subgénero Sarbecovirus en el que también está incluido el coronavirus 1 (SARS-CoV-1). En el subgénero Merbecovirus estaría englobado el coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) (9).

Figura 1. Clasificación taxonómica de los principales coronavirus que producen infección en humanos (10).

Orden: *Nidovirales*

Familia: *Coronaviridae*

Subfamilia: *Letovirinae*

Subfamilia: *Orthocoronavirinae*

Género: *Alphacoronavirus*

Subgénero: *Colacovirus*

Subgénero: *Decaacovirus*

Subgénero: *Duvinacovirus*

Especie: *Coronavirus Humano 229E*

Subgénero: *Luchacovirus*

Subgénero: *Minacovirus*

Subgénero: *Minunacovirus*

Subgénero: *Myotacovirus*

Subgénero: *Nyctacovirus*

Subgénero: *Pedacovirus*

Subgénero: *Rhinacovirus*

Subgénero: *Setracovirus*

Especie: *Coronavirus Humano NL63*

Subgénero: *Soracovirus*

Subgénero: *Sunacovirus*

Subgénero: *Tegacovirus*

Género: *Betacoronavirus*

Subgénero: *Embecovirus*

Especie: *Coronavirus Humano HKU1*

Especie: *Coronavirus Humano OC43*

Subgénero: *Hibecovirus*

Subgénero: *Merbecovirus*

Especie: *Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)*

Subgénero: *Nobecovirus*

INTRODUCCIÓN

Subgénero: *Sarbecovirus*

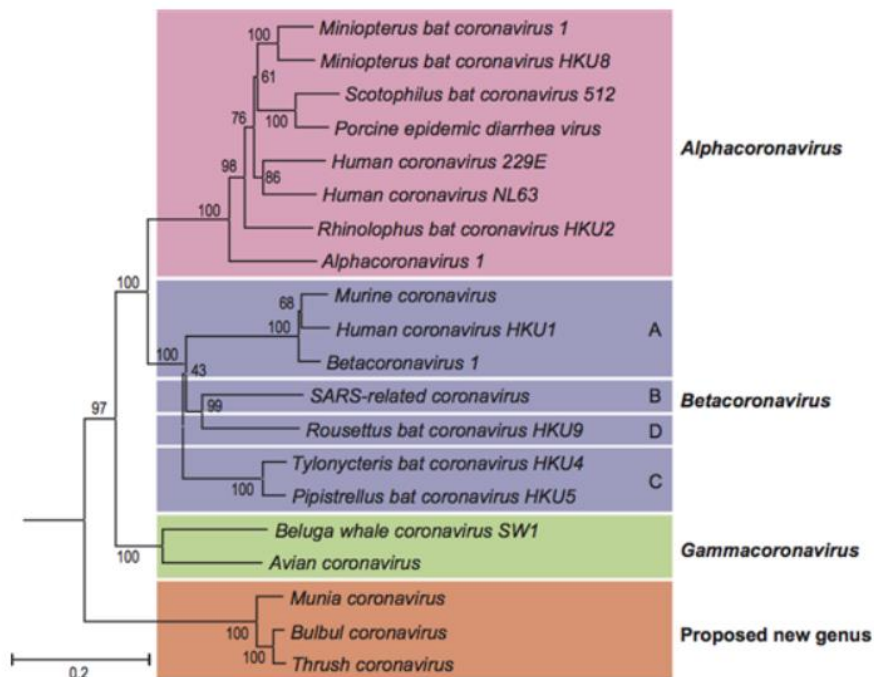
Especie: *Coronavirus 1 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-1)*

Especie: *Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)*

Género: *Gammacoronavirus*

Género: *Deltacoronavirus*

Figura 2. Árbol filogenético de la subfamilia *Orthocoronavirinae* o Coronavirus (10).



1.3 Características genéticas del SARS-CoV-2

Genéticamente el SARS-CoV-2 posee un genoma de RNA de cadena simple con polaridad positiva constituido por unos 30.000 pares de bases aproximadamente, que es considerado un tamaño especialmente grande dentro de los virus de RNA. Posee una tasa de mutación relativamente baja, gracias a la capacidad de corrección de errores de la exonucleasa ExoN, lo que conlleva a que se produzca un cambio de nucleótido por cada millón de nucleótidos copiados; esta es una de las posibles razones que explican la elevada longitud del genoma de esta subfamilia (11).

La estructura genética del SARS-CoV-2 es muy similar al coronavirus del murciélago RaTG13, con un porcentaje de similitud del 96%, seguido por el coronavirus del pangolín con una similitud del 91%. Por contra, los coronavirus humanos con mayor similitud son el SARS-CoV y el MERS con un 80% y un 55%, respectivamente. Los coronavirus causantes del resfriado comparten sólo una similitud del 50% (4,12).

INTRODUCCIÓN

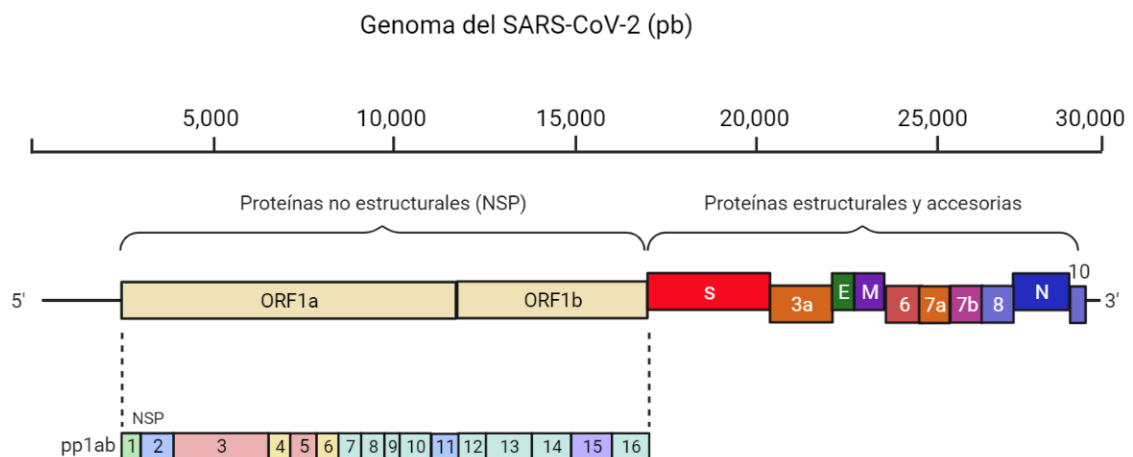
El genoma del SARS-CoV-2 tiene 14 marcos abiertos de lectura (ORF) que dan lugar a 29 proteínas, dado a que tras la traducción del RNAm se produce una gran poliproteína; ORF1ab. Los genes ORF 1a y ORF1b se traducen en la poliproteína del mismo nombre que es cortada gracias a las proteasas virales (3CLpro y PLpro) en 16 proteínas no estructurales (NSP). Entre estas proteínas no estructurales destacan las proteasas, la RNA polimerasa RNA dependiente (RpRd), la helicasa y la exonucleasa (13,14).

Los 4 genes que codifican las 4 proteínas estructurales del virus son el gen S de la espícula, el M de la proteína de membrana, el N de la nucleocápsida y el E de la proteína de la envuelta.

Existen además 6 genes que codifican 9 factores accesorios, estos genes son ORF 3a, ORF 6, ORF7a, ORF7b, ORF8 y ORF10 (Figura 3).

La replicación viral tiene lugar en el citoplasma mediante un mecanismo único de replicación anidada en la que una hebra de RNA líder actúa como guía de la RNA polimerasa viral en varios puntos con extremo 3' idéntico, lo que supone una transcripción discontinua (15).

Figura 3. Genoma del SARS-CoV-2 y proteínas codificadas (16).



Creado con BioRender.com

1.4 Características proteómicas del SARS-CoV-2

El virus está compuesto de un total de 29 proteínas, 16 de las cuales son proteínas no estructurales, 4 proteínas estructurales y 9 factores accesorios (17–20).

1. Proteínas no estructurales (NSP)

Los genes ORF1a y ORF1b codifican para la poliproteína 1ab (pp 1ab), la cual se escinde por auto proteólisis en 16 proteínas no estructurales (NSP1-NSP16), lo que se conoce como el complejo replicasa-transcriptasa. Esta proteólisis tiene lugar gracias a las

INTRODUCCIÓN

proteasas NSP 3 (proteasa similar a la papaína (PLpro), que corta pp1a en 11 proteínas no estructurales) y NSP 5 (proteasa principal (3C-like protease: 3CLPro)), que corta el grupo C-terminal de las proteínas de NSP4 a NSP16 que forman parte de la propia pp1a.

Otras proteínas de este complejo replicasa-transcriptasa son el complejo NSP3/NSP4/NSP6 encargado de inducir la producción de dobles membranas para permitir la replicación viral, el complejo primasa NSP7-NSP8 que actúa como iniciador de la transcripción, NSP9 con capacidad de unión al RNA y permitir la replicación, [de NSP11 no se conoce la función], NSP12 (la RNA polimerasa RNA dependiente (RpRd)), NSP13 con actividad helicasa que permite el desenrollamiento del RNA para ser accesible, NSP14 con actividad exoribonucleasa correctora de errores, NSP15 con actividad endoribonucleasa y el complejo NSP10 (N7-metiltransferasa)/NSP16 (2'-metiltransferasa) que permiten la modificación post-transcripcional (capping) del RNAm para favorecer la correcta traducción.

Además de formar parte del complejo replicasa-transcriptasa, fundamental para la replicación del virus, algunas de estas NSP interfieren directamente sobre procesos celulares (16):

- NSP1: capacidad de alterar el ciclo celular y el transporte nuclear además de inhibir la expresión de interferones de tipo I.
- NSP2: modificar las membranas celulares.
- NSP4: actuar sobre los orgánulos de la célula huésped.
- NSP5: modificar la matriz mitocondrial y los procesos de muerte celular por estrés oxidativo.
- NSP6: influir sobre los transportadores activos de transmembrana.
- NSP7: actuar sobre el transporte nuclear y la estructura de las membranas.
- NSP8: actuar sobre la formación del complejo ribonucleoproteína y la regulación postranscripcional, además de afectar al tráfico del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi.
- NSP9: participar en el desensamblaje de estructuras celulares, transporte nuclear y en el silenciamiento génico.
- NSP10: interferir en la unión de membranas.
- NSP13: interaccionar con la actividad de los microtúbulos, reconfigurar el tráfico del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y también tiene capacidad de alterar la vía del interferón.
- NSP14: actuar sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.
- NSP 15: interferir en la respuesta inmune por la vía del interferón.

INTRODUCCIÓN

2. Proteínas estructurales

Los genes S, E, M y N codifican 4 proteínas estructurales del mismo nombre; la proteína S spike o espícula, la proteína E o proteína de la envuelta, la proteína M o proteína de la membrana y proteína N o proteína de la nucleocápsida. En la Figura 4 se representa un esquema de la localización de las proteínas estructurales dentro del virus. Sus funciones son (5,21,22):

- Proteína S: situada en la envuelta del virus, es un trímero compuesto por las subunidades S1, S2 y RBD (o dominio de unión al receptor). Esta proteína es la encargada de iniciar la infección viral de la célula huésped uniéndose al receptor celular ACE-2, concretamente a través de la subunidad RBD que está contenida en la subunidad S1. A continuación, la proteína del huésped TMPRSS-2 se encarga de la digestión realizando un corte proteolítico entre los dominios S1 y S2, permitiendo que la subunidad S2 cumpla la tarea de fusionar las membranas del virus con la célula diana, por medio de una región rica en aminoácidos hidrofóbicos llamada péptido de fusión

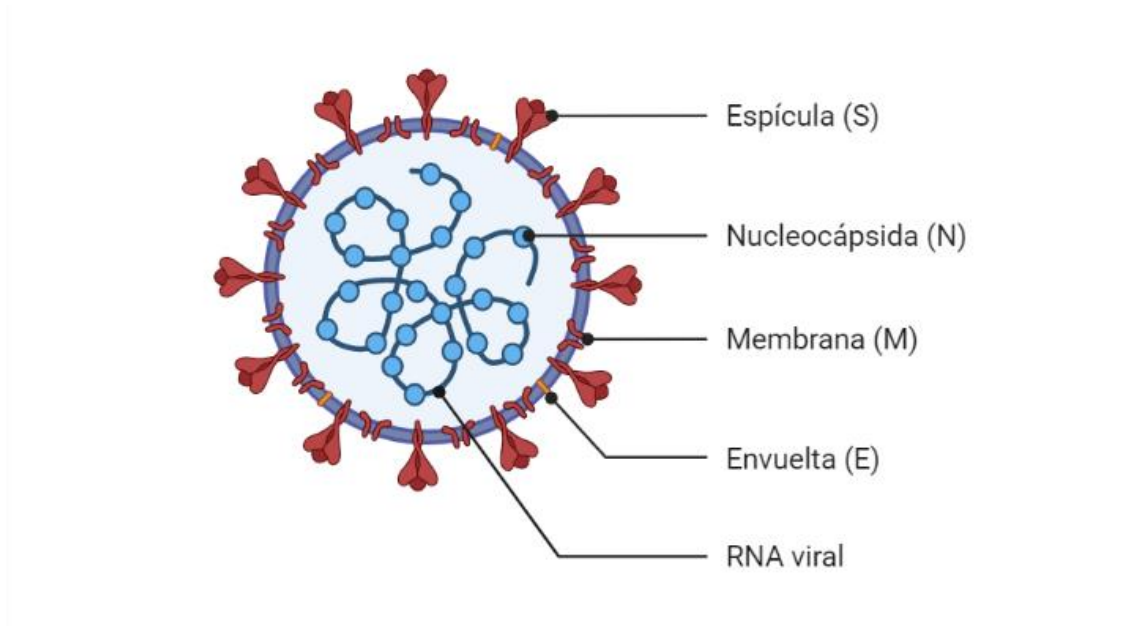
- Proteína E: es la proteína de la envuelta y la más pequeña del virus. Se encarga de dar solidez a la envuelta y es fundamental para el ensamblaje y liberación de la partícula viral. Además, modifica los compartimentos de la endomembrana para favorecer la replicación.

- Proteína M: se encuentra también en la envuelta y es la proteína más abundante en esta localización. Permite la incorporación de la espícula a la envuelta de los nuevos virus, además interactúa con E para facilitar la producción y salida del virión de la célula huésped. También tendría un papel relevante en las membranas celulares y en el transporte a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Además, es capaz de inhibir el factor de transcripción NFκB.

- Proteína N: se encuentra unida al material genético y es la proteína más abundante del virus. Su función principal es mantener la estabilidad del material genético en el interior de la estructura viral y permitir su entrada en la célula. Además, interacciona con componentes celulares como la inhibición del interferón de tipo I o del ciclo celular inhibiendo el complejo CDK.

INTRODUCCIÓN

Figura 4. Localización de las proteínas estructurales dentro del virus.



Creado con BioRender.com

3. Factores accesorios

En cuanto a los factores accesorios, estos son codificados a partir de los genes ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 y ORF10. Destacar los factores accesorios: (16,17,23).

- ORF3a: actúa sobre la fusión del fagosoma-lisosoma y modificando la endomembrana con la aparición de canales iónicos.
- ORF3b: inhibidor del interferón de tipo I.
- ORF6: estaría implicado en el silenciamiento génico, en el transporte nuclear y actuando sobre la vía del interferón al inhibir el complejo nuclear exportador de RNAm.
- ORF7a: implicado en la inhibición de los interferones de tipo I a través del bloqueo de la glicosilación de BST-2 (antígeno estromal de la médula ósea 2 o tetherina).
- ORF8: papel en el metabolismo de glicoproteínas, el tráfico del retículo endoplasmático y aparato de Golgi y la evasión del sistema inmune a través de la inhibición del interferón β .
- ORF9b: participa en el desensamblaje de los componentes celulares e interfiriendo en la respuesta del interferón impidiendo la activación de IRF-3 (factor regulador del interferón de tipo 3, que favorece la transcripción de interferón α y β).

1.5 Epidemiología

Desde su aparición en China a finales de 2019, el SARS-CoV-2 se ha expandido por todo el mundo produciendo hasta la fecha más de 660 millones de casos y casi 7 millones de muertos (24).

La vía de transmisión mayoritaria es de persona a persona a través de secreciones respiratorias en contacto cercano (inferior a los 2 metros), pero también se ha descrito la transmisión a través de aerosoles generados en la tos o estornudos y que tienen un alcance superior a los dos metros al estar las partículas suspendidas en el aire (25,26). Otra vía, aunque minoritaria, es a través del contacto con superficies contaminadas para a continuación entrar en contacto con las mucosas, a través de las manos mayormente (27). Aunque el SARS-CoV-2 ha sido detectado en muestras no respiratorias como las heces, el semen, la sangre o las secreciones oculares, su papel en la transmisión no es significativo (28).

En cuanto a la transmisión congénita, han sido descritos pocos casos a partir del tercer trimestre de embarazo, estimándose en torno al 2% de las madres infectadas siendo por tanto una vía de infección muy poco habitual (29).

Respecto al período de infectividad, el momento de máxima probabilidad de transmisión se sitúa en la fase más temprana de la enfermedad, coincidiendo con la mayor carga viral. Concretamente se estima en dos días antes del inicio de síntomas y durante los 7 primeros días de síntomas, más allá de este período el riesgo de transmisión es muy bajo (30,31).

De manera general la duración media de detección del material genético viral en muestras respiratorias es de 18 días, pero analizándolo por grupos de edad y gravedad clínica, en los pacientes mayores y con un cuadro clínico más grave este período de detección puede ser más prolongado (32,33).

Aunque la detección del RNA del virus pueda hacerse durante períodos de tiempo muy prolongados, incluso cuatro meses después del inicio de síntomas, esto no indica capacidad infecciosa necesariamente (32,34). En los estudios de viabilidad viral en cultivo se ha visto que, en la mayoría de pacientes leves-moderados, la detección de virus viable más allá de los 10 días del inicio de síntomas es muy excepcional. En pacientes con cuadro grave o inmunodeprimidos se ha demostrado viabilidad del virus entre los 21-103 días del inicio de los síntomas (34-36).

La viabilidad viral está relacionada con la carga viral, y algunos trabajos han fijado un punto de corte por debajo del cual el paciente no tendría virus con capacidad infecciosa. El punto de corte se ha establecido en una carga viral por debajo de 10^6 copias/mL o un Ct mayor de 25, aunque este último parámetro está sujeto a gran variabilidad dependiendo de la NAAT (técnica de amplificación de ácidos nucleicos) y las dianas génicas empleadas (37,38).

Adicionalmente, existen numerosas evidencias, entre las que se incluyen estudios de viabilidad viral, que confirman la capacidad de transmisión del SARS-CoV-2 en individuos

INTRODUCCIÓN

asintomáticos o presintomáticos (39,40). Sin embargo, la capacidad transmisora de los pacientes sintomáticos es superior, hasta casi cuatro veces más, a la de los pacientes sin síntomas (41,42). Dado que los pacientes asintomáticos no tienen sospecha de estar infectados, no suelen tomar medidas preventivas o de aislamiento, contribuyendo en gran medida a la transmisión del virus a otros individuos de su entorno. En este sentido, en un estudio publicado por el CDC se estimó que el 59% de los contagios han sido debidos a individuos asintomáticos o presintomáticos (43).

1.6 Patogenia y respuesta inmune

1.6.1 Consideraciones generales

La infección de las células del huésped se produce a través de la proteína espícula en conformación prefusión, concretamente mediante la región RBD. El RBD se une al receptor ACE-2 del huésped y se genera un cambio conformacional en la espícula facilitado por el correceptor del huésped TMPRSS-2, que realiza un corte entre las subunidades S1 y S2 de la espícula. En ese momento la espícula pasa a conformación post fusión permitiendo la entrada del virus al interior de la célula huésped (5,21).

La respuesta inmune innata es la primera en actuar, principalmente a través de macrófagos y neutrófilos que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el material genético viral, o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) generados por las células infectadas. Tanto los PAMPs como los DAMPs, son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores similares a Toll de tipo 3 (TLR-3) o similares a RIG-I (RLRs). Este reconocimiento supone la secreción de citoquinas (IL-6, INF- α , INF- β e INF- γ y mayormente) y quimiocinas (proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL-10)) lo que facilita la atracción de más células del sistema inmune. Dentro de las células de la respuesta innata destacadas en la infección por SARS-CoV-2 y en otras viriasis están los linfocitos NK, los cuales son estimulados por las citoquinas anteriormente nombradas y tiene por un lado, una función efectora facilitando el aclaramiento viral, y por otro lado una función coordinadora de las respuesta innata y adaptativa (44–47).

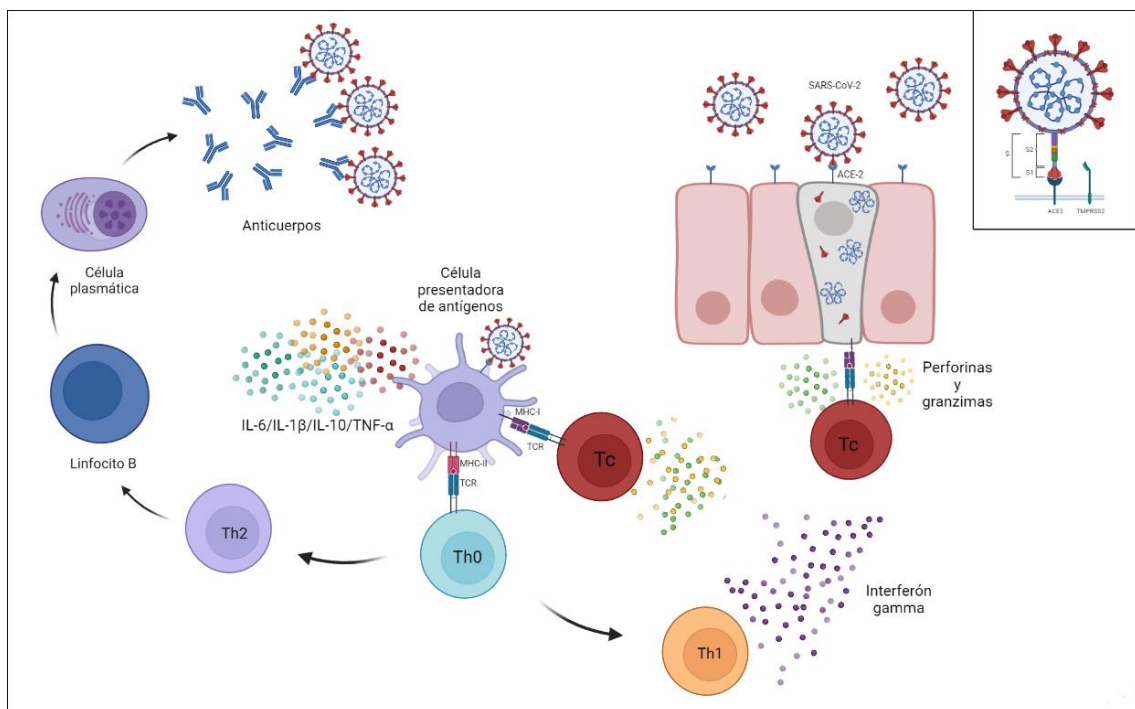
La acción de la respuesta inmune adaptativa va precedida de la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos), aunque también directamente por las células infectadas. Cuando los antígenos son presentados a través de complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) se produce la activación de los linfocitos T CD8 citotóxicos (Tc) mediante su TCR. Los linfocitos T CD8 actuarían directamente lisando las células infectadas por la liberación de perforinas y granzimas (48,49).

Cuando los antígenos son presentados a través de complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), se produce la activación de los linfocitos T CD4 colaboradores (Th), inicialmente Th0. Estos últimos se diferencian en Th1 que aumentaría la liberación de INF- γ o activaría a más linfocitos T CD8, o por otro lado se

INTRODUCCIÓN

diferencian en Th2 que estimularían a los linfocitos B para expandirse, transformarse en células de memoria y células plasmáticas y liberar anticuerpos frente al virus. En la Figura 5 se representa un esquema de la respuesta inmune adaptativa ante la infección por SARS-CoV-2. Posteriormente los linfocitos B de memoria llevarán a cabo el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad de los anticuerpos mediante mutación somática, lo que permitirá optimizar la respuesta humoral (50). Estos anticuerpos pueden actuar neutralizando la entrada del virus o eliminando directamente las células infectadas. Esta eliminación de las células infectadas se puede llevar a cabo a través de la activación de la vía clásica del complemento (formación del CAM y proteínas del complemento que atraen a células inmunes) o facilitando la fagocitosis o la citotoxicidad mediada por anticuerpos mediante el receptor Fc (51).

Figura 5. Respuesta inmune adaptativa ante la infección por SARS-CoV-2.



Creado con BioRender.com

1.6.2 Inmunopatogenia

En el pulmón el SARS-CoV-2 infecta mayoritariamente a las células alveolares tipo 2 (que tienen gran expresión de ACE-2), lo que supone una disminución en la liberación de interferón (52). La respuesta inmune innata, a través de células epiteliales pulmonares, macrófagos alveolares y neutrófilos, hace de iniciadora de la respuesta adaptativa a través de linfocitos T y B (53). En los casos de infección grave, tiene lugar lo que se conoce como síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en el que se produce una inflamación de las células del endotelio pulmonar, daños alveolares difusos y daños

INTRODUCCIÓN

en la membrana hialina de los alvéolos; lo que conduce al ensanchamiento intersticial y al edema pulmonar (54). Este edema de pulmón se debe a la infiltración masiva de células de la respuesta adaptativa. La disminución del número de linfocitos en sangre periférica vista en los pacientes graves se ha explicado por la infiltración pulmonar masiva de éstos, y por tanto su secuestro en los pulmones (55,56).

Además, en estos casos se observa una mayor expresión de genes de activación y migración (GZMA, GZMK, ITGA1 y CXCR6), así como la liberación de elevados niveles de citoquinas proinflamatorias y procoagulantes, que darán lugar al síndrome de liberación de citoquinas o tormenta de citoquinas, un estado hiperinflamatorio característico de los pacientes con un cuadro severo. En la tormenta de citoquinas destacan sobre todo IL-6, TNF- α e IL-1 β como principales artífices de este estado de hiperinflamación, que además están implicados específicamente en los mecanismos que conllevan a la linfopenia y a una respuesta Th1 inadecuada (53,57,58).

De manera general, en el síndrome de liberación de citoquinas se elevan quimiocinas y citoquinas como CCL2/3/5, CXCL8/9/10, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-33, factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA) o subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB), lo que va a favorecer el reclutamiento de más leucocitos hacia los tejidos y por tanto potenciar el daño tisular (59,60). Además, las citoquinas liberadas por los linfocitos Th17 (IL-17 principalmente) se han visto implicadas especialmente en el daño pulmonar al facilitar la permeabilidad vascular y por tanto la afluencia masiva de células del sistema innato (61).

Aunque la respuesta celular T es esencial para el control de la infección, también puede ser responsable del daño en los tejidos si esta respuesta es excesiva, a través de una mayor liberación de citoquinas y mayor actividad efectora seguida de extenuación celular. Cuando la respuesta efectora de los linfocitos T se prolonga mucho en el tiempo por una estimulación antigénica constante, éstos comienzan a sobreexpresar receptores inhibidores de la respuesta inmune como PD-1, CTLA-4, TIM-3 o TIGIT, lo que da lugar a una progresiva pérdida de la función efectora; es lo que se conoce como extenuación de los linfocitos T y es observada principalmente en los casos severos (62–64).

En líneas generales, los pacientes con cuadros graves de COVID-19 presentan una descoordinación entre las respuestas innata y adaptativa, lo que se traduce en una liberación masiva de citoquinas y la presencia de linfocitos T que sobreexpresan marcadores de extenuación, lo que en última instancia permite la infección masiva del virus y el daño tisular (53).

INTRODUCCIÓN

1.6.3 Respuesta inmune humoral

1.6.3.1 Cinética de la respuesta inmune humoral, isotipos y subclases de inmunoglobulinas

Entre los 7 y 21 días, la gran mayoría de los individuos infectados desarrollan anticuerpos frente a los antígenos estructurales del virus, principalmente frente a la proteína N y frente a la proteína S (65).

Los principales isotipos de las inmunoglobulinas son las IgA, IgM e IgG, y aparecen de manera prácticamente simultánea en la primera semana del inicio de síntomas. Las IgG pueden tardar unos días más en aparecer, pero perduran más tiempo y tienen mayor afinidad por los antígenos (65).

El isotipo IgM se utiliza como marcador de infección aguda y se empieza a elevar en la primera semana de los síntomas para alcanzar el pico de su título entre los 20-30 días tras la infección (66,67). A partir del mes de la infección, el título empieza a descender progresivamente (68).

El isotipo IgA aparece entre los 6-8 primeros días tras la infección, alcanzando el pico a los 20-22 días (66,69). A partir de los dos meses el título desciende (68).

Por último, el isotipo IgG, que se utiliza como marcador de infección previa o infección presente de varios días de evolución, se eleva a los 10-14 días del comienzo de la infección, tras la presentación de antígenos a los linfocitos T y el cambio de isotipo. El pico de título de anticuerpos se alcanza el día 25-30 (70,71). El título se mantiene elevado más de 6 meses después del inicio de la sintomatología (72).

Los anticuerpos IgG se dividen en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. De manera general IgG1 e IgG3 son subclases que actúa típicamente frente a antígenos proteicos bacterianos y virales, mientras que IgG2 suele actuar frente a polisacáridos, más habituales en bacterias capsuladas. La subclase IgG4 se relaciona con cuadros alérgicos e infecciones parasitarias. En la infección por SARS-CoV-2 las dos subclases que se han visto más elevadas son IgG1 e IgG3, típicamente elevadas en infecciones virales. Además estas dos subclases tienen un peso muy elevado en la neutralización, fagocitosis, activación del complemento y en el caso de IgG1 de permitir la citotoxicidad mediada por anticuerpos (73,74).

Respecto a la diana viral, los anticuerpos IgG frente a N suelen aparecer junto a los anticuerpos frente a S pero son los que menos tiempo están circulantes, teniendo una vida media de dos meses (75). Por el contrario, los anticuerpos IgG frente a S, y concretamente frente a la región RBD, son los que tienen mayor título y mayor permanencia en el suero, siendo detectables a los seis meses o más en la mayoría de pacientes convalecientes, aunque en los dos primeros meses haya un descenso del título (75-77). Los anticuerpos detectados en los dos primeros meses corresponden a los generados por las células plasmáticas de vida corta, mientras que los que se detectan a partir del segundo mes y que se prolongan hasta los 6 meses o más, corresponderían a los producidos por células plasmáticas de vida larga o linfocitos B de memoria (78,79). Respecto a la función neutralizante, la mayoría de los anticuerpos con actividad

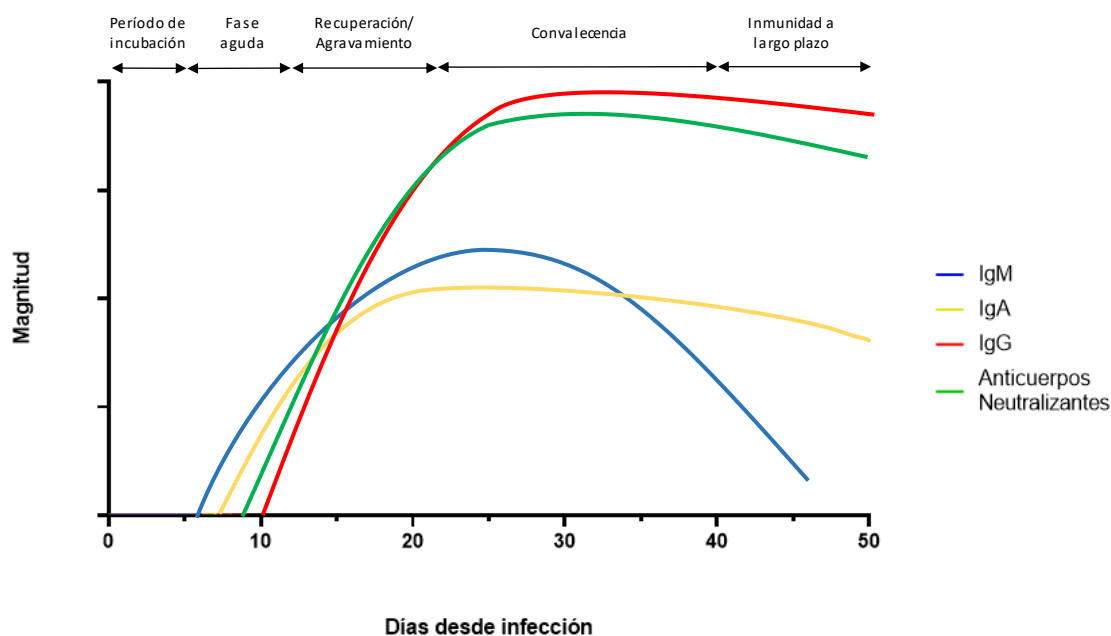
INTRODUCCIÓN

neutralizante descritos, van dirigidos frente a la proteína S, y se ha demostrado una buena correlación entre estos y los títulos de anticuerpos totales específicos frente a S, ya sean de los isotipos IgA, IgM o IgG (80).

Es importante añadir que existen estudios que han comprobado un aumento, a los pocos meses de la infección, del número de linfocitos B de memoria y células plasmáticas circulantes específicas de la proteína S y concretamente de la región RBD, lo cual sugeriría una respuesta humoral a largo plazo, aunque el título de anticuerpos circulantes disminuya con el tiempo (81,82).

La cinética de los diferentes isotipos de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 se representa en la Figura 6.

Figura 6. Cinética de los anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 a lo largo del período clínico. Se representa magnitud de respuesta frente a días desde la infección.



1.6.3.2 Magnitud de la respuesta humoral y su relación con la gravedad clínica

La magnitud del título de anticuerpos generado (ya sea IgA, IgM o IgG), depende de la gravedad del cuadro clínico, siendo los casos más severos los que demuestran una respuesta de anticuerpos más elevada. En los casos leves esta respuesta es inferior, pudiendo en algunos casos a no desarrollar actividad neutralizante; esto podría ser explicado porque en las formas severas se genera un estado de hiperinflamación y replicación viral descontrolada que daría lugar a una hiperproducción de anticuerpos, situación que no tiene lugar en los cuadros leves (83,84).

No obstante, la precocidad en la aparición de los anticuerpos se ha relacionado positivamente con un mejor pronóstico de la enfermedad y un aclaramiento más rápido

INTRODUCCIÓN

de la carga viral (85–87). Según el estudio de Lau et al (86), los pacientes leves y asintomáticos lograban alcanzar el pico del título de anticuerpos neutralizantes a los 60 y 30 días respectivamente, mientras que los pacientes graves tardaban 90 días en alcanzar este pico, aunque era de mayor magnitud. Además, existe abundante evidencia de que los anticuerpos específicos IgG y neutralizantes frente a la proteína S se asocian con mayor protección frente a reinfecciones (88,89).

Mención aparte requiere la hipótesis de que en la infección grave por SARS-CoV-2 se produjese un fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), el cual tiene lugar a través de dos vías. Por un lado, mediante una unión de baja afinidad entre anticuerpo y antígeno, de tal manera que cuando el inmunocomplejo es fagocitado por una célula fagocítica portadora del receptor Fc γ , el virus se libera al interior de la célula favoreciendo la replicación. La otra vía consistiría en que la unión antígeno anticuerpo generaría una respuesta efectora Fc γ exagerada con liberación de citoquinas, atracción de células inmunes y activación del complemento, lo cual generaría una respuesta hiperinflamatoria (85). Los estudios que manejan esta hipótesis sugieren que este fenómeno ADE se debería a elevados títulos de IgG frente a N, lo cual supondría una elevación de la carga viral y un pronóstico clínico desfavorable con incremento de la mortalidad, días de estancia hospitalaria y mayor riesgo de ingreso en UCI (90,91).

1.6.3.3 Respuesta humoral frente a coronavirus estacionales en la infección por SARS-CoV-2

Se ha sugerido que la presencia de inmunidad humoral previa frente a coronavirus estacionales en los pacientes COVID-19 podría tener un papel en la modificación de la progresión de la enfermedad o de la respuesta inmune. Los estudios realizados al respecto no han demostrado una clara relación, dado que no se ha observado una mejora de la mortalidad, una disminución del riesgo de enfermedad severa o un aumento de la respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 en estos individuos (76,92). No obstante, si se ha reportado un aumento del título de anticuerpos frente a la proteína S de coronavirus estacionales en las infecciones por SARS-CoV-2, principalmente frente a Betacoronavirus, al ser los que tienen mayor similitud antigénica con el SARS-CoV-2 (76).

1.6.3.4 Anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes tienen la capacidad de unirse a proteínas externas de los patógenos impidiendo la unión de las proteínas a su receptor en la célula diana impidiendo la infección. En la membrana del SARS-CoV-2 se localizan 3 proteínas estructurales, la proteína S, M y E. Aunque las tres generan anticuerpos neutralizantes, el mayor número de estos están dirigidos frente a epítopos en la proteína S, responsable de unirse al receptor celular ACE-2 durante el proceso de entrada iniciando la infección. En este contexto, los anticuerpos neutralizantes bloquean la interacción de la proteína S con el receptor ACE-2, uniéndose al dominio S1 que media esta interacción, o al dominio S2 que permite la fusión de membranas. A su vez, se ha descrito que los

INTRODUCCIÓN

anticuerpos neutralizantes más potentes son los que reconocen la región RBD del dominio S1, ya que es la región que interacciona directamente con el receptor ACE-2 (93,94).

Aunque mayoritariamente el isotipo IgG es el que efectúa la neutralización, los isotipos de inmunoglobulinas M y A también pueden tener actividad neutralizante. En el caso de los anticuerpos neutralizantes IgA, ejercen una acción neutralizante principalmente en fases tempranas, al estar muy elevados en saliva y lavado broncoalveolar, aunque se han detectado hasta 2 meses después del inicio de síntomas (95).

La cinética de los anticuerpos neutralizantes es similar a la de los anticuerpos totales IgG, con una primera fase de pronunciado descenso del título en el segundo mes post infección, a partir del cual se produce una disminución progresiva aunque el título puede perdurar más de 6 meses (96,97). Estos anticuerpos más tardíos generados a partir de linfocitos B de memoria, experimentan mutaciones somáticas y un incremento de la potencia neutralizante (96).

Aunque *a priori* en un proceso infeccioso la presencia de anticuerpos neutralizantes parece crucial para controlar la replicación viral y proteger frente a la infección, existe una situación paradójica sobre la magnitud de esta respuesta en los pacientes COVID-19 y su relación con la gravedad clínica. De la misma manera que con los anticuerpos totales, el título de anticuerpos neutralizantes es superior en infecciones severas respecto a infecciones leves o asintomáticas, donde incluso en estos últimos casos se llega a no detectar actividad neutralizante (98). El factor que condicionaría el buen pronóstico del cuadro clínico sería la precocidad en la aparición de la actividad neutralizante, de tal manera que una respuesta más precoz se correlaciona positivamente con la supervivencia y aclaramiento de la carga viral (86,87).

En sujetos que tienen un bajo título de anticuerpos, frente a RBD principalmente pero también frente a S completa y N se han descrito más casos de reinfección (99,100). Esto se relacionaría con una menor actividad neutralizante, menor actividad mediada por Fc (fagocitosis y citotoxicidad mediadas por anticuerpos) y menor respuesta T dependiente (99). Otro factor que influiría en las reinfecciones es la baja avidéz de las IgG, es decir una baja fuerza de unión entre el anticuerpo y los epítomos del antígeno; esto ocasionaría una unión débil entre ambos y por tanto, una mayor capacidad del patógeno para evadir la acción del sistema inmune. Se ha observado que en la gran mayoría de infecciones por SARS-CoV-2, la avidéz de las IgG no es elevada, aumentando ligeramente a partir de los dos meses de la infección (101). Sin embargo, en casos de COVID graves o en sujetos que han generado un elevado título neutralizante frente a RBD, la avidéz es bastante elevada, posiblemente por una prolongada exposición a altas cargas virales (102). Por tanto, en los casos con un bajo título de anticuerpos se podría explicar la baja avidéz de los anticuerpos por la baja activación y diferenciación de linfocitos B de memoria, lo cual supondría menor secreción de anticuerpos y por tanto una menor afinidad por los antígenos (103).

INTRODUCCIÓN

1.7 Variabilidad genética del SARS-CoV-2

Como otros virus de RNA, SARS-CoV-2 puede sufrir mutaciones en su genoma con una tasa de errores de un nucleótido por cada millón copiado (104,105).

Desde el comienzo de la pandemia se han seleccionado un número elevado de variantes, la mayoría de ellas con características genéticas desfavorables para el virus, con una capacidad de expansión limitada y por tanto con un papel anecdótico. Sin embargo, una pequeña proporción de estas mutaciones han dado lugar a variantes de preocupación, o cepas que han supuesto un cambio sustancial en el marco sanitario. Estas variantes se han caracterizado por presentar tasas de infectividad superiores, producir cargas virales más elevadas, cambios en la letalidad y gravedad clínica, capacidad de diseminación o evasión del sistema inmune disminuyendo la capacidad de unión de anticuerpos generados en infecciones previas, la efectividad de las vacunas o los tratamientos con anticuerpos monoclonales. En la Tabla 1 se representan las principales variantes de interés del SARS-CoV-2 y sus características.

Una de las primeras mutaciones relevantes fue la mutación D614G que sustituía una adenina por una guanina en la posición 23.403 de la cepa de referencia de Wuhan D614. Esta mutación suponía el cambio del ácido aspártico por glicina en la posición 614 de la proteína S (106). Este polimorfismo se expandió de una manera exponencial por todo el mundo a partir de febrero de 2020 y paso a ser el dominante. Las variantes con el polimorfismo G614 han demostrado ser más infecciosas al generar cargas virales más altas y unirse con mayor afinidad al ACE-2, pero por otro lado, no se han asociado a mayor gravedad clínica (107). Tampoco se han relacionado con cambios en la afinidad de los anticuerpos (108). Las sucesivas variantes de preocupación que se han expandido por el mundo han partido de esta mutación, añadiendo nuevas mutaciones. Las variantes de preocupación se describen a continuación y se resumen en la Tabla 1.

1.7.1 Variante Alfa (linaje B.1.1.7)

La variante Alfa, también conocida como 20I/501Y.V1, fue la primera variante de preocupación en aparecer, concretamente en Reino Unido a finales de 2020. Esta variante acumulaba 29 mutaciones, nueve de ellas en la proteína S, entre las que destacaba la mutación N501Y en la región RBD (109). Esta variante supuso inicialmente un aumento local de las infecciones, para finalmente afectar a varios países y llegar a ser la variante predominante en todo el mundo hasta la selección de la variante Delta.

Los estudios al respecto han evidenciado que la variante alfa es hasta un 75% más infecciosa y con tasas de ataque secundario (número de casos de una enfermedad que aparecen dentro del periodo de incubación entre los contactos susceptibles) superiores a las variantes anteriores (110,111). Sin embargo, no está claro que se asocie con una mayor gravedad clínica, ya que distintos estudios han llegado a conclusiones opuestas (112–114). En cuanto al escape inmunológico, no hay constancia de que la actividad neutralizante de los anticuerpos generados en infecciones previas por otras variantes o tras la vacunación, sea menor en la variante Alfa (109,115).

1.7.2 Variante Beta (linaje B.1.351)

La variante Beta, también conocida como 20H/501Y.V2, fue identificada en Sudáfrica a finales de 2020. A pesar de compartir mutaciones con la variante Alfa (como la N501Y) tiene un origen filogenético distinto. Se expandió rápidamente por Sudáfrica y llegó a alcanzar otros países sugiriendo a priori una mayor transmisibilidad, que según algunos estudios sería un 50% superior a las variantes circulantes antes de su aparición. Sin embargo, su prevalencia fue reduciéndose progresivamente incluso en Sudáfrica (116,117).

En esta variante, además de la mutación N501Y, se seleccionaron las mutaciones E484K y K417N, todas ellas en la proteína S, que le proporcionó una mayor capacidad de transmisión, además de una disminución de la actividad neutralizante de los anticuerpos generados por la vacuna, por infecciones previas o por anticuerpos monoclonales (118,119). Esta disminución de la actividad neutralizante no ha tenido una clara correlación clínica, probablemente debido a la acción de otros mecanismos de acción de los anticuerpos de defensa frente a la infección o por la inmunidad celular. De hecho, los estudios realizados no demostraron una pérdida significativa de protección frente a la infección en los pacientes vacunados, aun disminuyendo la actividad neutralizante (120).

1.7.3 Variante Gamma (linaje P.1)

La variante Gamma también denominada 20J/501Y.V3, procede de la cuenca del Amazonas en Brasil, aunque inicialmente fue descrita en Japón, aislada en 4 turistas japoneses que venían de Brasil (121). Al igual que la variante Beta, ha sido la variante mayoritaria en la región de origen y se ha diseminado por otros países, pero su prevalencia fue reduciéndose progresivamente. Las mutaciones más destacadas en la proteína S son la mutaciones N501Y, E484K y K417T, similares a las descritas en la variante Beta, por lo que la principal preocupación hacia esta variante fue por su mayor potencial de transmisibilidad o evasión de la respuesta inmune generada por infección previa, vacunación o terapia con anticuerpos monoclonales (118,122,123).

1.7.4 Variante Delta (linaje B.1.617.2)

La variante Delta, también conocida como 20A/S:478K, apareció por primera vez en la India a finales de 2020 y se ha expandido globalmente, desplazando a la variante Alfa y siendo la variante mayoritaria en todo el mundo hasta la llegada de Ómicron. Entre las mutaciones de la proteína S con más influencia en el fitness viral destacan L452R y T478K.

La variante Delta es la que ha demostrado mayor capacidad de trasmisión después de Ómicron. La tasa de ataque secundario asociada a convivientes se ha situado entre el 13,6% y el 53% (124). Esta tasa de transmisibilidad mayor se ha explicado por una mayor

INTRODUCCIÓN

capacidad de replicación viral, al detectarse cargas virales superiores a las descritas en pacientes infectados por otras variantes, y a que se ha encontrado principalmente en el tracto respiratorio superior (TRS) de los infectados (125). Además de una mayor transmisibilidad, diversos estudios han mostrado una mayor gravedad de los cuadros clínicos producidos por esta variante y mayor riesgo de hospitalización (126). Sin embargo, los individuos vacunados han demostrado una alta protección a desarrollar formas graves tanto frente a Delta como a otras variantes. Por el contrario, los datos sugieren una ligera disminución de la protección frente a la enfermedad sintomática (127).

1.7.5 Variante Ómicron (linaje B.1.1.529) y sublinajes

La variante Ómicron de SARS-CoV-2 fue descrita por primera vez en noviembre de 2021 en Botsuana y Sudáfrica. Esta variante ha destacado por el aumento exponencial de los contagios, inicialmente de manera local, y posteriormente extendiéndose por el resto de países, llegando a ser la variante mayoritaria a nivel global. Del sublinaje BA.1 inicial han surgido otros sublinajes con cada vez mayor capacidad de transmisión como BA.2, BA.4 y BA.5, estos dos últimos de hecho están desplazando a los anteriores sublinajes (27,128).

Dependiendo del sublinaje, la variante Ómicron posee en torno a 30 mutaciones en la proteína S, muchas de ellas previamente descritas en otras variantes y relacionadas con una mayor capacidad de replicación y de evasión de la respuesta inmune de los anticuerpos. Desde el primer sublinaje BA.1 a los dos últimos descritos, BA.4 y BA.5, la capacidad de replicación ha ido en aumento, lo que se ha reflejado en una mayor transmisibilidad con cada nuevo sublinaje. Además, tienen una sensibilidad reducida a la acción de los anticuerpos neutralizantes, tanto del suero de infectados con variantes previas como en los vacunados; aumentando el riesgo de reinfección. En personas con infección previa y vacunación o en individuos vacunados que han recibido recientemente la dosis de refuerzo parece que esta reducción de la sensibilidad a la acción neutralizante está disminuida (129,130).

En lo relativo a la gravedad clínica de la infección, todo parece indicar que la enfermedad es menos grave en los infectados por Ómicron independientemente del sublinaje, con menor tasa de hospitalización y letalidad, ya que parece tener mayor replicación en tracto respiratorio superior y menos en el tracto inferior (131,132).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales variantes de interés del SARS-CoV-2 y sus características (133).

Denominación OMS	Otras denominaciones	País de origen	Mutaciones en la proteína S	Características
Alfa	B.1.1.7 ¶ 20I/501Y.V1 §	Reino Unido	Δ 69/70 Δ 144Y N501Y A570D D614G P681H	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión hasta en un 50%. • Posible mayor riesgo de hospitalización y letalidad. • Sin Impacto significativo en la actividad neutralizante de los anticuerpos generados en pacientes convalecientes, vacunados o las terapias con anticuerpos monoclonales.
Beta	B.1.351 ¶ 20H/501.V2 §	Sudáfrica	K417N E484K N501Y D614G	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión hasta en un 50%. • Impacto significativo en la actividad neutralizante de la terapia con Bamlanivimab-etesivimab. • Reducción moderada de la actividad neutralizante del suero de convalecientes y vacunados.
Gamma	P.1 ¶ 20J/501Y.V3 §	Japón/ Brasil	K417N/T E484K N501Y D614G	<ul style="list-style-type: none"> • Impacto significativo en la actividad neutralizante de la terapia con Bamlanivimab-etesivimab. • Reducción de la actividad neutralizante del suero de convalecientes y vacunados.
Delta	B.1.617.2 ¶ 20A §	India	T19R Δ 156 Δ 157 R158G L452R T478K D614G P681R D950N	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión en más de un 50%. • Posible mayor riesgo de hospitalización. • Reducción moderada de la actividad neutralizante del suero de convalecientes y vacunados para evitar la infección sintomática, pero sin impacto significativo en la reducción de las formas graves de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Ómicron	B.1.1.529 21K §	Botsuana/Sudáfrica	A67V Δ69-70 T95I Δ142-144 Y145D Δ211 L212I ins214E PE G339D S371L S373P S375F K417N N440K G446S S477N T478K	E484A Q493K G496S Q498R N501Y Y505H T547K D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y N856K Q954H N969K L981F	<p>Sublinajes BA.1 y BA.1.1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión y mayor replicación que Delta. • Disminución del riesgo de hospitalización y letalidad con respecto a Delta. • Evasión de la actividad de los anticuerpos monoclonales bamlanivimab-etesevimab, casirivimab-imdevimab. Sotrovimab y bebtelovimab siguen siendo activos. • Reducción significativa de la actividad neutralizante del suero de infectados previos con otras variantes y vacunados. En infectados y vacunados o vacunados con dosis de refuerzo parece que esta reducción está atenuada.
					<p>Sublinaje BA.2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión y mayor replicación que BA.1. • Mismo riesgo de enfermedad grave que BA.1. • Evasión de la actividad de los anticuerpos monoclonales Sotrovimab y Casirivimab-imdevimab. Tixagevimab-cilgavimab y bebtelovimab siguen siendo activos. • Igual que con BA.1, presenta una reducción significativa de la actividad neutralizante del suero de infectados previos con otras variantes y vacunados. En infectados y vacunados o vacunados con dosis de refuerzo parece que esta reducción está atenuada.
					<p>Sublinajes BA.4 y BA.5</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la transmisión y mayor replicación que BA.1 y BA.2. • Mismo riesgo de enfermedad grave que BA.1 y BA.2. • Evasión de la actividad del anticuerpo monoclonal Sotrovimab. Tixagevimab-cilgavimab y bebtelovimab siguen siendo activos. • Reducción significativa de la actividad neutralizante del suero de infectados previos

INTRODUCCIÓN

				con BA.1 y BA.2 y vacunados. En infectados y vacunados o vacunados con dosis de refuerzo esta reducción se atenúa levemente.
--	--	--	--	--

⌘: nomenclatura de Linaje Pango; §: nomenclatura de Nexstrain; En la columna de mutaciones se indican los cambios de aminoácidos producidos. La primera letra indica el aminoácido sustituido y la segunda letra el aminoácido seleccionado y el número la posición del aminoácido en la secuencia de la proteína S. El símbolo Δ se refiere a la delección de los aminoácidos indicados. La abreviatura ins se refiere a inserción de aminoácidos.

1.8 Características clínicas, letalidad y factores de riesgo

1.8.1 Características clínicas

1.8.1.1 Generalidades y clasificación de gravedad

La infección por SARS-CoV-2 es mayoritariamente leve o asintomática. El porcentaje de asintomáticos se estima entre el 30-40% de los infectados aunque esta tasa varía según los estudios (134,135).

Para la infección sintomática, según un gran estudio llevado a cabo por el Centro para el control y prevención de enfermedades en China en el que se incluyeron 44.500 individuos infectados, se calculó que el 81% de los casos desarrollaba enfermedad leve, el 14% enfermedad moderada y el 5% crítica (136). En otro estudio similar llevado a cabo por, el homólogo americano, Centro de Control de Enfermedades (CDC) en una cohorte formada por 1,3 millones de casos, se evidenciaron porcentajes similares (14% hospitalizados y 5% de fallecidos) (137).

En cuanto a la clasificación clínica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una escala numérica del 0 al 8 para clasificar los grados de gravedad de la COVID-19 (Figura 7), siendo el 0 el estado de menor gravedad y el 8 el de máxima gravedad (138).

De acuerdo con esta escala tenemos:

- No infectados: sin evidencia clínica o microbiológica de infección (puntuación 0).
- Casos ambulatorios: infectados sin limitación de sus actividades cotidianas, asintomáticos (puntuación 1) e infectados con limitación de su actividad cotidiana (puntuación 2).
- Hospitalizados con enfermedad leve-moderada: asistencia hospitalaria sin oxigenoterapia (puntuación 3) y asistencia hospitalaria con oxigenoterapia mediante máscaras o cánulas nasales (puntuación 4).
- Hospitalizados con enfermedad severa: asistencia hospitalaria con ventilación mecánica no invasiva o alto flujo de oxígeno (> 40% FiO₂) (puntuación 5),

INTRODUCCIÓN

asistencia hospitalaria con intubación y ventilación mecánica invasiva (puntuación 6) y asistencia hospitalaria con ventilación mecánica invasiva y soporte orgánico como vasopresores, sistema de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) o terapia renal sustitutiva (RRT) (puntuación 7).

- Exitus: fallecimiento del paciente (puntuación 8).

Figura 7. Escala de gravedad de la COVID-19 según la OMS (138).

Patient State	Descriptor	Score
<i>Uninfected</i>	No clinical or virological evidence of infection	0
<i>Ambulatory</i>	No limitation of activities	1
	Limitation of activities	2
<i>Hospitalized Mild disease</i>	Hospitalized, no oxygen therapy	3
	Oxygen by mask or nasal prongs	4
<i>Hospitalized Severe Disease</i>	Non-invasive ventilation or high-flow oxygen	5
	Intubation and mechanical ventilation	6
	Ventilation + additional organ support – pressors, RRT, ECMO	7
<i>Dead</i>	Death	8

INTRODUCCIÓN

1.8.1.2 Período de incubación

Tras la exposición al virus, la sintomatología aparece dentro de los primeros 14 días, siendo la mayoría de los casos entre 4 y 5 días tras el contacto (139,140).

1.8.1.3 Sintomatología inicial

En la primera fase de la infección sintomática son habituales el dolor de cabeza, las mialgias generalizadas y la tos. También son habituales, pero con menos frecuencia la fiebre, la diarrea o el dolor de garganta. En el caso de desarrollar neumonía, es habitual la presencia de fiebre, tos, disnea e infiltrados pulmonares bilaterales (140,141). Aunque de manera general la sintomatología de la COVID-19 no es específica respecto a otras infecciones respiratorias virales, sí que son muy sugerentes las alteraciones en olfato y gusto (anosmia y ageusia) y también la aparición de disnea a la semana del inicio de síntomas (142,143). Las alteraciones de gusto y olfato son menos habituales en la infección por la variante Ómicron (144). Igualmente, estas alteraciones no son permanentes y revierten a las 4 semanas (145).

Otros de los síntomas precoces descritos pero menos frecuentes son la conjuntivitis, las alteraciones neurológicas o las manifestaciones cutáneas. Entre estas se han descrito lesiones maculopapulares, urticaria, erupciones vesiculares o lesiones similares a sabañones en las zonas distales de los dedos; mayormente en niños y adultos jóvenes (146,147).

1.8.1.4 Hallazgos en las pruebas de imagen

Las alteraciones radiológicas se observan más frecuentemente en los pacientes graves y tras varios días del inicio de síntomas aunque también en pacientes leves o asintomáticos (148,149), incluso se han llegado a describir hallazgos patológicos previamente a la aparición de síntomas o a la detección del RNA viral (150).

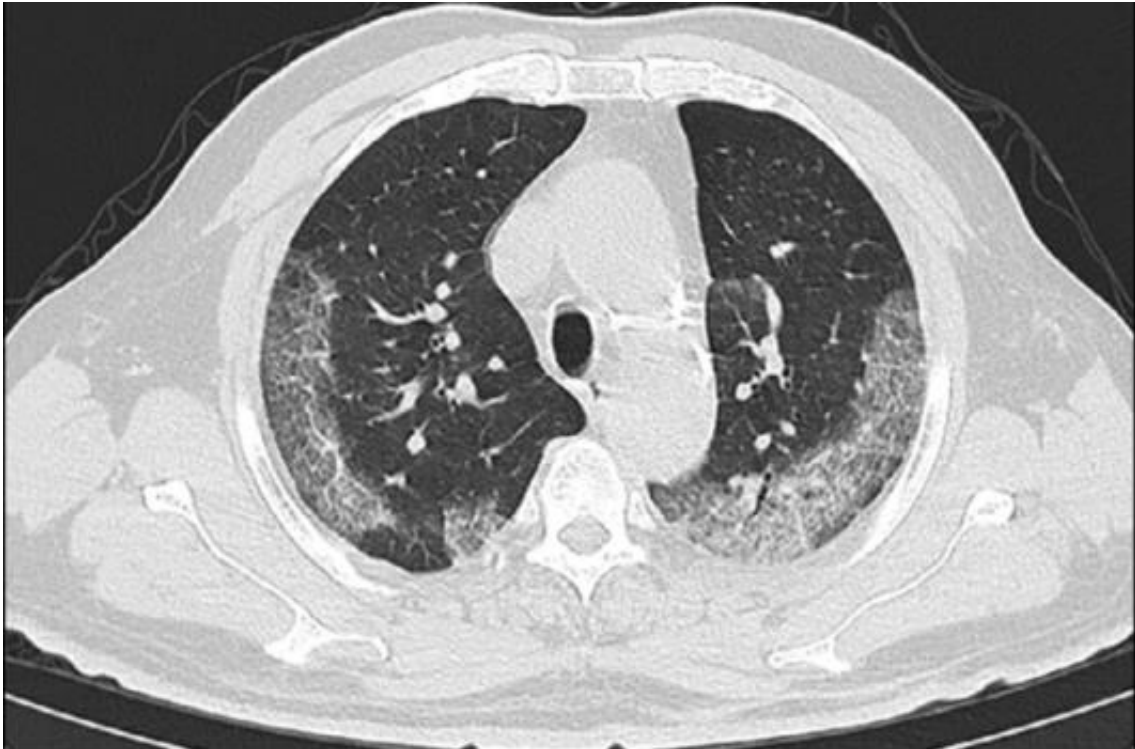
Destacan en las pruebas de imagen (radiografía de tórax y tomografía computerizada) opacidades en vidrio deslustrado y consolidaciones de distribución periférica, bilateral y principalmente en las bases pulmonares en casi un 83 % de los hospitalizados (Figura 8). Estos hallazgos, aunque sugerentes no son exclusivos de la COVID-19 y otras infecciones víricas también pueden producirlas (151,152).

Otros hallazgos menos comunes son el neumotórax, el engrosamiento septal, bronquiectasias, linfadenopatías y derrame pleural y pericárdico (152).

El grado de afectación y la extensión son variables pero existe consenso al considerar una infección severa cuando la afectación radiológica supera el 50% del parénquima pulmonar (153).

INTRODUCCIÓN

Figura 8. Imagen de tórax en posición axial por tomografía computerizada (TC) típica de COVID-19. Se observan opacidades periféricas en vidrio deslustrado bilaterales y en lóbulos pulmonares inferiores (154).



1.8.1.5 Características analíticas y exploración física

Se ha descrito que la alteración de los valores de ciertos parámetros analíticos y de la exploración física predisponen a sufrir cuadros más graves de la enfermedad; la mayor parte de la evidencia señala a los siguientes parámetros (153,155,156):

- Baja saturación de oxígeno
- Taquipnea
- Trombocitopenia
- Linfopenia
- Elevación de enzimas hepáticas
- Elevación de lactato deshidrogenasa (LDH)
- Elevación de marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, procalcitonina, Interleucina-6 (IL-6), ferritina o factor de necrosis tumoral (TNF- α))
- Elevación de troponinas
- Elevación del tiempo de protrombina (TP)
- Elevación de los dímeros-D

INTRODUCCIÓN

- Elevación de creatinina fosfoquinasa (CPK)

No obstante, entre todos los parámetros destaca la linfopenia, en mayor o menor grado, en la mayoría de los pacientes con COVID-19. Entre los pacientes hospitalizados, aproximadamente un 90% tienen un valor de linfocitos inferior a 1.500 por microlitro de sangre (157).

Algunos parámetros de laboratorio y su nivel de alteración asociado a la severidad del COVID-19 son representados en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de laboratorio asociados al COVID-19 severo (158,159).

Parámetro	Umbral característico del COVID-19 severo
Saturación de oxígeno	≤94% en aire de habitación (valor normal: 99%)
Frecuencia respiratoria	>30/minuto (valor normal: 15 a 20/minuto)
PCR	>10 mg/dL (valor normal: <0,8 mg/dL)
Dímeros D	>1000 ng/mL (valor normal: <500 ng/mL)
LDH	>245 UI/L (valor normal: 110 a 210 UI/L)
Troponina	>2 veces el límite alto de la normalidad (valor normal: mujeres 0 a 9 ng/L; hombres 0 a 14 ng/L)
Ferritina	>500 µg/L (valor normal: mujeres 10 a 200 µg/L; hombres 30 a 300 µg/L)
CPK	>2 veces el límite alto de la normalidad (valor normal: 40 a 150 UI/L)
Recuento linfocitario	<800/ µL (valor normal: 1.800 a 7.700/µL)

El valor de la carga viral también se ha relacionado con la gravedad. Se ha podido constatar en los pacientes más graves una mayor cantidad de RNA del virus en muestras respiratorias, tanto del tracto superior (exudado nasofaríngeo u oral) como del tracto inferior (esputo, lavado broncoalveolar o aspirado bronquial) (160). La presencia de material genético en la sangre del paciente también se ha relacionado con mayor gravedad del cuadro, además de muerte, daño orgánico o coagulopatía (161).

Los factores genéticos del huésped y su predisposición al desarrollo de cuadros más graves requieren una consideración a parte. Los estudios de asociación del genoma completo relacionan a los genes del grupo sanguíneo ABO con el riesgo de COVID-19 grave; el grupo A tendría mayor riesgo mientras que el grupo O menor riesgo (162). También se ha evidenciado que errores innatos en los genes de la vía de los interferones, predisponen a un mayor riesgo de fallo respiratorio (163,164).

INTRODUCCIÓN

1.8.1.6 Progresión de la enfermedad y complicaciones

A pesar del pronóstico favorable de la mayoría de los individuos infectados, una parte de ellos puede desarrollar complicaciones a la semana de inicio de síntomas (165).

En estudios de autopsias se ha detectado material genético del virus en sangre, tracto respiratorio, riñón, hígado, corazón y cerebro, lo que sugiere que el virus se disemina sistémicamente en algunos casos (166,167); no está del todo claro si el efecto citopático producido por la infección viral contribuyen a las complicaciones observadas.

La neumonía es la complicación más frecuentemente observada, que puede desembocar en el SDRA. En el SDRA, se produce inflamación de las células del endotelio pulmonar, daños alveolares difusos y daños en la membrana hialina de los alvéolos, lo que conduce a un ensanchamiento intersticial y a un edema, con la consiguiente dificultad para respirar. Todo esto supone un empeoramiento de la función pulmonar, arritmia, fallo multiorgánico y en última instancia la muerte (168). El SDRA suele aparecer a la semana del inicio de síntomas precedido de la disnea, aproximadamente un tercio de los pacientes hospitalizados progresan a esta condición. De ellos un 26% acaba ingresando en UCI y un 16% requiere ventilación mecánica invasiva (169).

Entre las complicaciones cardiovasculares destacan las arritmias, fallo cardíaco, daño miocárdico o shock cardiogénico (165).

Las complicaciones tromboembólicas son más habituales entre los pacientes ingresados en UCI con unas tasas que van del 10 al 40 %. Mayormente tromboembolismo venoso, trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar (170,171).

Complicaciones neurológicas como mialgias, dolor de cabeza, mareos se dan en el 80% de los pacientes hospitalizados pero entre las más graves destaca la encefalopatía. Esta se da sobre todo en pacientes críticos y puede suponer hasta un tercio de los hospitalizados en algunas series (45,172).

Las complicaciones inflamatorias clínicamente cursan con fiebre y elevación de marcadores inflamatorios y citoquinas pro inflamatorias. Este estado de hiper inflamación se ha relacionado con el síndrome de la tormenta de citoquinas (reacción adversa generada tras la inmunoterapia de linfocitos T), sin embargo, los niveles de citoquinas pro inflamatorias en COVID-19 son inferiores a las generados en la tormenta de citoquinas propiamente dicha, de ahí que este fenómeno sea nombrado también como síndrome de liberación de citoquinas. Por ejemplo, en la tormenta de citoquinas y en la sepsis los niveles de IL-6 son 100 y 27 veces superiores respectivamente a los encontrados en el síndrome hiper inflamatorio COVID-19 (44).

Otra de las manifestaciones inflamatorias es la aparición de auto anticuerpos (173). Se ha descrito el síndrome de Guillain-Barré (174) y el síndrome inflamatorio multisistémico (similar al síndrome de Kawasaki), este último sobre todo en población pediátrica. Este síndrome inflamatorio multisistémico se caracteriza por fallo multiorgánico y en particular por disfunción cardíaca, mientras que la afectación pulmonar es mínima (175).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a las complicaciones infecciosas, la infección secundaria en los pacientes COVID-19 no parece ser demasiado frecuente, con unas incidencias inferiores o en torno al 8 % y en gran parte de tipo nosocomial. De etiología bacteriana destacan las infecciones respiratorias y las bacteriemias, estas últimas con una incidencia menor. Los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* parecen ser los aislados con mayor frecuencia (176,177).

De etiología fúngica conviene resaltar los casos de aspergilosis pulmonar asociada a la COVID-19 (CAPA), que aún con una incidencia baja, es una entidad que supone un aumento considerable de la mortalidad. En los pacientes con ventilación mecánica invasiva y CAPA, el riesgo de mortalidad es tres veces y medio superior al de los pacientes no CAPA (178). La infección por el *Aspergillus* parece proceder tras el daño directo del virus sobre el epitelio respiratorio, además de la desregulación inmunológica que sucede al SDRA, principalmente por la depleción de linfocitos (179).

También destacan los casos de mucormicosis asociados a COVID (CAM) observados principalmente en la India, aunque con incidencia baja (180). En estos casos se ha visto afectada sobre todo la zona rino orbital.

1.8.2 Letalidad

En cuanto a la letalidad general de la infección, aunque numerosos estudios muestran porcentajes de entre el 1 y el 5% (153,181) o incluso del 10% y superiores en los primeros informes (159,182), la letalidad global se estima en torno al 0,15-1% (183,184). Esta sobrestimación del porcentaje real de letalidad es debida a que una gran mayoría de infecciones pasan desapercibidas al ser leves o asintomáticas y por tanto sin diagnóstico. Aún con este valor relativo bajo inferior al 1%, el elevadísimo número de infectados a nivel mundial ha supuesto, en valor absoluto, un número de fallecidos muy elevado (185).

Estudiando la letalidad en pacientes graves, este porcentaje fue mucho más alto con unos valores del 20% o superiores en hospitalizados en general (186) y de casi el 50% en pacientes críticos que fueron derivados a la UCI (187). Sin embargo, estos elevados porcentajes se han ido reduciendo a lo largo de la pandemia, situándose en menos del 10% de hospitalizados y en torno al 20% de los pacientes UCI (188), propiciado por la descongestión de los servicios hospitalarios, la mejora de los tratamientos, la vacunación y la aparición de variantes virales menos patogénicas.

1.8.3 Factores de riesgo

Aunque la enfermedad grave se ha descrito en sujetos sanos y de cualquier rango de edad, hay una serie de factores que condicionan a sufrir una infección severa. De manera general, los individuos de mayor edad y con comorbilidades asociadas son los que tienen mayor predisposición a sufrir un COVID-19 grave (165,189).

INTRODUCCIÓN

La edad es el factor de riesgo más importante y en el que hay más consenso entre los diferentes estudios; los pacientes de mayor edad tienen más riesgo de ser hospitalizados por COVID-19 y fallecer. Esta tasa de hospitalización va aumentando progresivamente con la edad; considerando un estudio de modelización llevado a cabo en China sobre 3665 pacientes en el primer año de pandemia, la tasa de hospitalización para el intervalo de edad que va entre los 20 a 29 años es del 1%, de los 30 a los 39 años del 3,4%, para la franja de 40 a 49 años del 4,3%, de los 50 a 59 años del 8,2%, en la franja de los 60 a 69 años del 11,8%, de los 70 a los 79 años del 16,6% y del 18,4% para los mayores de 80 años (190).

Así mismo, la mortalidad también aumenta con la edad. En un estudio del CDC chino, (153), la letalidad general de la cohorte fue del 2,3%, mientras que en los pacientes COVID-19 de entre 70-79 años y mayores de 80 años la letalidad se situó en el 8% y 14,8% respectivamente. En otros estudios y registros se aprecian tasas de letalidad por edad similares en las que los menores de 50 años tienen tasas inferiores al 1%. No obstante, como ya se ha citado antes, las tasas de letalidad han cambiado a medida que se ha desarrollado la pandemia, tendiendo a un valor menor (190,191).

El sexo ha sido otra de las variables relacionadas con una mayor severidad, concretamente el sexo masculino. Se ha observado en varios estudios de diversa procedencia que los varones tienen más riesgo de sufrir un cuadro grave de COVID-19; aproximadamente 3 veces más riesgo de ingresar en UCI y un 50% más de riesgo de fallecer respecto a las mujeres (192,193).

Las condiciones médicas del paciente presentes en el momento de la infección son determinantes también para el desarrollo de la enfermedad, las que se han visto más asociadas a la severidad del cuadro clínico son: (194)

- Enfermedad cardiovascular (insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria o cardiomiopatía),
- Diabetes
- Enfermedad pulmonar (enfermedad intersticial pulmonar, fibrosis pulmonar e hipertensión pulmonar),
- Cáncer
- Enfermedad renal crónica,
- Trasplante de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos,
- Obesidad (índice de masa corporal superior a 30 Kg/m²)
- Tabaquismo

La existencia de comorbilidades en el paciente COVID-19 puede suponer hasta un incremento de 12 veces el riesgo de muerte y 6 el de hospitalización respecto a no tener

INTRODUCCIÓN

comorbilidades según un informe del CDC con 300.000 pacientes (181). En este mismo informe se evidenció que la comorbilidad más habitual era la enfermedad cardiovascular (32%), seguido de la diabetes (30%) y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (18%).

En cuanto al VIH, su impacto en la progresión de la COVID-19 es controvertido; mientras que estudios observacionales a gran escala muestran mayor riesgo de formas graves y mortalidad, en otros estudios de cohortes más pequeños no parece haber diferencias con respecto a la población general. (195,196)

Una posible explicación de por qué tienen más riesgo de muerte y severidad de la infección podría estar en factores de riesgo que son habituales en el paciente VIH como la enfermedad cardiovascular o un bajo recuento de linfocitos T CD4 (197,198).

1.9 Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

1.9.1 Sospecha clínica

El primer elemento que se tiene que considerar antes de proceder al diagnóstico microbiológico son los indicios clínicos. Aunque no hay una sintomatología totalmente específica, sí que hay signos que permiten sospechar la infección. La presencia de tos, mialgias, fiebre, diarrea y pérdida de gusto y olfato (ya comentados en el apartado **1.8.1 Características clínicas**) son síntomas muy sugestivos, junto con la aparición de disnea a la semana de empezar síntomas. La sospecha clínica se ve reforzada si además el paciente ha estado en los últimos 14 días en contacto estrecho con un caso confirmado o sospechoso de COVID-19 o ha acudido a un entorno de congregación donde haya transmisión comunitaria del virus.

1.9.2 Selección de muestra

El principal tipo de muestra para realizar el diagnóstico microbiológico de la infección son las muestras del TRS, entre ellas se recomienda:

- Exudado nasofaríngeo
- Exudado nasal extraído de ambas narinas
- Exudado orofaríngeo
- Exudado del cornete medio
- Aspirado nasal o nasofaríngeo
- Muestra de saliva

La extracción de los exudados se realiza con una torunda flocada de poliéster.

INTRODUCCIÓN

La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) recomienda emplear en último lugar el exudado orofaríngeo debido a que la información científica parece mostrar que esta muestra presenta menor sensibilidad que el resto. Las sensibilidades obtenidas con exudado nasofaríngeo, nasal, de cornete medio o saliva parecen ser muy similares (en torno al 85%) (199).

Las muestras del tracto respiratorio inferior (TRI) son las que presentan niveles de carga viral más alta y por tanto mayor sensibilidad (hasta el 95% el LBA). Sin embargo, tienen la desventaja de ser muestras en muchos casos invasivas, dificultosas de extraer o dependientes del estado clínico del paciente. En el caso de pacientes graves con sospecha de infección en los que las determinaciones en muestras de TRS han sido negativas, conviene utilizar muestras del TRI. Las más utilizadas son el esputo en pacientes no intubados y el aspirado bronquial o el lavado broncoalveolar en pacientes intubados (200,201).

Otro tipo de muestras en las que se puede detectar el virus son las heces, secreciones oculares o sangre, aunque su valor diagnóstico es bastante más limitado. La presencia del RNA viral en sangre suele estar relacionado con la gravedad del cuadro como ya se ha expuesto en el apartado **1.8.1.5. Características analíticas y exploración física**.

1.9.3 Técnicas de diagnóstico microbiológico

En la Tabla 3 se resumen las principales técnicas de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) sobre muestras del tracto respiratorio superior (TRS) son las ideales para hacer el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, concretamente la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa previa (RT-PCR). Las técnicas isotérmicas de amplificación son más rápidas (una hora o menos) pero han demostrado ser menos sensibles que la RT-PCR estándar (199).

En situaciones en las que no se puede disponer de NAAT, los test de antígenos son una opción viable como primera determinación, pero su sensibilidad es inferior y un resultado negativo requiere de una confirmación con pruebas accesorias para poder descartar la infección.

Las técnicas serológicas son otra opción diagnóstica, pero suelen positivizar tras varios días desde el inicio de síntomas por lo que su utilidad es escasa en el diagnóstico de la infección aguda.

A continuación, se describen las principales técnicas de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.

1.9.3.1 Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT)

Son las técnicas de elección para el diagnóstico de infección aguda y se basan en la detección directa del RNA viral. Los ensayos RT-PCR son los más utilizados y

INTRODUCCIÓN

generalmente se dirigen a dos o más dianas virales, siendo las más habituales los genes S, N, E o fragmentos del ORF1a, concretamente el gen de la RdRp. Al ir dirigidas frente a varias dianas, la detección de las nuevas variantes de SARS-CoV-2 no se ve comprometida, aunque algunos de los genes estén mutados. Principalmente suele verse afectado el gen que codifica para la proteína S, por lo que su no detección puede ser útil para identificar una variante con mutación en este gen, principalmente las variantes Alfa y Ómicron (202,203).

Existen otras NAAT menos empleadas como la amplificación isotérmica, secuenciación de nueva generación o ensayos basados en CRISPR.

El tiempo empleado por estas pruebas varía bastante, desde 15 minutos hasta 8 horas.

Los rendimientos son bastante altos, teniendo todas ellas unas especificidades muy altas, de tal manera que un resultado positivo suele ser suficiente para confirmar la infección en casi todos los casos. La sensibilidad también es alta pero con una mayor variabilidad. Se han llegado a describir tasas de falsos negativos que van de menos del 5% al 40% (204–206).

La sensibilidad va a depender, a parte de la técnica propiamente dicha, del tipo y calidad de la muestra (citado anteriormente en el apartado **1.9.2. Selección de muestra**) y el momento del curso clínico en el que se obtiene la muestra.

Respecto al tipo de técnica, las plataformas de laboratorio estándar parecen ser las más sensibles con los límites de detección más bajos. No obstante, las pruebas rápidas o de *Point of Care* en algunas plataformas se han conseguido valores de sensibilidad similares a los de las técnicas estándar de laboratorio. Las especificidades destacan en casi todos los ensayos por ser cercanas al 100% (201,206,207).

En cuanto al rendimiento de las NAAT según el momento del cuadro clínico en el que se extrae la muestra, se observó que en la exposición al virus la tasa de falsos negativos es del 100%, mientras que en el primer día de inicio de síntomas esta es del 38%. A medida que avanza el curso de la enfermedad, esta tasa de falsos negativos disminuye hasta el 20% en el tercer día de síntomas. A partir del cuarto día de síntomas y hasta el día 16, la tasa de falsos negativo se incrementa del 21% al 66% respectivamente. Otros estudios sin embargo afirman que la carga viral es alta en los días anteriores al inicio de síntomas. A pesar de la disparidad, parece que la mayoría de trabajos coinciden en que las muestras extraídas dentro de la primera semana de síntomas son las que presentan mayor rendimiento (206,208,209).

Otro aspecto a considerar es el ciclo umbral (Ct), es decir, el ciclo de amplificación en el que se sobrepasa el umbral de detección y por tanto se evidencia la presencia del material genético diana. Es un marcador subrogado e inverso de la carga viral, de tal manera que un Ct bajo indica mayor carga viral. Aunque el valor del Ct puede dar una idea aproximada de la carga viral del paciente, no existe un valor estándar a todas las plataformas empleadas. Por tanto, solo ofrece una aproximación semicuantitativa y no puede ser utilizado como guía para el manejo clínico (210).

INTRODUCCIÓN

La detección del material genético puede prolongarse durante semanas, pero no siempre indica infectividad. En líneas generales, los pacientes leves tienen una carga viral y una capacidad de propagación de la infección menos prolongada en el tiempo que los pacientes graves.

En pacientes leves el RNA viral puede detectarse durante dos semanas desde el inicio de síntomas, siendo el pico de la carga viral a la semana. La infectividad en este grupo parece haberse demostrado por cultivo hasta los 10 días. Por el contrario, en los pacientes graves, tienen RNA viral detectable durante 3 semanas después del inicio de síntomas, aunque existen casos de detección más allá del mes. La infectividad en este grupo se ha demostrado por cultivo hasta 30 días después del inicio de síntomas (35,36,211).

De manera general, la persistencia de síntomas va marcar la pauta a seguir, de tal manera que un paciente en el que han transcurrido por lo menos 3 meses desde el inicio del cuadro clínico y es asintomático, no conviene realizar una detección por NAAT pues la probabilidad de tener una infección activa si diese positivo es bajísima (212).

Un resultado negativo de NAAT debería excluir la infección la mayoría de las veces, pero se han descrito falsos negativos. Ante un resultado negativo y una sospecha clínica muy alta, conviene repetir la determinación entre 24 y 48 horas después de realizarse la primera.

Los resultados indeterminados de NAAT van a depender del tipo de técnica utilizada, pero suelen indicar en la mayoría de casos la detección parcial de dianas génicas; al tratarse de pruebas muy específicas, el resultado se puede considerar como presuntamente positivo. En los casos de pacientes con escasa evolución clínica cuyo comienzo de síntomas ha tenido lugar recientemente, es posible encontrar un resultado indeterminado o incluso negativo con los NAAT, en ese caso convendría repetir la prueba si la sospecha clínica es alta. En el caso de las nuevas variantes de coronavirus con mutaciones en la espícula (especialmente la delección 69-70, compartida por Alfa y Ómicron), es habitual que las NAAT que tengan entre sus dianas génicas la S, den un resultado indeterminado por una detección parcial de las dianas (213,214).

En los casos pediátricos del Síndrome Inflamatorio Multisistémico, no es inusual encontrar resultados de NAAT negativos y serología frente a IgG positiva, por ello es necesario incluir ambas técnicas en el proceso diagnóstico de esta patología (215).

Respecto las reinfecciones por la misma variante de SARS-CoV-2, aunque son esporádicas, su diagnóstico mediante NAAT puede ser controvertido. Una detección positiva tras finalizar el cuadro clínico no necesariamente indica una nueva infección, si no que puede tratarse de una liberación prolongada de material genético viral. Se puede sospechar de una reinfección si el intervalo de tiempo transcurrido entre la primera y la segunda supuesta infección es largo (> 3 meses), la carga viral detectada es alta o que los anticuerpos IgG no sean detectables, pero realmente la confirmación se obtiene evidenciando que se trata de dos cepas diferentes mediante la secuenciación del genoma viral. Según el CDC, la mejor evidencia se logra al probar que las muestras virales

INTRODUCCIÓN

de primera y segunda infección pertenecen a clados diferentes de acuerdo a las bases de datos genómicas de Nextstrain y GISAID (216). Como en muchos casos no se puede disponer de muestras de ambos momentos para hacer una secuenciación, en caso de una alta sospecha de reinfección conviene manejar al paciente como si estuviese confirmada la infección.

1.9.3.2 Test antigénicos

Aunque por definición son técnicas menos sensibles que las NAAT, la determinación es más rápida (menos de una hora) y no requiere equipamiento o formación especializada por lo que son más accesibles y de gran utilidad cuando se precisa un tiempo de respuesta rápido o no se dispone de técnicas moleculares.

Se utilizan para detectar la infección aguda y emplean generalmente muestras de exudado nasofaríngeo y nasal. La diana antigénica más utilizada es la nucleocápsida, la proteína estructural más abundante y que además no está apenas modificada en las nuevas variantes de SARS-CoV-2. El rendimiento de estas técnicas depende de la propia plataforma pero también de la sintomatología del paciente.

En pacientes sintomáticos la sensibilidad es máxima, siendo la primera semana de síntomas la más idónea para realizar el test; concretamente entre los días 5 y 7 desde el inicio de síntomas. Coincide con el período de mayor replicación del virus, de hecho los pacientes con carga viral mayor (identificados de manera semicuantitativa por el valor de Ct < 25) son los que mayor tasa de positividad tienen con estos test antigénicos (207,217).

Un resultado positivo en pacientes sintomáticos se asume como indicador de infección por SARS-CoV-2, mientras que un resultado negativo convendría confirmarlo mediante NAAT dentro de las 48 horas siguientes y siempre que la sospecha sea alta (218). En caso de no disponer de NAAT, El CDC recomienda repetir el test antigénico cada 3 o 7 días durante 14 días.

En pacientes asintomáticos, los test antigénicos tienen utilidad para poder fijar cuarentenas (10 días) en pacientes no vacunados que han estado en contacto estrecho con casos probados o sospechosos de COVID-19. Se recomienda realizar este test el día de la exposición y caso de salir negativo, repetirlo a los 5 o 7 días de la exposición con otro test antigénico o una NAAT. Un resultado negativo apoya el no proseguir con la cuarentena mientras que un valor positivo indica generalmente infección (219), aunque el grado de certeza del resultado dependerá de la prevalencia de la infección en ese lugar y lo probable del caso índice.

1.9.3.3 Técnicas serológicas

Se emplean para diagnosticar una infección pasada o una actual que lleve 2 o 4 semanas de duración; son de muy poca utilidad para el diagnóstico en la fase aguda de la infección. También se utilizan en los estudios de seroprevalencia y de respuesta vacunal.

INTRODUCCIÓN

Estas técnicas utilizan proteínas purificadas del SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos específicos en el suero de los pacientes, y las sensibilidades y especificidades son altamente variables dependiendo del momento de extracción de la muestra. Aunque los anticuerpos pueden llegar a detectarse en la primera semana de síntomas, es a partir de los 14 días cuando el porcentaje de positividad es más alto (220). Tanto el isotipo IgM como el IgG aparecen prácticamente de manera simultánea, siendo el IgM ligeramente más precoz. A partir del día 20 de inicio de síntomas la detección de IgG es del 100% (220–223).

Aunque por lo general las técnicas serológicas son rápidas y algunas pueden emplearse a pie de cama, los tiempos de estas pruebas son muy variables, habiendo plataformas que ofrecen resultados en 15 minutos mientras que otras pueden demorarse hasta las 2 horas. Existen tres plataformas principales, el inmunoensayo de flujo lateral, el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), considerándose este último el gold standard (85).

La IDSA recomienda la detección de anticuerpos totales o el isotipo IgG mejor que IgA o IgM para hacer el diagnóstico (201). Los anticuerpos detectados pueden tener varias dianas, pero principalmente se dirigen frente a proteínas estructurales del virus como la espícula completa, el RBD o la nucleocápsida. Para descubrir una infección previa en un paciente vacunado con vacunas que emplean la proteína S, es necesario utilizar un test que detecte anticuerpos diferentes a los dirigidos frente a S.

Aunque estas técnicas tienen una especificidad muy alta, para maximizar el valor predictivo positivo conviene emplearlas en individuos con una alta probabilidad pretest. En un escenario de baja prevalencia un resultado positivo debe tomarse con cautela ya que las reacciones cruzadas con coronavirus estacionales, principalmente Betacoronavirus (OC43 y HKU1), están descritas.

Respecto a la duración de los anticuerpos en la sangre, el isotipo IgG parece ser el que tiene mayor permanencia. Se siguen detectando entre los 6 y 8 meses post infección aunque el título va disminuyendo progresivamente. Hay estudios en los que incluso se evidencia desaparición total del título de IgG en algunos pacientes a los dos meses del cuadro clínico (222,224).

La duración de los anticuerpos parece estar asociada a la magnitud del título alcanzado en la respuesta inicial y a la severidad del cuadro clínico (225).

1.9.3.4 Técnicas de detección de actividad neutralizante

Permiten la detección in vitro del título de anticuerpos en suero o plasma con actividad neutralizante específica frente a la infección por el SARS-CoV-2. Estas técnicas ofrecen unos resultados aproximativos de la respuesta del paciente a la infección o a la vacunación. Se llevan a cabo mediante varios métodos, pero todos tienen en común la detección de los anticuerpos que bloquean la acción de la proteína S del virus.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen dos métodos basados en cultivo celular y otro basado en una ELISA de competición (226).

- Test de neutralización con virus: es un ensayo que emplea el SARS-CoV-2 o un SARS-CoV-2 recombinante con las proteínas de interés, y tiene el objetivo de evaluar la capacidad de infección sobre cultivo celular después de enfrentar el virus con el suero o plasma que se está estudiando. Existe la técnica de neutralización por reducción de placas y la microneutralización. La técnica de neutralización por reducción de placas determina el título neutralizante según la dilución del suero que es capaz de reducir el número de placas de lisis viral en el cultivo en un determinado porcentaje. Por otro lado, el ensayo de microneutralización deriva del anterior, pero en vez de contar la reducción de placas de lisis en el cultivo, se mide mediante fluorimetría o colorimetría la señal luminosa o de absorbancia resultante de la infección viral de las células del cultivo a una determinada dilución del suero. Estos ensayos tienen la desventaja de requerir 5 días hasta obtener resultado y la necesidad de trabajar en un laboratorio BSL-3 debido al uso del SARS-CoV-2 (227,228).
- Test de neutralización con pseudovirus: de la misma manera que con los test de neutralización con el virus original, pretende evaluar la capacidad del suero para inhibir la infección de un cultivo, pero por un pseudovirus. Generalmente se emplean virus de la estomatitis vesicular (VSV) o lentivirus modificados para que expresen en su envuelta la proteína S del SARS-CoV-2. Tienen la ventaja de que, al no emplear el virus original, estas técnicas pueden realizarse en un laboratorio BSL-2. También emplean las técnicas de neutralización por reducción de placas y microneutralización (229,230).
- Test de neutralización por competición o neutralización subrogada: al contrario que con los dos test anteriores, la neutralización por competición no requiere el uso de cultivo celular. Trata de mimetizar, en un formato de ELISA, la interacción natural que se produciría entre el RBD del virus con su receptor en células humanas, el ACE-2, de tal manera que una de las dos proteínas posee un marcador de fluorescencia o color para revelar la unión de RBD con ACE-2. La técnica trata de cuantificar el título de anticuerpos neutralizantes en suero por su capacidad de inhibir la señal fluorimétrica o colorimétrica al competir con el ACE-2 por unirse al RBD. Esta técnica se puede realizar en un laboratorio BSL-2 y no requiere cultivo celular por lo que el tiempo y coste se ven reducidos drásticamente. La FDA ha aprobado únicamente uno de estos test para la detección de anticuerpos neutralizantes en suero o plasma de pacientes (231).

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Principales técnicas de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 (232).

Técnica diagnóstica	Tipo de muestra	Utilidad	Características
NAATs	Especímenes respiratorios*	Detección de infección presente.	<ul style="list-style-type: none"> • Tienen alta sensibilidad y especificidad. • El resultado va a depender del tipo y calidad de la muestra y del momento del cuadro clínico en el que se extraiga la muestra. • La tasa de falsos negativos oscila mucho dependiendo del test empleado (de menos del 5 % al 40%). • El tiempo empleado también tiene un intervalo muy amplio que va desde 15 minutos a 8 horas.
Test de antígenos	Exudado nasofaríngeo, nasal o faríngeo.	Detección de infección presente.	<ul style="list-style-type: none"> • Menor sensibilidad que las NAATs. • Máxima sensibilidad en pacientes sintomáticos y en la primera semana de síntomas. • Resultados en menos de una hora.
Serología	Sangre	Detección de una infección previa o una actual que lleve 2 o 4 semanas de evolución (empleando antígenos diferentes a los que contiene la vacuna). Detección de respuesta inmune humoral a la vacuna.	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad y especificidad altamente variables. • IgG detectada a partir de los 14 días desde el inicio de síntomas. • Posible reacción cruzada con coronavirus estacionales. • En un escenario de baja prevalencia un resultado positivo debe tomarse con cautela (bajo VPP). • Un resultado positivo no asegura protección frente a la reinfección. • Emplean de 15 minutos a dos horas.

*La muestra de elección por su elevada rentabilidad y facilidad de extracción es el exudado nasofaríngeo. La utilización de esputo, aspirado bronquial o lavado broncoalveolar conviene reservarse a pacientes hospitalizados con sospecha de infección del TRI y tras resultado negativo de muestras del TRS.

1.10 Vacunación frente a la COVID-19

1.10.1 Consideraciones generales

Las vacunas frente a la COVID-19 tienen el objetivo de generar una respuesta inmune lo suficientemente fuerte como para cumplir dos objetivos, en primer lugar, reducir la transmisión del virus y en segundo lugar, en caso de producirse la infección sintomática, que reduzca la gravedad del cuadro clínico generado.

La infección sintomática se define como la presencia de sintomatología compatible con la COVID-19 y un diagnóstico microbiológico de confirmación a partir de 15 días desde la administración de la pauta completa de la vacuna.

La diana antigénica principal con la que se empezaron a desarrollar las vacunas y que ha resultado ser más inmunogénica es la proteína S; casi todas las vacunas actuales están basadas en esta proteína independientemente de la plataforma utilizada.

Se han empleado diferentes plataformas para realizar las vacunas como el propio virus inactivado o atenuado, el RNAm, vectores virales como el adenovirus, proteínas recombinantes o DNA codificante.

Actualmente se recomienda la vacunación de adultos con la dosificación que corresponda según la vacuna empleada. La vacunación solamente está contraindicada en personas con alergia a la propia vacuna o sus componentes. En la población de pacientes inmunodeprimidos o mayores de 65 años, al generar una respuesta inmune de menor potencia y duración, se recomienda dar una dosis adicional de la vacuna (233,234).

Todas las vacunas se administran por vía intramuscular y, aunque han demostrado eficacia, la de las vacunas basadas en RNAm parece ser superior reduciendo el riesgo de enfermedad severa. No obstante, la elección de una vacuna u otra debe estar sujeta a la disponibilidad de las mismas y la preferencia del paciente respecto al número de dosis a recibir.

Respecto a los sujetos que han tenido una infección previa, existe controversia respecto al número de dosis que deben recibir. Esto es debido a que existen varios estudios en los que se ha observado que los vacunados con COVID-19 previo desarrollan un título de anticuerpos neutralizantes o respuesta celular tras la primera dosis tan alta o incluso superior a los individuos vacunados con la pauta completa que no han pasado la COVID-19 (235,236). Además, la aparición de efectos adversos en los pacientes que reciben la pauta completa tras haber pasado previamente la enfermedad parece ser más frecuente (237). En base a estos estudios, se ha recomendado administrar una dosis menos de la vacuna a los individuos con COVID previo documentado.

En cuanto a los efectos adversos descritos tras la vacunación, se han reportado efectos adversos leves y de corta duración, principalmente reacción local en el área de inyección y efectos sistémicos. Los efectos adversos más habituales son el dolor en el lugar de la inyección, fiebre, astenia y dolor de cabeza. De manera menos frecuente, también se han descrito efectos adversos muy graves, destacando la trombocitopenia trombótica

INTRODUCCIÓN

autoinmune (238). Para paliar estos efectos una vez aparecen, se recomienda la administración de anti inflamatorios no esteroideos. No se recomienda tomarlos profilácticamente, ya que se desconoce el impacto que pueden tener sobre la generación de la inmunidad tras la vacunación.

A pesar de los efectos adversos descritos, el beneficio de la vacunación para reducir el riesgo de infección y, sobre todo, de padecer formas graves de la enfermedad compensa con creces los riesgos asociados a la vacuna.

1.10.2 Principales tipos de vacunas empleadas

1.10.2.1 Vacunas de RNAm

1.10.2.1.1 BNT162b2 (Pfizer)

Está compuesta por RNAm que codifica para la proteína S del SARS-CoV-2 en conformación prefusión estabilizada vehiculizado en nanopartículas liposomales. La pauta completa recomendada para adultos inmunocompetentes es de dos dosis intramusculares separadas por 21 días. En individuos inmunodeprimidos, mayores de 65 años o con alta exposición es necesario añadir una tercera dosis, al menos seis meses después de la segunda dosis. En cuanto a la inmunogenicidad, se ha descrito el desarrollo de títulos de anticuerpos neutralizantes y respuesta de linfocitos T específicos similares a los generados tras la infección natural con un cuadro asintomático o moderado. Sin embargo, a partir de los 6 meses tras la vacunación se ha reportado un descenso progresivo del título de anticuerpos (238,239).

Distintos estudios han mostrado actividad neutralizante frente a la mayoría de las variantes sin embargo, presenta actividad considerablemente disminuida frente a las variantes Beta y Ómicron. Aunque los estudios iniciales de seguimiento durante los primeros 6 meses tras la vacunación mostraron una eficacia del 91-95%, estudios más recientes en los que se incluyó población en contacto con la variante Delta y Ómicron tras dos meses de recibir la pauta completa, mostraron una eficacia del 65% frente a la variante Delta mientras que para la variante Ómicron mostró un 6%. Esta situación ha obligado a administrar en todos los casos una dosis adicional de refuerzo. No obstante, la eficacia para reducir la hospitalización sigue siendo muy alta para ambas variantes, entre el 86-95%. (240–242).

Los efectos adversos, aunque relativamente frecuentes tras la segunda dosis, son leves como dolor en la zona de inyección, fiebre, dolor de cabeza, mialgias o cansancio. Los efectos adversos graves son muy infrecuentes, habiéndose descrito miocarditis (16 casos de cada millón de vacunados). La vacuna de Pfizer parece tener menor frecuencia de efectos adversos que la vacuna de Moderna (243).

INTRODUCCIÓN

1.10.2.1.2 mRNA-1273 (Moderna)

Al igual que en la formulación de Pfizer, la vacuna de Moderna está compuesta por RNAm que codifica la proteína S de SARS-CoV-2. Sin embargo, esta formulación tiene una mayor estabilidad una vez reconstituida. La pauta completa recomendada para adultos inmunocompetentes es de dos dosis intramusculares separadas por 28 días. En individuos inmunodeprimidos, mayores de 65 años o con alta exposición es necesario añadir una tercera dosis, por lo menos seis meses después de la segunda (238,244). Respecto a la inmunogenicidad generada tras la vacunación, se han demostrado niveles de títulos de anticuerpos y de la respuesta de linfocitos T específicos similares a los generados tras la infección natural. Además, estudios comparativos con la vacuna de Pfizer han demostrado una respuesta inmune superior con niveles de anticuerpos más altos. Sin embargo, a partir de los 6 meses tras la vacunación se ha observado igualmente un descenso gradual de los títulos de anticuerpos (245,246). Al igual que la vacuna de Pfizer, la respuesta inmune producida ha demostrado actividad neutralizante frente a la mayoría de las variantes, con una menor actividad frente a Beta y Ómicron. En este sentido los estudios iniciales de seguimiento de 2 meses tras la vacunación mostraron una eficacia del 94%, sin embargo, los estudios más recientes en los que se incluye población en contacto con la variante Delta y Ómicron, han mostrado una disminución drástica de la eficacia para evitar la infección sintomática frente la variante Ómicron, reduciéndose al 5%, y una disminución menor para la variante Delta (79%). En base a estos resultados, se ha decidido la administración de una dosis adicional de refuerzo en todos los casos. No obstante, la eficacia para evitar la enfermedad grave ante ambas variantes está en el 89-96% (240,242,247).

Aunque la vacuna de Moderna produce efectos adversos relativamente frecuentes tras la segunda dosis, éstos son leves como dolor en la zona de inyección, fiebre, dolor de cabeza, mialgias o cansancio. Los efectos adversos graves son muy infrecuentes, con casos descritos de miocarditis (16 casos de cada millón de vacunados) y reacción anafiláctica (3 de cada millón de vacunados) (243).

1.10.2.2 Vacunas que utilizan como vector un virus

1.10.2.2.1 ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 (AstraZeneca)

La vacuna desarrollada por AstraZeneca está compuesta por un vector de adenovirus de chimpancé no replicativo que tiene integrado en su genoma la secuencia de DNA codificante de la proteína S en conformación prefusión no estabilizada. En adultos inmunocompetentes se ha recomendado la administración de dos dosis intramusculares separadas por 2-3 meses (recomendación de la OMS)(248). La inmunogenicidad de esta vacuna se caracterizaba por que los títulos de anticuerpos generados, además de la respuesta celular, eran comparables a los que se generaban tras la infección natural. Sin embargo, frente a las variantes Beta, Delta y Ómicron parece haber una pérdida muy considerable de actividad neutralizante, habiendo pacientes que directamente pierden esta actividad. Los estudios iniciales mostraron una eficacia del 70% a un seguimiento de 2 meses, mientras que los más recientes en los que se incluye población en contacto

INTRODUCCIÓN

con la variante Delta y Ómicron, está en el 40% para Delta y el 0% en Ómicron evitando la infección sintomática a los dos meses. Esto ha llevado a la administración de una tercera dosis de refuerzo en todos los casos. La eficacia reduciendo hospitalización sigue permaneciendo alta, 82-95% (242,249–252).

Los efectos adversos más frecuentes son leves como el dolor en la zona de inyección, fiebre, dolor de cabeza, mialgias o cansancio. Los efectos adversos graves son muy infrecuentes pero destacan por su gravedad las complicaciones trombóticas asociadas a trombocitopenia como la trombosis de los senos venosos cerebrales (169 casos en 34 millones de vacunados) y la trombosis de la vena esplénica (54 casos en 34 millones de vacunados) y por otro lado el síndrome de Guillain Barre (227 casos en 51 millones de vacunados) (253).

1.10.2.2.2 Ad26.COV2.S (Janssen)

Utiliza como vector un adenovirus humano tipo 26 no replicativo que tiene integrado en su genoma DNAC codificante de la proteína S en conformación prefusión estabilizada. Inicialmente se planteó como una vacuna que requería una única dosis intramuscular pero estudios recientes han puesto de manifiesto que la administración de una segunda dosis a los 2 meses mejoraría sustancialmente su eficacia. Los primeros estudios de inmunogenicidad mostraron que se generaba una respuesta humoral robusta pero que los títulos de anticuerpos eran ligeramente inferiores a los generados tras la infección natural. La evaluación de la cinética de anticuerpos mostró que los títulos neutralizantes se mantenían a los 8 meses, al contrario que los generados por las vacunas de RNAm que van descendiendo progresivamente (246,254,255). La actividad neutralizante se mantiene frente a las nuevas variantes con un leve descenso en el título frente a las variantes Beta y Delta pero muy acentuado frente a Ómicron. Los estudios iniciales mostraron una eficacia del 67% a un seguimiento de 2 meses, mientras que los más recientes en los que se incluye población en contacto con la variante Delta, está estaría en el 51%, para Ómicron, la eficacia con una dosis es casi nula. Ante esta situación, la administración de una dosis de refuerzo a la inicial o incluso a pacientes que habían recibido ya dos dosis de vacunas RNAm, ha elevado la eficacia evitando hospitalización al 85% tras 8 meses de recibir la dosis de refuerzo (256–258).

Los efectos adversos, aunque relativamente frecuentes, son leves como el dolor en la zona de inyección, fiebre, dolor de cabeza, mialgias, cansancio o ansiedad. Los efectos adversos graves son infrecuentes pero destaca por su gravedad el síndrome de trombocitopenia trombótica, que se da sobre todo en mujeres jóvenes (11 casos de cada millón de vacunadas menores de 50 años) y el síndrome de Guillain-Barre (8 casos de cada millón de vacunados) (253).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

- Los anticuerpos totales y aquellos con actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 tienen un papel principal en la evolución y la resolución de la COVID-19, condicionando la progresión clínica.
- Los pacientes que en el debut de la COVID-19 presentan un mayor título de anticuerpos IgM e IgG y de anticuerpos neutralizantes desarrollan formas más benignas de la enfermedad debido a su efecto protector frente a la replicación del virus en el organismo.
- Al tratarse de una enfermedad vírica, dentro de la IgG, las subclases de IgG1 e IgG3 deberían ser mayoritarias en los pacientes.
- La respuesta de anticuerpos IgG y especialmente de anticuerpos con actividad neutralizante, es esencial para obtener protección tras la vacunación frente a SARS-CoV-2, tanto en individuos sin patologías previas como en individuos inmunocomprometidos.
- Los pacientes con trasplante de órgano sólido inmunizados con la vacuna de RNAm son capaces de desarrollar una respuesta inmune humoral de anticuerpos, tanto IgG y anticuerpos neutralizantes, aunque de menor magnitud que la de los individuos inmunocompetentes.
- Se puede establecer un punto de corte del título de IgM o IgG presente en el suero de los pacientes para predecir la presencia de actividad neutralizante sin necesidad de realizar la determinación de anticuerpos neutralizantes.
- La respuesta inmune humoral generada tras la administración la vacuna de RNAm es equiparable o incluso superior a la respuesta generada tras la infección natural por SARS-CoV-2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2 Objetivos

2.2.1 Principal

Analizar y caracterizar la respuesta inmune humoral frente al SARS-CoV-2 en una cohorte de pacientes con COVID-19 agudo del Hospital Universitario 12 de Octubre y en sujetos vacunados frente al SARS-CoV-2; trasplantados de órgano sólido y sujetos inmunocompetentes.

2.2.2 Secundarios

1. Caracterizar la presencia de anticuerpos específicos IgM e IgG, las subclases de IgG, y su funcionalidad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19 agudo y su relación con la progresión de la enfermedad.
2. Estudiar la asociación entre los títulos de anticuerpos específicos y neutralizantes con variables demográficas, clínicas o analíticas de los individuos estudiados.
3. Investigar si existe alguna correlación entre el título de anticuerpos específicos IgM, IgG, subclases de IgG y los títulos de anticuerpos neutralizantes.
4. Identificar un punto de corte del título de los anticuerpos específicos que pueda predecir la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero.
5. Caracterizar la respuesta de anticuerpos específicos IgM e IgG y su funcionalidad neutralizante generada tras la administración de la vacuna de mRNA-1273 (Moderna Biotech) en una cohorte de receptores de TOS comparada con una cohorte de individuos sanos inmunocompetentes.
6. Comparar los niveles de anticuerpos inducidos en individuos inmunizados empleando la vacuna de mRNA-1273 (Moderna Biotech) con los de pacientes con COVID-19 agudo.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Reclutamiento de los pacientes y recogida de datos clínicos y muestras

El trabajo se realizó sobre dos grupos de estudio:

- **Cohorte de estudio 1:** compuesta por pacientes con COVID-19 agudo hospitalizados en el Hospital Universitario 12 de Octubre.
- **Cohorte de estudio 2:** compuesta por una subcohorta de receptores de trasplante de órgano sólido y una subcohorta control de sujetos inmunocompetentes sanos, ambos vacunados con ARNm-1273 (Moderna Biotech).

3.1.1 Cohorte de estudio 1: Pacientes con COVID-19 agudo del Hospital Universitario 12 de Octubre

3.1.1.1 Planteamiento del estudio y reclutamiento de pacientes, diagnóstico de COVID-19, recogida de muestras de suero y consideraciones éticas

1. Planteamiento del estudio y reclutamiento de pacientes

Se realizó un estudio transversal prospectivo en una cohorte de pacientes con COVID-19 agudo. El reclutamiento se llevó a cabo en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, España), un hospital terciario de 1.300 camas que atiende a una población de 450.000 habitantes.

Los pacientes reclutados fueron adultos de entre 23 y 97 años que habían ingresado en el hospital con infección por SARS-CoV-2 confirmada en el período de tiempo comprendido entre el 11 de marzo y el 15 de abril de 2020, de ellos se seleccionó aleatoriamente a 160 pacientes que fueron asignados a cuatro grupos según la gravedad del cuadro clínico tras el ingreso. La selección aleatoria de los pacientes tuvo lugar un mes después del ingreso hospitalario cuando ya se había resuelto el cuadro clínico y se podía clasificar clínicamente al paciente.

2. Diagnóstico de la COVID-19

La infección por SARS-CoV-2 se confirmó mediante un ensayo de RT-PCR realizado en exudado nasofaríngeo del paciente tras su llegada al hospital. El exudado nasofaríngeo fue recogido mediante torundas flocadas en medio de transporte viral UTM™ (Copan Diagnostics, Brescia, Italia). La extracción de ácidos nucleicos fue llevada a cabo mediante extractores automáticos MicrolabStarlet IVD con cartucho universal STARMag 96 × 4 (Seegene, Seoul, Corea del Sur) y NucliSENS EasyMAG (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). La amplificación del material genético mediante rRT-PCR se realizó con el sistema LightCycler 480 System instrument II (Roche Life Science, Indianápolis, Estados

MATERIAL Y MÉTODOS

Unidos) con el ensayo TaqMan 2019nCoV Kit v1 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Este ensayo amplifica 3 dianas génicas diferentes del virus; los genes S, N y ORF1ab. Para el diagnóstico confirmatorio de infección por SARS-CoV-2, debían amplificar al menos 2 de estas dianas.

3. Recogida de muestras de suero y consideraciones éticas

De los pacientes adultos que acudieron al Hospital entre el 11 de marzo y el 15 de abril de 2020, se recogió sistemáticamente en el período cercano al ingreso, una muestra de sangre de aproximadamente 5 mL en tubo separador de suero BD Vacutainer RST 8 mL (Becton Dickinson, New Jersey, Estados Unidos). Tras su centrifugación en Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 2.500 rpm durante 10 minutos, el suero obtenido fue congelado a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de suero fueron enviadas y analizadas en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIII) (Majadahonda, España).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica local (Código: 20/269. A 26 de mayo de 2020) y se llevó a cabo siguiendo la Declaración de Helsinki y la Guía de Buenas Prácticas Clínicas.

3.1.1.2 Variables recogidas

De los 160 pacientes se recogieron variables demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento de la COVID-19 y evolutivas, éstas se incluyeron en un formulario estandarizado de informe de casos. Los datos fueron extraídos de la Historia Clínica Electrónica del Hospital, los cuales iban siendo añadidos de manera prospectiva durante la práctica asistencial. Al ingreso, no a todos los pacientes se les realizó las mismas determinaciones por lo que hay variables, especialmente las analíticas, que no están recogidas en la totalidad de la cohorte. En la Tabla 4 se incluyen las variables registradas y el porcentaje de recogida.

Tabla 4. Variables demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento y evolutivas recogidas en la cohorte de pacientes con COVID-19 agudo.

Variables recogidas	Porcentaje de recogida
Demográficas	
Edad	100% (160/160)
Sexo	100% (160/160)
Raza	100% (160/160)
Clínicas	
Hipertensión	100% (160/160)

MATERIAL Y MÉTODOS

Enfermedad cardiovascular	100% (160/160)
Neumopatía crónica	100% (160/160)
Asma	100% (160/160)
Diabetes	100% (160/160)
Dislipemia	100% (160/160)
Obesidad	79,38% (127/160)
Tabaquismo	95% (152/160)
Neoplasia	100% (160/160)
Trasplante	100% (160/160)
Índice de Charlson	100% (160/160)
Analíticas	
Saturación de oxígeno	99,38% (159/160)
LDH	100% (160/160)
PCR	100% (160/160)
Procalcitonina	39,38% (63/160)
IL-6	10% (16/160)
ALT	99,38% (159/160)
AST	100% (160/160)
Albumina	94,38% (151/160)
Ferritina	89,38% (143/160)
Fibrinógeno	63,13% (101/160)
Triglicéridos	21,88% (35/160)
Dímeros D	61,25% (98/160)
Leucocitos	100% (160/160)
Neutrófilos	100% (160/160)
Linfocitos	100% (160/160)
Monocitos	100% (160/160)
Plaquetas	100% (160/160)
Tratamientos frente a la COVID-19	
Hidroxiclороquina	100% (160/160)
Lopinavir/ritonavir	79,38% (127/160)
IFN- β	98,75% (158/160)
Tocilizumab	100% (160/160)
Corticoesteroides	100% (160/160)
Evolutivas	
Tiempo desde inicio de síntomas al ingreso hospitalario	100% (160/160)
Tiempo desde el inicio de síntomas a la extracción de la muestra de sangre	100% (160/160)
Duración del curso clínico (Tiempo desde inicio de síntomas hasta resolución clínica [Alta hospitalaria o exitus])	100% (160/160)

MATERIAL Y MÉTODOS

Tiempo desde el ingreso a la extracción de la muestra de sangre	100% (160/160)
Tiempo de estancia hospitalaria	100% (160/160)

3.1.1.3 Definiciones clínicas

Se consideró insuficiencia o fallo respiratorio cuando el paciente desarrollaba un síndrome de distrés respiratorio agudo. El SDRA se definió de acuerdo al criterio de Berlín, como un cociente de presión parcial de oxígeno arterial entre la fracción inspirada de oxígeno inferior o igual a 200 milímetros de mercurio [relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$] o la necesidad de ventilación mecánica (259).

La enfermedad cardiovascular se definió como la presencia de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca o accidente cerebrovascular.

La neumopatía crónica se definió como la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o apnea del sueño obstructiva grave.

3.1.1.4 Mediciones de laboratorio

Se midieron los niveles de proteína C reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6), albúmina, alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), ferritina, dímero D, fibrinógeno, triglicéridos, procalcitonina, leucocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos y monocitos. Todas las mediciones de laboratorio se realizaron el mismo día.

3.1.1.5 Asignación de los pacientes de la cohorte a un grupo clínico

La cohorte total de 160 pacientes se distribuyó en cuatro grupos clínicos, de tal manera que en cada grupo hubiese el mismo número de pacientes, 40 sujetos. La asignación de un paciente a un grupo clínico u otro se hizo siguiendo los criterios de la escala ordinal de la OMS para la mejora clínica COVID-19 (138). Los cuatro grupos clínicos establecidos y el criterio de asignación según la escala de la OMS fueron:

- **Fallo respiratorio y exitus:** pacientes que fallecieron por fallo respiratorio. Puntuación 8 de la escala de la OMS (muerte).
- **Fallo respiratorio y supervivencia:** pacientes que desarrollaron fallo respiratorio pero que acaban resolviendo el cuadro. Puntuaciones 7 a 5 de la escala de la OMS (ventilación + soporte orgánico adicional o intubación o ventilación mecánica y ventilación no invasiva u oxígeno de alto flujo).
- **Oxigenoterapia:** pacientes que no desarrollan fallo respiratorio pero que requirieron oxigenoterapia. Puntuación 4 de la escala de la OMS (oxígeno por mascarilla o cánulas nasales).

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Sin oxigenoterapia:** pacientes que ingresaron el hospital pero que no desarrollaron fallo respiratorio ni precisaron tratamiento con oxígeno. Puntuación 3 de la escala de la OMS (hospitalizados, sin oxigenoterapia).

3.1.2 Cohorte de estudio 2: Subcohorte de receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) y subcohorte control de sujetos inmunocompetentes sanos vacunados con ARNm-1273 (Moderna Biotech)

3.1.2.1 Planteamiento del estudio, reclutamiento de TOS e inmunocompetentes vacunados y recogida de muestras y consideraciones éticas

1. Planteamiento del estudio y reclutamiento de pacientes

Se llevó a cabo un estudio de cohortes prospectivo en dos subcohortes de pacientes inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna). El reclutamiento se llevó a cabo en el Hospital Universitario 12 de Octubre y en el CNM-ISCIH.

La cohorte estaba integrada por 43 receptores de TOS y 33 sujetos sanos inmunocompetentes. La subcohorte de TOS estaba formada por 29 trasplantados renales y 14 hepáticos con injerto funcional y seguimiento regular en el Hospital Universitario 12 de Octubre, que fueron seleccionados aleatoriamente entre el 15 y el 27 de abril de 2021. También se incluyeron trasplantados con sospecha o documentación de COVID-19 previa.

La subcohorte control de 33 sujetos inmunocompetentes sanos fue seleccionada aleatoriamente de los trabajadores del CNM-ISCIH entre el 6 y el 23 de abril de 2021. Ninguno de los sujetos seleccionados tenía comorbilidades significativas ni sospecha o documentación de COVID-19 presente o previa.

2. Recogida de muestras de suero y consideraciones éticas

La respuesta humoral en ambas cohortes se analizó mediante la determinación de anticuerpos IgM, IgG y neutralizantes en el suero extraído en tres puntos temporales: basal (inmediatamente antes de la primera dosis de ARNm-1273), primera dosis (en un intervalo de cuatro semanas; inmediatamente antes de la segunda dosis) y segunda dosis (dos semanas después de recibir la segunda dosis).

Las muestras de sangre fueron recogidas en un volumen de aproximadamente 5 mL en tubo separador de suero BD Vacutainer RST 8 mL (Becton Dickinson, New Jersey, Estados Unidos). Tras su centrifugación en Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 2.500 rpm durante 10 minutos, el suero obtenido fue congelado a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de suero fueron enviadas y analizadas en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIH) (Majadahonda, España).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las normas éticas según las Declaraciones de Helsinki y Estambul. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica local y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito tanto en el Hospital Universitario 12 de Octubre como en el CNM.

3.1.2.2 Variables recogidas

De los 43 receptores de TOS vacunados se recogieron una serie de variables demográficas, clínicas y de tratamiento inmunosupresor en el momento de la vacunación. El registro se llevó a cabo utilizando un formulario de informe de casos estandarizado y los datos fueron extraídos de la Historia Clínica Electrónica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

De los 33 sujetos inmunocompetentes vacunados solamente se recogieron variables demográficas facilitadas por los propios voluntarios. El registro también se llevó a cabo utilizando un formulario de informe de casos estandarizado.

Los sujetos incluidos en ambas cohortes fueron seguidos hasta el 1 de julio de 2021.

La lista de variables registradas por familia en cada cohorte figura en la Tabla 5

Tabla 5. Variables recogidas en las cohortes de vacunados TOS e inmunocompetentes.

Variables recogidas en TOS vacunados	Variables recogidas en inmunocompetentes vacunados
Demográficas	Demográficas
Edad	Edad
Sexo	Sexo
Raza	Raza
Clínicas	
Hipertensión	
Enfermedad cardiovascular	
Evento tromboembólico	
Neumopatía crónica	
Diabetes	
Dislipemia	
Obesidad	
Tabaquismo	
Neoplasia	
Enfermedad reumatológica	
Tipo de trasplante	

MATERIAL Y MÉTODOS

Intervalo de tiempo desde el trasplante	
Tratamientos inmunosupresores	
Tacrolimus, MMF/MPS y prednisona	
Tacrolimus y MMF/MPS	
Tacrolimus	
Tacrolimus, prednisona e inhibidor de mTOR	
Otros	

3.1.2.3 Definiciones clínicas

La enfermedad cardiovascular se definió como la presencia de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca o accidente cerebrovascular.

El evento tromboembólico recogía trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar.

La neumopatía crónica se definió como la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o apnea del sueño obstructiva grave.

La enfermedad reumatológica se definió como la presencia de lupus eritematoso o artritis reumatoide.

3.2 Inactivación de las muestras de suero

Todas las muestras de suero empleadas en este trabajo, tanto de pacientes, sujetos vacunados y controles, fueron inactivadas en termobloque (Eppendorf ThermoMixer® C) a 56°C durante 30 minutos.

3.3 Obtención de la proteína S recombinante completa del SARS-CoV-2

La proteína S recombinante se produjo por transfección transitoria de células FreeStyle HEK 293F (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) utilizando polietilenimina y un plásmido que codifica una construcción derivada de HexaPro (260) que incluye la sustitución D614G. El ectodominio S se purificó a partir de sobrenadantes celulares filtrados utilizando columnas HisTrap™ Excel (CYTIVA, Washington D.C, Estados Unidos) y se sometió a un paso adicional de purificación por cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna Superose 6 10/300 (CYTIVA, Washington D.C, Estados Unidos). El tamaño de la proteína S completa recombinante se estimó en 180 kDa.

3.4 Estudio de idoneidad de la proteína S recombinante para la realización de los ensayos planteados

Una vez sintetizada la proteína recombinante, se procedió a comprobar su reactividad específica frente a sueros controles de sujetos con infección e inmunogenicidad

MATERIAL Y MÉTODOS

confirmada frente a SARS-CoV-2 (controles positivos) y frente a sueros controles de sujetos sin infección ni inmunogenicidad confirmada frente a SARS-CoV-2 (controles negativos). Para ello se llevó a cabo un western blot con el objetivo de localizar la presencia de una banda a 180 kDa correspondiente con la proteína S completa del SARS-CoV-2 en los sueros control positivo, por su parte en el western blot de los controles negativos, no debía aparecer esta banda. Además, se llevó a cabo el ensayo ELISA con la sipke recombinante en los sueros control (Ver [Anexo I. Material suplementario. 8.1 Resultados del wester blot sobre los sueros control. Figura S1](#) y [8.2 Resultados del ensayo ELISA para la detección de anticuerpos de isotipo IgM e IgG sobre los sueros control. Figura S2](#)).

3.4.1 Selección de sueros control

Los sueros control fueron seleccionados aleatoriamente de sujetos inmunocompetentes trabajadores del Hospital Universitario 12 de Octubre, de los que se había extraído una muestra durante el mes de abril de 2020. Estas muestras se custodiaban en la seroteca del Hospital.

Un suero control positivo se definió como aquel procedente de un sujeto que había tenido una infección confirmada por SARS-CoV-2 mediante positividad de una prueba de RT-PCR y que además poseía anticuerpos IgG frente a la espícula completa del SARS-CoV-2, detectados mediante una técnica de ELISA desarrollada por la Icahan School of Medicine Mount Sinai (261).

Un suero control negativo era aquel procedente de un sujeto en el que se descartaba una infección por SARS-CoV-2 mediante una prueba negativa de RT-PCR y que además no presentaba anticuerpos IgG frente a la espícula completa del SARS-CoV-2, determinados mediante una técnica de ELISA desarrollada por la Icahan School of Medicine Mount Sinai (261).

Se seleccionaron en total 20 sueros controles positivos y 20 sueros controles negativos para este análisis de idoneidad.

3.4.2 Realización del western blot

La confirmación de la presencia o ausencia de reactividad se llevó a cabo mediante western blot, para ello se cargaron geles de electroforesis de acrilamida al 7,5% con un lisado de células HEK 293T (ATCC® CRL-3216) a modo de control negativo y con la proteína S recombinante de SARS-CoV-2. Las proteínas migradas a través del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente fue enfrentada a los sueros de los controles para comprobar la reactividad o la ausencia de ella que tenían frente a las diferentes proteínas transferidas (262,263).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.5 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

3.5.1 Resumen del procedimiento

Los anticuerpos IgM, IgG y subclases de IgG del suero dirigidos a la proteína S se detectaron mediante ELISA, para ello se recubrieron microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos) durante 24 horas con 100 ng por pocillo de proteína S recombinante purificada en PBS (Lonza, Basilea, Suiza). A continuación, se eliminaron las proteínas no unidas mediante dos lavados con 200 μ L de Tween (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) 20 al 0,1% en PBS (PBST). El bloqueo se realizó con 100 μ L de PBST al 0,1% suplementado con un 5 % de leche en polvo (PBSTM) durante 1 hora. Después de lavar nuevamente los pocillos dos veces con PBST, se añadieron diluciones dobles en serie de muestras de suero (de 1/100 a 1/1.638.400) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidas de tres pasos de lavado con PBST. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ L de anti-IgM humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (dilución 1/10.000; Novex, Madrid, España), anti-IgG humana (dilución 1/3.000; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos), anti-IgG1 humana (dilución 1/1.000; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos), anti-IgG2 humana (dilución 1/1.000; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos), anti-IgG3 humana (dilución 1/5.000; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos) o anti-IgG4 humana (dilución 1/1.000; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras cuatro lavados con PBST, se añadieron 100 μ L de sustrato OPD de peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μ L de ácido sulfúrico 3N (Merck, Darmstadt, Alemania). Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas (Sunrise™ Tecan, Männedorf, Suiza). Los títulos se definieron como la mayor dilución de suero en la que la DO a 450 nm era al menos 0,2 por encima de los pocillos control negativo (pocillos sin suero) (73,262).

3.6 Ensayo de neutralización subrogada; inhibición de la unión S/ACE-2 por anticuerpos

3.6.1 Resumen del procedimiento

El ensayo pretendió determinar la potencial actividad neutralizadora existente en los sueros de pacientes COVID-19 y vacunados. Sin embargo, se diferenció con respecto a los ensayos de microneutralización con virus o pseudovirus en la rapidez y sencillez para llevar a cabo el ensayo y obtener resultados. La técnica se basó en un ELISA de inhibición de la unión de la proteína S al hACE-2.

Brevemente, se recubrieron microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Thermo Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos) con una versión quimérica de un anticuerpo monoclonal anti-Foldon (MF4C) (264) durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon durante 30 minutos con PBS (Lonza, Basilea, Suiza) complementado con BSA fracción V (Nzytech, Lisboa, Portugal) al 0,5 %

MATERIAL Y MÉTODOS

(PBS-BSA). A continuación, se capturó la construcción derivada de Hexapro (260) purificada que contenía la sustitución D614G (proteína S prefusión en conformación abierta (up) [LR18]) mediante incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación de la proteína S, se lavaron las placas con PBS y se realizó la incubación a temperatura ambiente de las diluciones de sueros durante 45 minutos. Posteriormente, el receptor hACE-2 [LR3] conjugado con la enzima Precision Protein StrepTactin-HRP (1/2.000) (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) (LR3-StrepTactin-HRP) se añadió a las diluciones de suero y se incubó durante 15 minutos.

Finalmente, se reveló la unión del receptor hACE-2 a la proteína S capturada mediante la reacción enzimática con el sustrato OPD (dihidrocloruro de orto-fenilendiamina) (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y posterior parada con ácido sulfúrico 3N (Merck, Darmstadt, Alemania). Para ello, la absorbancia generada se midió en un espectrofotómetro (Sunrise™ Tecan, Männedorf, Suiza) leyendo la DO a 493-620 nm.

El fondo del ensayo se determinó en dos columnas de la placa con la proteína S en conformación prefusión cerrada (down) [LR5] que no puede unirse al receptor hACE-2; se utilizó una construcción purificada derivada de HexaPro que incluía una doble sustitución de cisteína, S383C D985C. Se empleó como control negativo un pool de sueros de individuos inmunocompetentes de los años 2007-2011 (sin anticuerpos anti-SARS-CoV-2), el cuál proporcionaba el 100% de la señal de absorbancia. Por otro lado, se utilizó como control positivo el receptor hACE-2 no marcado y digerido con la proteasa HRV C3 (LR3d), el cual proporcionaba un 86% de la señal de absorbancia respecto al control negativo. Después de restar el fondo, el porcentaje de neutralización se calculó como $[1 - (\text{suero de prueba OD}_{495-620} / \text{control negativo OD}_{495-620})] \times 100$.

En todos los experimentos, la incubación del receptor hACE-2 no marcado logró un porcentaje de neutralización superior al 85%. Cada muestra se probó por duplicado con una dilución en serie triple empezando por 1/10. Las diluciones seriadas fueron: 1/10, 1/30, 1/90, 1/270, 1/810, 1/2.430 y 1/7.290.

El título neutralizante se definió como la dilución de suero que dio lugar a una reducción del 50% de la señal de absorbancia, tomando como referencia la absorbancia del control negativo. Para ello, se utilizó una curva de regresión no lineal con el porcentaje de señal frente a la dilución en log 10.

3.6.2 Protocolo del ensayo de neutralización subrogada

La composición de los reactivos empleados en el ensayo de neutralización subrogada se recoge en la Tabla 6 y en la Figura 9 se muestra un esquema de la disposición de las proteínas S en conformación abierta y cerrada sobre la placa de 96 pocillos.

- a. Tapizar cada pocillo de la placa de 96 con 400 ng de MF4c en 50 μ L de PBS (Lonza, Basilea, Suiza) e incubar durante 24 horas a 4°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

- b. Retirar el contenido de la placa sin lavar y proceder a bloquear con 150 μ L de tampón PBS-BSA 0,5% por pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación retirar el contenido de la placa sin lavar.
- c. Incubar 50 ng por pocillo en 50 μ L de PBS-BSA 0,5% de las proteínas S en conformación prefusión abierta (LR18) y cerrada (LR5) en los pocillos correspondientes, siguiendo el esquema de la figura 10. Incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos y posteriormente realizar 3 lavados con PBS.

Diluciones del suero (Ver Figura 10):

1. Para cada suero que se quiere titular, en una placa de 96 pocillos de fondo en U hacer diluciones seriadas 1/3 en un volumen de 50 μ l, partiendo de una dilución 1/10. Cada dos columnas corresponden a un suero distinto.
 2. Para ello, añadir en el primer pocillo de las dos primeras columnas 15 μ l del suero que se quiere estudiar + 135 μ l de PBS-BSA (dilución 1/10). Al resto de pocillos de las columnas añadir únicamente 100 μ l de PBS-BSA.
 3. Tomar del primer pocillo 50 μ l de la mezcla y transferir al siguiente pocillo de la columna, y así sucesivamente hasta la fila nº7 (dilución 1/7.290). Repetir el proceso en cada columna. Por cada placa se puede calcular el título neutralizante de 5 sueros duplicados.
 4. Incluir en cada placa 4 controles negativos (pool de sueros de inmunocompetentes anteriores a la pandemia) a una dilución 1/10, 50 μ l por pocillo y 2 controles positivos con el receptor hACE-2 digerido no marcado (LR3d), 10 μ g de proteína + 50 μ l de PBS-BSA por pocillo.
- d. Transferir las diluciones de suero, los controles negativos y los controles positivos LR3d a la placa de 96 pocillos tapizada con la proteína S e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
 - e. Transcurrida la incubación, no se retiran las muestras y se añade sobre todos los pocillos el complejo hACE-2 marcado con StrepTactin- HRP (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) (1/2.000) (1.000 ng de hACE-2 por pocillo + StrepTactin-HRP 1/2.000 en PBS-BSA 0.5%) [LR3-StrepTactin-HRP] en PBS-BSA, un volumen de 50 μ l por pocillo. Al añadir el complejo, agitar la placa para una correcta mezcla de los 2 volúmenes. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente realizar 3 lavados con PBS.
 - f. Incubar la placa con la solución de sustrato OPD, 50 μ l por pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

- g. Detener la reacción enzimática con 50 µl por pocillo de ácido sulfúrico 3N (Merck, Darmstadt, Alemania).
- h. Realizar la lectura de absorbancias a 490-650nm en espectrofotómetro (Sunrise™ Tecan, Männedorf, Suiza). En todos los casos sustraer a la señal obtenida con la proteína LR18 la registrada con la LR5 (dos columnas de referencia), el porcentaje de inhibición de la señal se calculó como $[1 - (\text{DO } 495\text{-}620 \text{ del suero problema} / \text{DO } 495\text{-}620 \text{ del control negativo})] \times 100\%$.

Cálculo del título:

El título neutralizante se definió como la dilución de suero que dio lugar a una reducción del 50% de la señal de absorbancia, tomando como referencia la absorbancia del control negativo. Para ello, se utilizó una curva de regresión no lineal con el porcentaje de señal frente a la dilución en log 10.

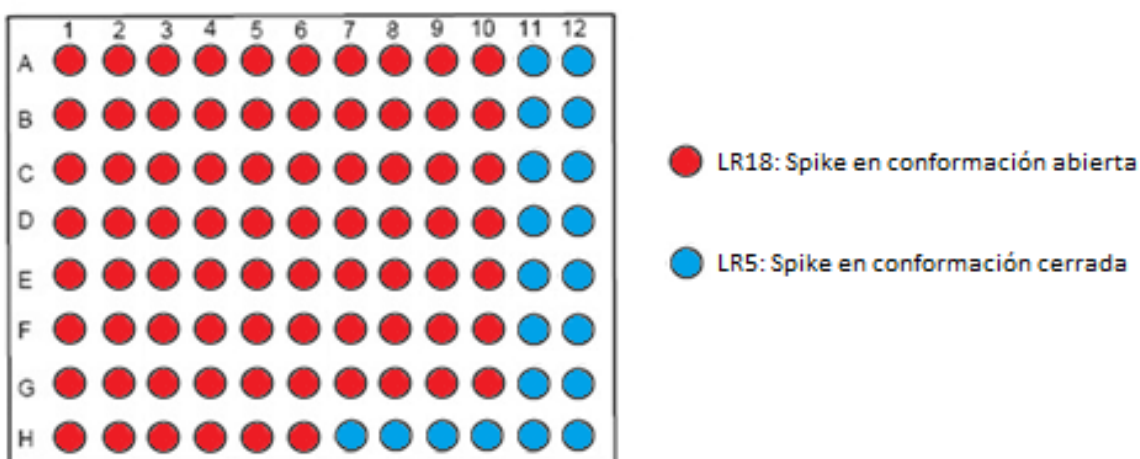
Tabla 6. Composición de las soluciones tampón de bloqueo y dilución, MF4C, LR18, LR5, LR3-StrepTactin-HRP, LR3d y del sustrato de la reacción enzimática:

Componente	Cantidades
Tampón de bloqueo y dilución (PBS-BSA al 0,5%) (PBS 1X + BSA con factor V)	
PBS 1X	1000 mL
BSA con fracción V	5 g
Solución de MF4C (para una placa)	
Anticuerpo MF4C (1.550 ng/µL)	25,8 µL
PBS 1X	5 mL
Solución de LR18 (para una placa)	
Proteína LR18 (1.000 ng/µL)	4 µL
PBS-BSA al 0,5%	4 mL
Solución de LR5 (para una placa)	
Proteína LR5 (850 ng/µL)	1,41 µL
PBS-BSA al 0,5%	1,2 mL
Solución de LR3 StrepTactin-HRP (para una placa)	
Proteína LR3 (4.600 ng/µL)	21,74 µL
StrepTactin-Po	2,5 µL
PBS-BSA al 0,5%	5 mL
Solución de LR3d (para una placa)	
Proteína LR3d (1.900 ng/µL)	31,58 µL
PBS-BSA al 0,5%	300 µL
Sustrato OPD ELISA	

MATERIAL Y MÉTODOS

Solución de ácido cítrico 0,05M + Na ₂ HPO ₄ 0,1M pH5	5 mL
Dihidrocloruro de orto Fenilendiamina	10 mg
H ₂ O ₂	10 µL
Solución de parada de la reacción enzimática (Ácido sulfúrico 3N)	
H ₂ SO ₄ (PM: 98,08 g/mol; d: 1,84 g/mL)	16 mL
Agua destilada	184 mL

Figura 9. Disposición de las proteínas S en conformación abierta y cerrada sobre la placa de 96 pocillos.

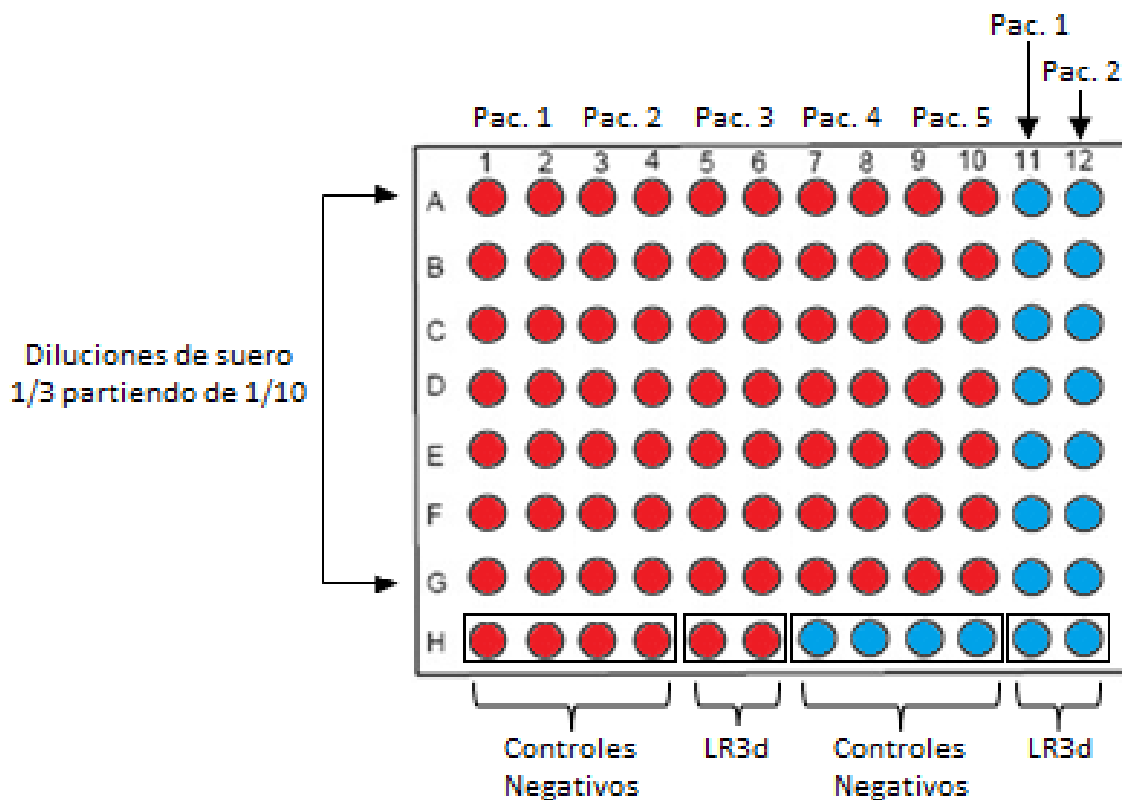


MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 10. Esquema de diluciones del suero por paciente y disposición en placa de 96 pocillos.

Fila	Suero (μL)	PBS-BSA (μL)	Dilución
A	15	135	1/10
B		100	1/30
C		100	1/90
D		100	1/270
E		100	1/810
F		100	1/2.430
G		100	1/7.290
H	-	-	-

50 μL (indicated for rows A-F)



3.7 Análisis estadístico

Análisis descriptivo y analítico de las cohortes

La normalidad de la distribución y la homogeneidad de la varianza se comprobaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las variables cuantitativas se compararon con la prueba t de Student y la prueba ANOVA (para medidas independientes y de distribución normal), la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis (para medidas independientes y de distribución no normal) o la prueba de Friedman (para medidas relacionadas y de distribución no normal). Los análisis posteriores por pares entre grupos se realizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las variables categóricas se evaluaron con la prueba exacta de χ^2 o de 2 colas de Fisher y la prueba de McNemar, según procediera. Las correlaciones entre las variables cuantitativas se evaluaron con el coeficiente de correlación de Pearson (para las variables con distribución normal) o la rho de Spearman (para las variables sin distribución normal). Los resultados cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar (SD) para las variables con distribución paramétrica o mediana y rango intercuartílico (IQR) para las variables con distribución no paramétrica. Los resultados de las variables categóricas se expresan como número y como porcentaje del grupo del que proceden. El análisis multivariante se realizó mediante regresión lineal múltiple.

Análisis de parámetros serológicos

Se consideró que los pacientes eran seropositivos para el SARS-CoV-2 si los títulos de anticuerpos determinados mediante ensayos ELISA eran superiores a 50 y se consideró que tenían anticuerpos neutralizantes positivos si el título de anticuerpos neutralizantes era superior a 3,3. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman y el valor p para evaluar la correlación entre las variables cuantitativas y cualitativas. La comparación del nivel de anticuerpos entre los grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y entre las dosis de vacunación, mediante la prueba de Friedman. Los análisis posteriores por pares entre los grupos de gravedad de la enfermedad y los grupos de vacunados se realizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas, dada la distribución no normal de los datos y la falta de homocedasticidad, evaluada por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente.

Para estimar valores de corte, se utilizó el análisis de la curva de característica operativa del receptor (ROC). También se calcularon el área bajo la curva, la sensibilidad, la especificidad y los valores p para los valores de corte calculados.

El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron con IBM SPSS Statistics for Windows, versión 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp y SAS/STAT 10.1; SAS Institute Inc., Cary, NC) y Prism 5 v.5.01 (GraphPad Software). Las variables con un valor $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estructuración del proyecto de tesis doctoral

El proyecto fue realizado en dos fases en las que se pretendió determinar la respuesta inmune humoral frente al SARS-CoV-2 en dos poblaciones diferentes; por un lado, pacientes con infección aguda por SARS-CoV-2 y por otro, pacientes vacunados frente a la COVID-19.

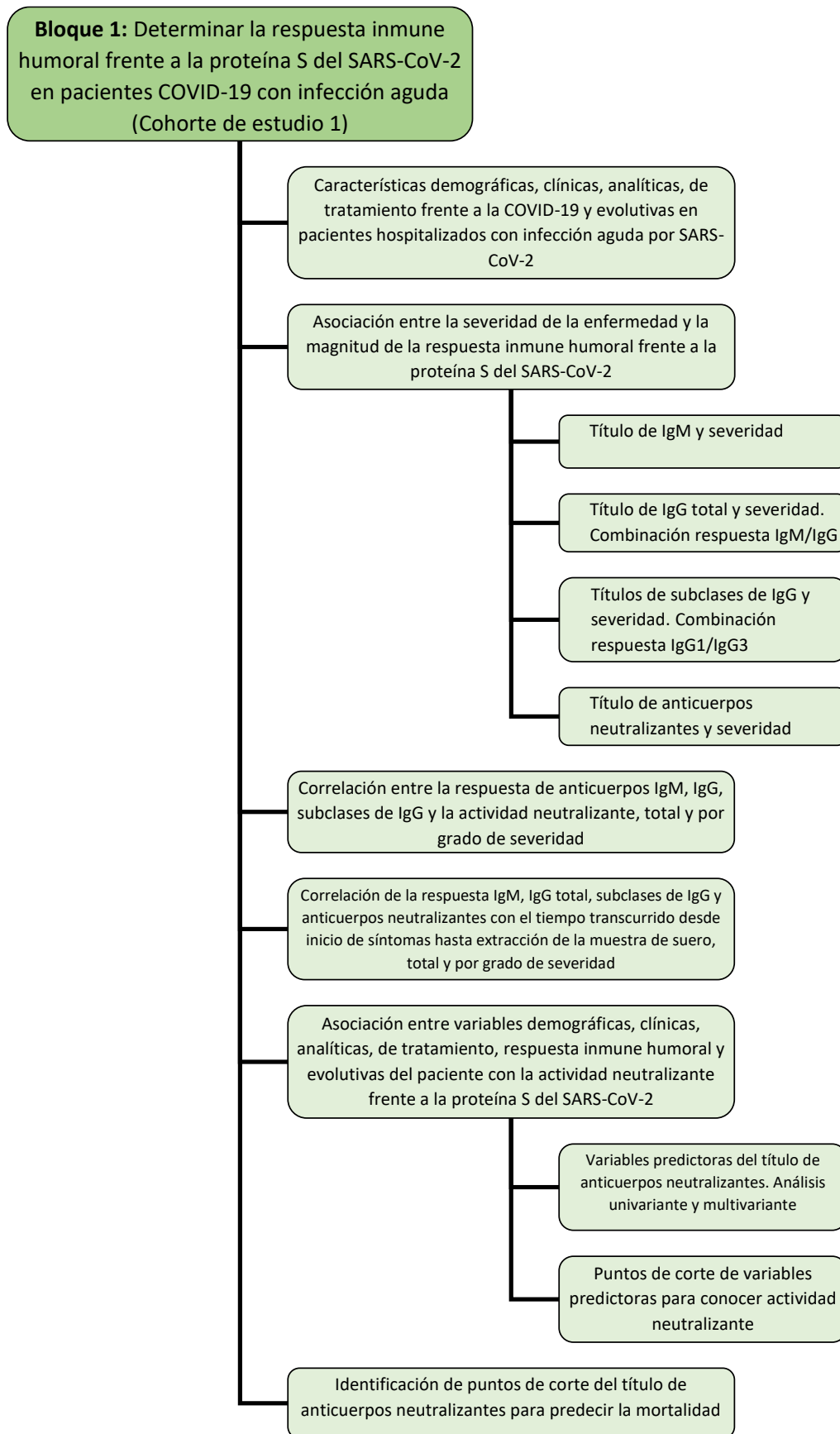
La primera fase (Bloque 1) se planteó para conocer las características de la respuesta inmune humoral de los pacientes COVID-19 hospitalizados con infección aguda y su asociación con las características demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento y evolutivas.

En la segunda fase (Bloque 2) el objetivo principal fue comparar la respuesta inmune humoral generada por trasplantados de órgano sólido (riñón e hígado) con la que genera la población sana inmunocompetente tras la administración de la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech). Se buscaron también las asociaciones entre las variables demográficas, clínicas y de pauta inmunosupresora con la magnitud de la respuesta inmune. Además, se comparó la magnitud de la respuesta humoral desarrollada por vacunados inmunocompetentes frente a la COVID-19 y la generada por pacientes con COVID-19 agudo.

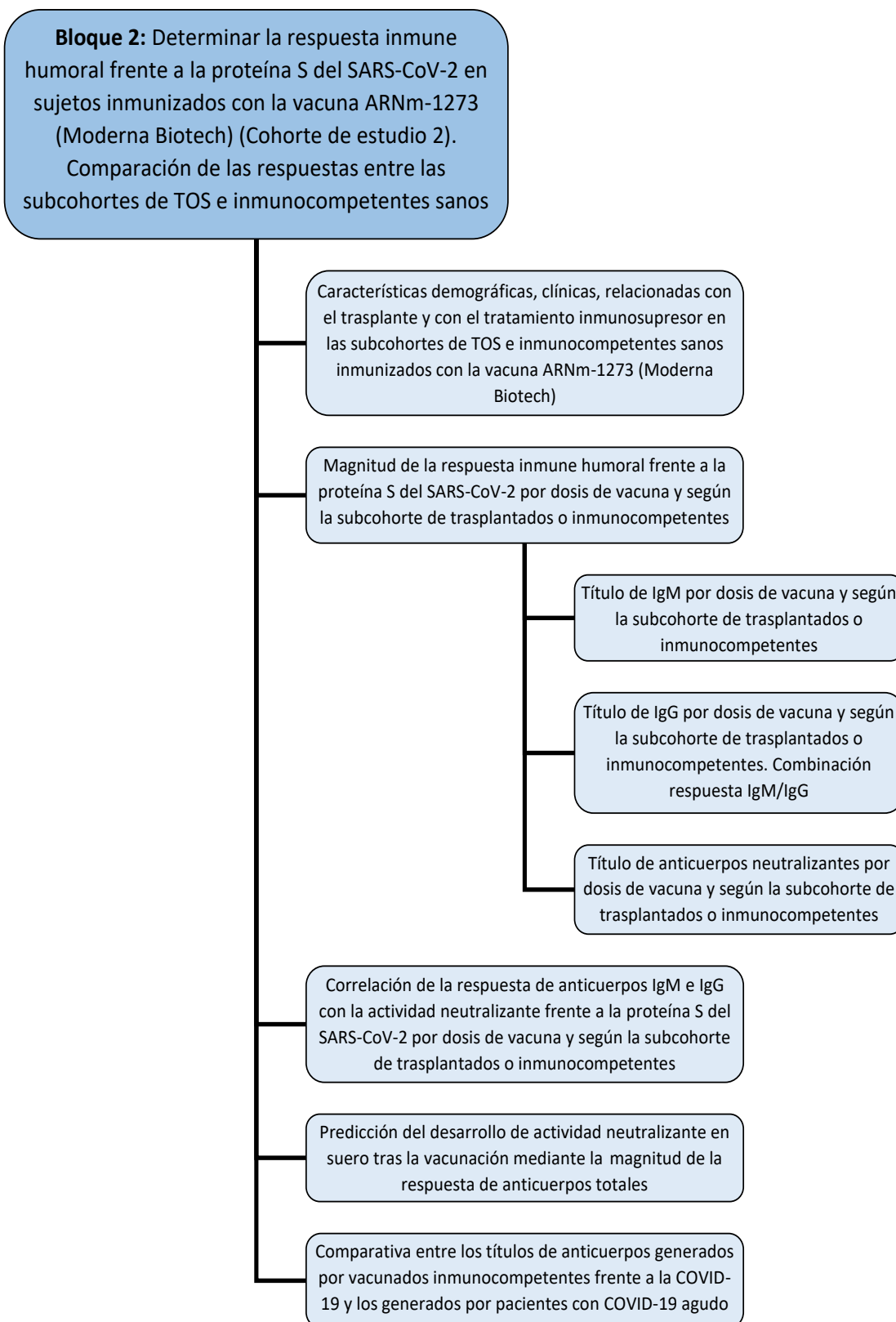
La Figura 11 muestra la estructura del proyecto de tesis doctoral:

RESULTADOS

Figura 11. Estructuración del proyecto de tesis doctoral.



RESULTADOS



RESULTADOS

4.2 Bloque 1: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con infección aguda (Cohorte de estudio 1)

4.2.1 Características demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento frente a la COVID-19 y evolutivas en pacientes hospitalizados con infección aguda por SARS-CoV-2

Las características de los cuatro grupos clínicos incluidos en el estudio (FR y exitus, FR y supervivencia, oxigenoterapia y sin oxigenoterapia) se muestran en la Tabla 7.

1. Características demográficas

La mediana de edad de la cohorte total fue de 61 años (IQR: 49,25 - 75) con un 68,8% (110/160) de pacientes varones y un 70% (112/160) de raza caucásica. La edad de los pacientes que desarrollaron FR y fallecieron fue significativamente mayor en comparación con los otros tres grupos clínicos ($p < 0,001$), por otra parte, los pacientes con oxigenoterapia tenían mayor edad que los que no la recibían ($p = 0,006$). El sexo masculino no estuvo significativamente más representado en ninguno de los grupos clínicos, sin embargo, la raza caucásica sí que tenía mayor representación en FR y exitus con respecto a FR y supervivencia ($p = 0,003$). En sentido inverso, la raza latino americana fue más numerosa entre los pacientes que sobrevivían al FR con respecto a los que fallecían ($p = 0,022$).

2. Características clínicas

La cohorte total de pacientes se caracterizó por tener elevada comorbilidad, con un 81,9% (131/160) de sujetos que tenían por lo menos un factor de riesgo para padecer COVID-19 severo. Las comorbilidades más frecuentes fueron la hipertensión (35,6%), la dislipemia (27,5%), la diabetes (20%), la enfermedad cardiovascular (15,6%) y la enfermedad pulmonar crónica (6,3%). Analizando los grupos clínicos por la presencia o no de comorbilidades, se observó que el grupo de FR y exitus tenía un número significativamente mayor de pacientes con comorbilidades que los grupos de FR y supervivencia ($p = 0,048$), oxigenoterapia ($p = 0,025$) y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$). A su vez, los pacientes con FR y supervivencia tenían más comorbilidades que el grupo sin oxigenoterapia ($p = 0,022$) y los pacientes con oxigenoterapia más comorbilidades que los que no recibieron oxigenoterapia ($p = 0,045$).

3. Características analíticas

Analizándolas por grupos clínicos destacaron:

- Saturación de oxígeno: los pacientes con FR (tanto los que fallecían como los que sobrevivían) tenían una saturación de oxígeno significativamente más baja que los grupos de pacientes que no tenían FR ($p < 0,001$ en todos los casos), también se observó esta diferencia entre el grupo de oxigenoterapia y el que no recibía oxígeno ($p = 0,003$).

RESULTADOS

- LDH: los pacientes que desarrollaban FR (exitus y supervivientes) tenían un nivel más elevado que el de los dos grupos que no hacían FR ($p < 0,001$ en todos los casos).
- PCR: los grupos de FR (exitus y supervivencia) tenían un nivel de PCR significativamente más alto que el de los grupos que no hacían FR ($p < 0,001$ en todos los casos).
- Procalcitonina: los grupos de FR (exitus y supervivencia) tenían un nivel de procalcitonina significativamente más alto que el de los grupos que no hacían FR ($p < 0,001$ en todos los casos).
- AST: los pacientes que desarrollaban FR (exitus y supervivientes) tenían un nivel de AST más elevado que el del grupo que no recibió oxigenoterapia ($p < 0,001$ en ambos casos).
- Albumina: El grupo que no recibió oxigenoterapia tenía mayor nivel de albumina que el de los dos grupos que desarrollaron FR (exitus y supervivencia) ($p < 0,001$ en ambos casos). Además, el grupo de oxigenoterapia tenía un valor más elevado comparado con el grupo de FR y exitus ($p = 0,013$).
- Ferritina: los grupos de FR (exitus y supervivencia) tenían un nivel de ferritina significativamente más alto que el del grupo que no recibió oxigenoterapia ($p < 0,001$ en ambos casos). También se observó esta diferencia entre el grupo de FR y supervivencia y oxigenoterapia ($p = 0,018$).
- Fibrinógeno: los grupos de FR (exitus y supervivencia) tenían un nivel de fibrinógeno significativamente más alto que el del grupo que no recibió oxigenoterapia ($p = 0,026$ y $p < 0,001$, respectivamente). También se observó esta diferencia entre el grupo de FR y supervivencia y oxigenoterapia ($p < 0,001$).
- Dímeros D: los pacientes que desarrollaban FR (exitus y supervivientes) tenían un valor de dímeros D más elevado que el del grupo que no recibió oxigenoterapia ($p < 0,001$ y $p = 0,022$ respectivamente).
- Leucocitos: El grupo clínico de FR y supervivencia tenía un conteo de leucocitos significativamente más elevado que el de los grupos de oxigenoterapia ($p = 0,015$) y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$).
- Neutrófilos: El grupo clínico de FR y supervivencia tenía un número de neutrófilos significativamente más elevado que el de los grupos de oxigenoterapia ($p = 0,003$) y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$).

4. Tratamiento administrado

Hidroxiclороquina y lopinavir/ritonavir fueron administrados por igual a todos los grupos clínicos, mientras que el INF- β , los corticoesteroides y el tocilizumab, fueron administrados a los pacientes que desarrollaron fallo respiratorio. Analizando el tratamiento frente a la COVID-19 por grupos clínicos destacaron:

RESULTADOS

- Hidroxicloroquina y lopinavir/ritonavir: no hubo diferencias significativas entre grupos en la administración de estos fármacos.
- INF- β : FR y exitus recibió significativamente más que los grupos de oxigenoterapia y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$). FR y supervivencia también recibió más que oxigenoterapia y sin oxigenoterapia ($p = 0,003$).
- Corticoesteroides: FR y exitus recibió significativamente más que oxigenoterapia ($p = 0,007$) y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$). FR y supervivencia también recibió más que oxigenoterapia y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$).
- Tocilizumab: FR y supervivencia recibieron significativamente más tocilizumab que FR y exitus ($p = 0,009$), oxigenoterapia y sin oxigenoterapia ($p < 0,001$).

5. Evolución

No se observaron diferencias significativas ni en los días transcurridos desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso hospitalario o hasta la toma de muestras en cada uno de los grupos clínicos. Tampoco entre el tiempo desde el ingreso hospitalario a la extracción del suero.

Sin embargo, los pacientes con FR que sobrevivieron tuvieron más días de curso clínico y estancia hospitalaria que el resto ($p < 0,001$). También los pacientes del grupo de oxigenoterapia tuvieron más días de curso clínico y una estancia hospitalaria más prolongada que los del grupo sin oxigenoterapia ($p = 0,012$ y $p = 0,002$, respectivamente).

RESULTADOS

Tabla 7. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes al ingreso

Características	Total (N=160)	FR y exitus (n=40)	FR y supervivencia (n=40)	Oxigenoterapia (n=40)	Sin oxigenoterapia (n=40)	valor p
Edad (y), mediana (IQR)	61 (49,25-75)	76,5 (68,75-83)	55 (47-65)	65 (48,75-75,75)	51,5 (43-57)	<0,001
Sexo, masculino, n°. (%)	110 (68,8%)	29 (72,5%)	30 (75%)	28 (70%)	23 (57,5%)	0,337
Raza, n°. (%)						
Caucásica	112 (70%)	34 (85%)*	22 (55%)*	28 (70%)	28 (70%)	*0,003
Latino americana	43 (26,9%)	6 (15%)*	15 (37,5%)*	10 (25%)	12 (30%)	*0,022
Subsahariana	1 (0,6%)	0 (0%)	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	
Magrebí	2 (1,3%)	0 (0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	0 (0%)	
Asiática	1 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,5%)	0 (0%)	
Gitana	1 (0,6%)	0 (0%)	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	
Comorbilidades, n°. (%)	131 (81,9%)	39 (97,5%)	34 (85%)	33 (82,5%)	25 (62,5%)	0,001
Hipertensión	57 (35,6%)	19 (47,5%)	16 (40%)	15 (37,5%)	7 (17,5%)	0,035
Enfermedad cardiovascular	25 (15,6%)	10 (25%)	5 (12,5%)	7 (17,5%)	3 (7,5%)	0,167
Asma	9 (5,6%)	1 (2,5%)	3 (7,5%)	2 (5%)	3 (7,5%)	0,730
Neumopatía crónica	10 (6,3%)	7 (17,5%)	1 (2,5%)	2 (5%)	0 (0%)	0,006
Diabetes	32 (20%)	13 (32,5%)	9 (22,5%)	7 (17,5%)	3 (7,5%)	0,043
Dislipemia	44 (27,5%)	15 (37,5%)	8 (20%)	11 (27,5%)	10 (25%)	0,353
Obesidad	55 (43,3%)	19 (57,6%)	15 (46,9%)	11 (34,4%)	10 (33,3%)	0,161
*datos no disponibles en todos los casos	N=127	n=33	n=32	n=32	n=30	
Tabaquismo	11 (7,2%)	2 (5,1%)	4 (10%)	3 (8,6%)	2 (5,3%)	0,795
*datos no disponibles en todos los casos	N=152	n=39	n=40	n=35	n=38	
Neoplasia	15 (9,4%)	6 (15%)	2 (5%)	4 (10%)	3 (7,5%)	0,462
Trasplante	1 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,5%)	0,389
Índice de comorbilidades de Charlson, mediana (IQR)	2 (1-4)	4 (3-6)	2 (1-3)	2,5 (1-4)	1 (0-2)	< 0,001
Características analíticas §						
Saturación de oxígeno (%)	92 (88-96) N= 159	88 (83,25-90) n=40	90 (85-92) n= 39	94 (91-96) n=40	98 (96-99) n=40	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
LDH (U/L)	379,5 (304,5-493,3)	443 (377,75-590,25)	494 (392-621)	335 (303,75-389,5)	290 (236,5-372)	< 0,001
PCR (mg/dL)	10,93 (4,75-18,03)	15,44 (10,74-23,57)	18 (9,87-25,53)	8,86 (3,9-12,34)	3,73 (1,62-7,66)	< 0,001
IL-6 (pg/mL)	38 (7,8-159,8) N=16	79 n=1	166 (117-346) n= 7	16 (2-31,5) n=4	10 (2,3-35,8) n=4	0,03
*datos no disponibles en todos los casos						
Procalcitonina (ng/mL)	0,14 (0,09-0,42) N=63	0,38 (0,19-0,81) n=20	0,23 (0,13-0,60) n=18	0,1 (0,08-0,11) n=12	0,08 (0,06-0,12) n=13	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
ALT (U/L)	32 (21-50) N=159	30,5 (20-45,8) n=40	42 (28-70,3) n=40	29 (20,3-52,5) n=40	29 (17-52) n=39	0,07
*datos no disponibles en todos los casos						
AST (U/L)	42,5 (30-62,8)	51 (37,8-70)	53 (39,3-74,5)	35,5 (30-59)	28 (24-47,5)	< 0,001
Albumina (g/dL)	3,8 (3,4-4,1) N=151	3,6 (3,3-3,9) n=39	3,6 (3,3-4,0) n=38	3,9 (3,6-4,2) n=37	4,1 (3,8-4,4) n=37	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
Ferritina (ng/mL)	990 (508-1.792) N= 143	1.532 (739-2.254) n=35	1.664 (978,3-2.096,7) n=34	784 (449,5-1.422,5) n=36	522,9 (201,3-840,3) n=38	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
Fibrinógeno (mg/dL)	770 (626-896) N=101	784 (627,3-934,8) n=22	877 (792,8-1.011) n=28	723 (630-850) n=30	592 (515,5-728) n=21	< 0,001

RESULTADOS

*datos no disponibles en todos los casos						
Triglicéridos (mg/dL)	124 (99-174) N=35	217 (111,5-558) n=5	148 (102-212) n=7	120 (94,3-168) n=10	113 (97,5-154) n=13	0,313
*datos no disponibles en todos los casos						
Dímeros D (ng/mL)	679,5 (431,3-1345,5) N=98	1370 (649,5-3326,5) n=22	755 (603,5-1118,5) n=29	599 (441,8-1368) n=26	345 (294-675) n=21	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
Leucocitos (x 10 ³ células/μL)	6,1 (4,8-7,7)	6,1 (4,6-8,8)	7,2 (5,7-11,1)	5,8 (4,3-7,1)	5,4 (4,5-6,5)	< 0,001
Neutrófilos (x 10 ³ células/μL)	4,5 (3,3-6,2)	5 (3,4-7,4)	5,9 (4,4-9,5)	4,2 (2,9-5,8)	3,8 (2,7-4,5)	< 0,001
Linfocitos (x 10 ³ cells/μL)	0,8 (0,6-1,2)	0,7 (0,6-1,05)	0,8 (0,6-1,1)	0,9 (0,53-1,2)	1 (0,7-1,38)	0,064
Monocitos (x 10 ³ cells/μL)	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,2-0,6)	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,4-0,6)	0,4 (0,3-0,6)	0,458
Plaquetas (x 10 ³ cells/μL)	184,5 (153,3-233,5)	176,5 (136-229)	216,5 (162,8-275,3)	174 (145,3-211,5)	212 (156,8-232,5)	0,09
Tratamiento frente a la COVID-19 en la extracción del suero, n°. (%)						
Hidroxicloroquina	152 (95%)	37 (92,5%)	40 (100%)	38 (95%)	37 (92,5%)	0,368
Lopinavir/ritonavir	109 (85,8%) N= 127	27 (84,4%) n=32	30 (96,8%) n=31	24 (82,8%) n=29	28 (80%) n=35	0,230
*datos no disponibles en todos los casos						
IFN-β	32 (20,3%) N= 158	16 (40%) n=40	12 (30,8%) n=39	2 (5,1%) n=39	2 (5%) n=40	< 0,001
*datos no disponibles en todos los casos						
Tocilizumab	36 (22,5%)	8 (20%)	19 (47,5%)	7 (17,5%)	2 (5%)	< 0,001
Corticoesteroides	76 (47,5%)	26 (65%)	31 (77,5%)	14 (35%)	5 (12,5%)	< 0,001
Tiempo desde el inicio de síntomas al ingreso hospitalario (d), mediana (IQR).	6 (4-8)	6 (4,25-8)	6 (4-7)	6 (5-8)	6,5 (4-9,75)	0,885
Tiempo desde el inicio de síntomas a la extracción del suero (d), mediana (IQR).	9 (7-11)	9 (6,25-11)	8 (7-10)	9 (7-10)	9 (6-11,75)	0,970
Tiempo desde el ingreso hospitalario a la extracción del suero (d), mediana (IQR).	2 (2-3)	2 (2-3)	2,5 (2-3)	2 (2-3)	2 (2-3)	0,759
Duración de la estancia hospitalaria (d), mediana (IQR).	9 (5-16)	7,5 (5-11)	21,5 (15,25-31)	9,5 (6,25-15)	5 (4-7,75)	< 0,001
Duración del curso clínico (d), mediana (IQR).	17 (12-25)	14 (11-20)	27,5 (22-38,5)	17 (12,25-24,75)	13 (9,25-16)	< 0,001

FR: fallo respiratorio. § se representa mediana y rango intercuartílico.

RESULTADOS

4.2.2 Asociación entre la severidad de la enfermedad y la magnitud de la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2

La magnitud de la respuesta humoral durante el ingreso hospitalario se caracterizó para todos los pacientes mediante la determinación de los títulos de anticuerpos IgM, IgG totales, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2. En un primer análisis se procedió a describir cada uno de ellos y su relación con la severidad clínica en la totalidad de la cohorte.

4.2.2.1 Título de IgM y severidad

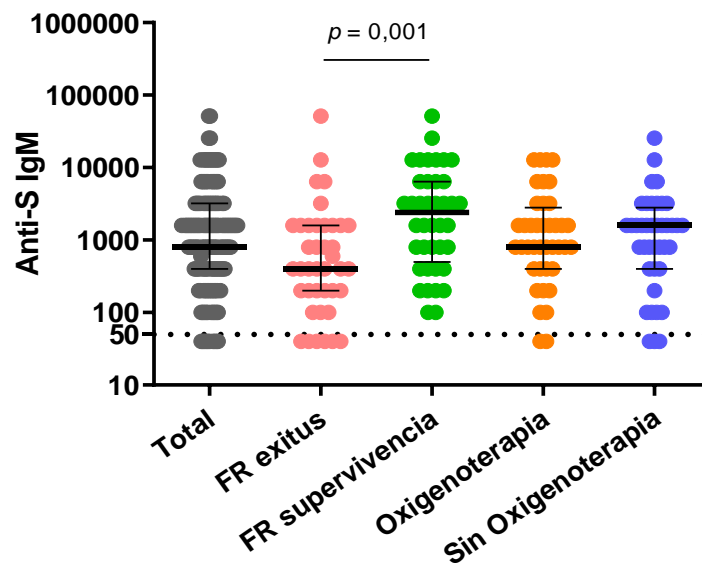
Título de IgM y severidad

La mediana del título de IgM de la cohorte total fue de 800 (400 – 3.200) con unos valores que oscilaron entre 40 y 51.200, y un 93,13% (149/160) de pacientes con títulos de IgM por encima del límite de detección (más de 50). De los 11 pacientes con título de IgM por debajo del límite de detección, 6 de ellos pertenecían al grupo FR y exitus, 2 al grupo que recibió oxigenoterapia y 3 al grupo que no recibió oxigenoterapia, mientras que todos los pacientes que hicieron FR pero sobrevivieron tenían título detectable de IgM. De hecho, se observó que los pacientes que no desarrollaban título de IgM al ingreso tenían mayor riesgo de fallecer que los que sí lo montaban (OR: 4,06 (IC 95%: 1,17 – 14,12); $p = 0,028$).

Los pacientes que desarrollaron FR y sobrevivieron tenían una mediana de título de IgM seis veces más alta que los no supervivientes (2.400 (500 – 6.400) vs 400 (200 – 1.600), respectivamente; $p = 0,001$), mientras que no se observaron diferencias significativas en los títulos de IgM al compararlos con los otros grupos clínicos. Los títulos de IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos se representan en la Figura 12.

RESULTADOS

Figura 12. Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total. La cohorte total se representa con círculos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules (n=40). El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.



4.2.2.2 Título de IgG total y severidad. Combinación respuesta IgM/IgG

Título de IgG total y severidad

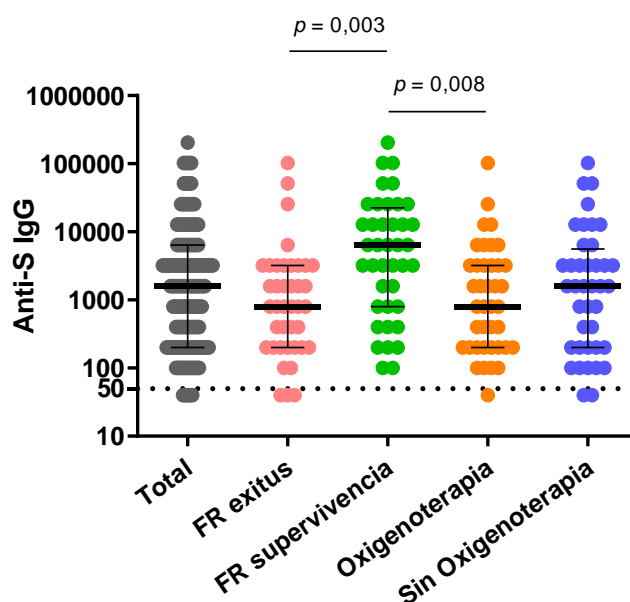
La mediana del título de IgG de la cohorte total fue de 1.600 (200 – 6.400) con unos valores que oscilaron entre 40 y 204.800 y un 96,25% (154/160) de pacientes con títulos de IgG por encima del límite de detección (más de 50). De los 6 pacientes con título de IgG por debajo del límite de detección, 3 de ellos pertenecían al grupo de FR y exitus, 1 al grupo que recibió oxigenoterapia y 2 al grupo que no recibió oxigenoterapia, mientras que todos los pacientes que hicieron FR pero sobrevivieron tenían título detectable de IgG. No obstante, no se probó que los pacientes que no tenían título de IgG al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que si tenían título detectable ($p = 0,170$).

De la misma manera que con el título de IgM, los pacientes que desarrollaron FR y sobrevivieron también tenían niveles de mediana más altos de IgG total que los que

RESULTADOS

desarrollaron FR y sucumbieron a la infección, concretamente 8 veces más altos (6.400 (800 – 22.400) vs 800 (200 – 3.200), respectivamente; $p = 0,003$). El grupo de FR y supervivencia también tenía títulos de IgG total superiores a los de los pacientes que requirieron oxigenoterapia (6.400 (800 – 22.400) vs 800 (200 – 3.200), respectivamente; $p = 0,008$). Los títulos de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos se representan en la Figura 13.

Figura 13. Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total. La cohorte total se representa con círculos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules (n=40). El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.



Combinación respuesta IgM/IgG

En cuanto a la reactividad combinada de IgM e IgG, la mayoría de pacientes de la cohorte total tuvieron títulos detectables de ambos isotipos. Solamente el 8,13% (13/160) de los pacientes no presentaba esta respuesta combinada. De estos 13 pacientes, 6 pertenecían al grupo de pacientes fallecidos, 3 al grupo que recibió oxigenoterapia y 4 al que no la recibió. La totalidad de los pacientes supervivientes al FR tenía reactividad frente a ambos isotipos. No obstante, no se probó que los pacientes que no tenían respuesta conjunta de IgM e IgG al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que si tenían título detectable de ambos isotipos ($p = 0,076$).

RESULTADOS

En los 13 pacientes sin título detectable combinado de IgM e IgG, 4 de ellos directamente no presentaban reactividad frente a ningún isotipo, 3 pacientes del grupo de fallecidos y otro del grupo que no recibió oxigenoterapia; habiendo por tanto un porcentaje mayor de fallecidos entre los pacientes que no montaban ningún tipo de respuesta humoral respecto a los pacientes que si desarrollaban algún tipo de respuesta ($p = 0,019$). Los 9 pacientes restantes que no tenían título detectable para los dos isotipos combinados pero si por separado, se caracterizaron porque la mayoría de ellos, 7 pacientes (3 FR y exitus, 2 oxigenoterapia y 2 sin oxigenoterapia), tenían título de IgG pero no de IgM. Por el contrario, solo 2 pacientes tenían título de IgM pero no de IgG (1 oxigenoterapia y 1 sin oxigenoterapia).

4.2.2.3 Títulos de subclases de IgG y severidad. Combinación respuesta IgG1/IgG3

Título de IgG1 y severidad

La mediana del título de IgG1 de la cohorte total fue de 40 (40 – 200), con unos valores que oscilaron entre 40 y 12.800 y un 44,38% (71/160) de pacientes con títulos por encima del límite de detección (más de 50). De los 89 pacientes con título de IgG1 por debajo del límite de detección, 26 pertenecían al grupo de FR y exitus, 12 al grupo de FR y supervivencia, 26 al grupo que recibió oxigenoterapia y 25 al grupo que no recibió oxigenoterapia. No se probó que los pacientes que carecían de título de IgG1 al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que si tenían título detectable ($p = 0,170$). Sin embargo, dentro de los pacientes que desarrollaron FR, aquellos que carecían al ingreso de respuesta IgG1 tenían más riesgo de fallecer (OR: 4,33 (IC 95%: 1,70 – 11,07); $p = 0,002$).

El grupo de supervivientes con FR tenía una mediana de título de IgG1 más alta que la de los no supervivientes con FR (200 (40 – 700) vs 40 (40 – 200), respectivamente; $p = 0,003$) y que los que requirieron oxigenoterapia (40 (40 – 100); $p = 0,002$). También el grupo de FR y supervivencia tuvo un título de IgG1 significativamente mayor que el del grupo que no recibió oxigenoterapia (200 (40 – 700) vs 40 (40 – 200), respectivamente; $p = 0,023$).

Título de IgG2 y severidad

Ninguno de los pacientes, independientemente del grupo clínico al que pertenecía, tuvo título detectable de IgG2. No se observaron por tanto diferencias entre grupos ni se pudo concluir que su falta de reactividad supusiese mayor riesgo de mortalidad.

Título de IgG3 y severidad

La mediana del título de IgG3 de la cohorte total fue de 40 (40 – 200), con unos valores que oscilaron entre 40 y 102.400 y un 38,75% (62/160) de pacientes con títulos por encima del límite de detección (más de 50). De los 98 pacientes con título de IgG3 por

RESULTADOS

debajo del límite de detección, 27 pertenecían al grupo de FR y exitus, 22 al grupo de FR y supervivencia, 26 al grupo que recibió oxigenoterapia y 23 al grupo que no recibió oxigenoterapia. No se probó que los pacientes que carecían de título de IgG3 al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que sí tenían título detectable ($p = 0,350$). Sin embargo y de la misma manera que con IgG1, dentro de los pacientes que desarrollaron FR, aquellos que carecían al ingreso de respuesta IgG3 tenían más riesgo de fallecer que los que sí tenían esta respuesta (OR: 2,64 (IC 95%: 1,11 – 6,28); $p = 0,028$).

No se observaron diferencias significativas entre grupos clínicos en lo que a título de IgG3 se refiere, aunque sí se apreció la tendencia de que el grupo de supervivientes al FR tenía unos títulos más elevados que el resto.

Título de IgG4 y severidad

Solamente 6 pacientes de la cohorte total (3,75% (6/160)) tuvieron respuesta IgG4 detectable, con unos valores que oscilaron entre 100 y 3.200. 3 de ellos fallecieron, 1 recibió oxigenoterapia y 2 no recibieron oxigenoterapia. De los 154 pacientes con título de IgG4 por debajo del límite de detección, 37 pertenecían al grupo de FR y exitus, 40 al grupo de FR y supervivencia, 39 al grupo que recibió oxigenoterapia y 38 al grupo que no recibió oxigenoterapia. No se probó que los pacientes que carecían de título de IgG4 al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que sí tenían título detectable ($p = 0,170$).

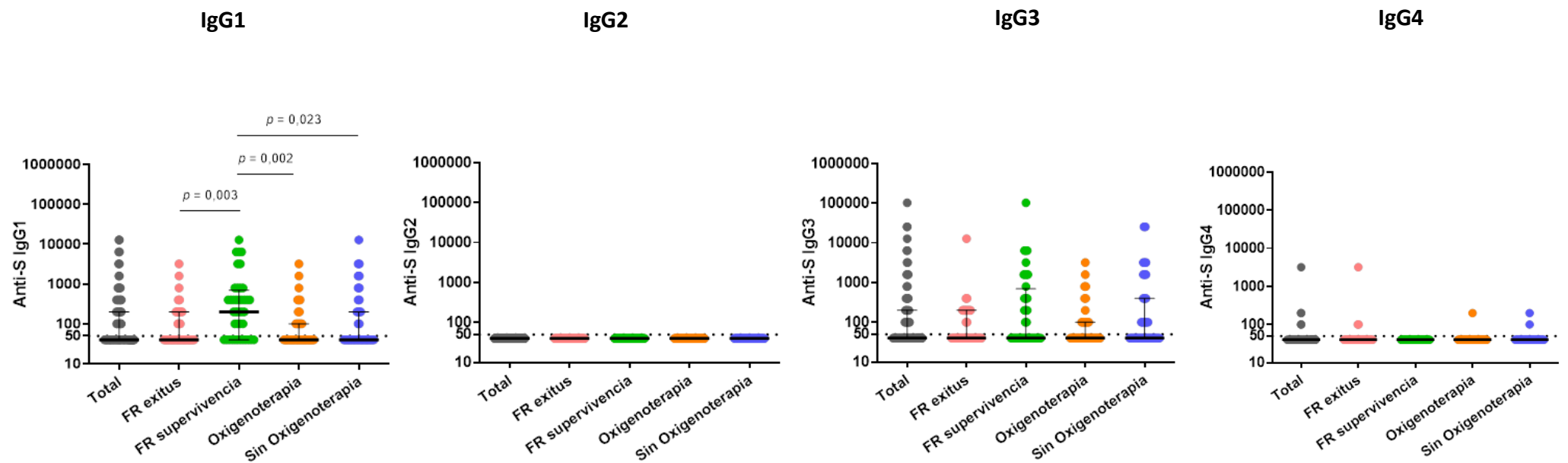
Debido al escaso número de pacientes con reactividad frente a IgG4, no se pudieron apreciar diferencias significativas entre grupos clínicos.

Combinación respuesta IgG1/IgG3

En cuanto a la reactividad combinada de IgG1 e IgG3, únicamente el 30,6% (49/160) de los pacientes de la cohorte total tenían un título detectable para ambas subclases de IgG. De los 111 pacientes sin reactividad combinada IgG1/IgG3, 31 eran pacientes fallecidos por FR, 22 supervivientes al FR, 29 pacientes que recibieron oxigenoterapia y 29 que no la recibieron. No se demostró que el no tener reactividad combinada a las subclases IgG1 e IgG3 al ingreso aumentase el riesgo de fallecimiento en la cohorte total ($p = 0,201$). No obstante, dentro de los pacientes que desarrollaron FR, aquellos que no tenían una respuesta conjunta de IgG1 e IgG3 tenían más riesgo de fallecer que los que tenían respuesta conjunta (OR: 2,82 (IC 95%: 1,07 – 7,43); $p = 0,036$). Los títulos de las subclases de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos se representan en la Figura 14.

RESULTADOS

Figura 14. Títulos de anticuerpos de subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19 de la cohorte total. La cohorte total se representa con círculos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules (n=40). El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.



4.2.2.4 Título de anticuerpos neutralizantes y severidad

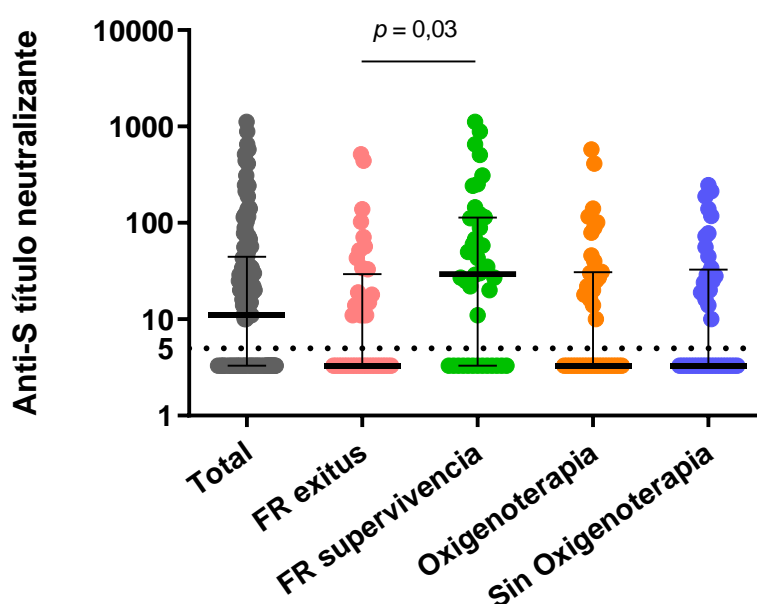
Título de anticuerpos neutralizantes y severidad

La mediana del título de anticuerpos neutralizantes de la cohorte total fue de 11 (3,3 – 44,5) con unos valores que oscilaron entre 3,3 y 1.115 y un 51,9% (83/160) de pacientes con títulos neutralizantes por encima del límite de detección (más de 5). De los 77 pacientes con título neutralizante por debajo del límite de detección, 22 de ellos pertenecían al grupo de FR y exitus, 13 al grupo de FR y supervivencia, 21 al grupo que recibió oxigenoterapia y 21 al grupo que no recibió oxigenoterapia. No se probó que los pacientes que carecían de título neutralizante al ingreso tuviesen más riesgo de fallecer que los que si tenían título detectable ($p = 0,316$). Sin embargo, dentro de los pacientes que desarrollaron FR, aquellos que no tenían actividad neutralizante tenían más riesgo de fallecer que los que si desarrollaban actividad neutralizante (OR: 2,54 (IC 95%: 1,02 – 6,30); $p = 0,045$).

Los pacientes con FR que fallecieron tenían el nivel más bajo de anticuerpos neutralizantes, que era significativamente menor en comparación con los pacientes que desarrollaban FR pero sobrevivían (3,3 (3,3 – 29,5) vs 29,5 (3,3 – 113,5), respectivamente; $p = 0,03$). Los títulos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos se representan en la Figura 15.

RESULTADOS

Figura 15. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los diferentes grupos clínicos COVID-19. La cohorte total se representa con puntos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus como círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia como círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia como círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia como círculos azules (n=40). El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 10. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.



4.2.3 Correlación entre la respuesta de anticuerpos IgM, IgG, subclases de IgG y la actividad neutralizante, total y por grado de severidad

Se evaluó la correlación entre los títulos de IgM, IgG total, IgG1 e IgG3 con los títulos de anticuerpos neutralizantes en la cohorte total y en cada grupo de la enfermedad (Figura 16), y en todos los casos se encontró una correlación positiva y significativa. Sin embargo, se observaron diferencias en el coeficiente de correlación Rho de Spearman (ρ).

Considerando la totalidad de la cohorte, la mayor correlación fue la observada entre los títulos de IgM y los de anticuerpos neutralizantes con una ρ de 0,68. La correlación de los títulos de IgG total y anticuerpos neutralizantes fue ligeramente inferior con una ρ de 0,65, y dentro de las subclases de IgG, la IgG1 fue la que mostró mayor correlación

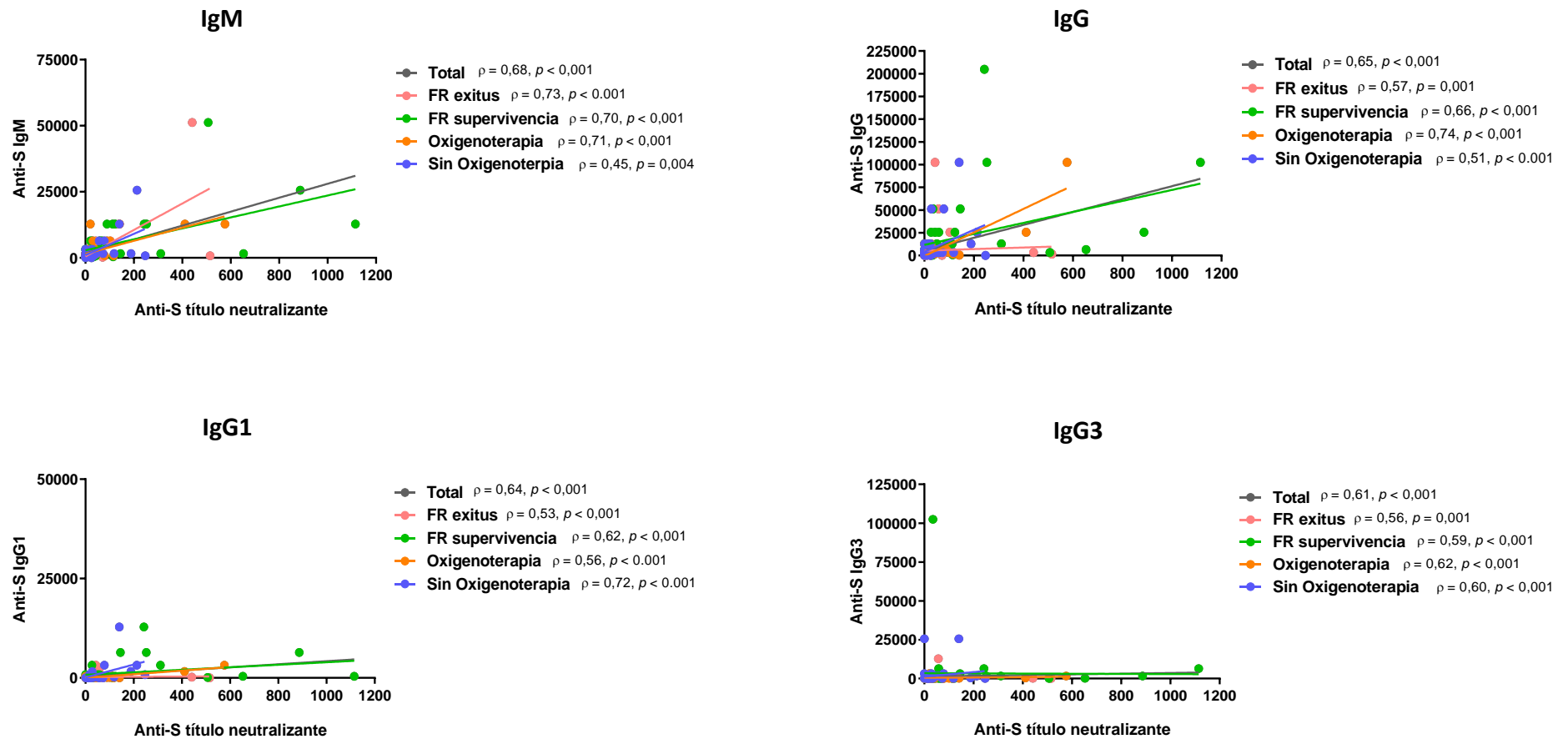
RESULTADOS

con el título de anticuerpos neutralizantes con una ρ de 0,64. Para IgG3 y anticuerpos neutralizantes, la correlación de los títulos estaba en una ρ de 0,61.

Analizando por grupos clínicos, el mayor coeficiente entre los títulos de anticuerpos IgM y neutralizantes se encontró en el grupo de fallecidos tras FR ($\rho = 0,73$). Por el contrario, el mayor coeficiente de correlación entre los títulos de IgG total y de anticuerpos neutralizantes se observó en el grupo que requirió oxigenoterapia ($\rho = 0,74$). En lo que respecta a las subclases de IgG, el mayor coeficiente de correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y los títulos de IgG1 se dio en el grupo que no requirió oxigenoterapia ($\rho = 0,72$), mientras que para los títulos de IgG3 se encontró en el grupo que sí requirió oxigenoterapia ($\rho = 0,62$).

RESULTADOS

Figura 16. Correlación entre el título de anticuerpos y el título neutralizante. Los niveles de IgM, IgG, IgG1 e IgG3 fueron representados con círculos respecto al título neutralizante para la cohorte total de pacientes (círculos grises, n = 160) y para los diferentes grupos clínicos: FR exitus (círculos rosas, n = 40), FR supervivencia (círculos verdes, n = 40), oxigenoterapia (círculos naranjas, n = 40) y sin oxigenoterapia (círculos azules, n = 40). El análisis estadístico se realizó usando la correlación de Spearman, se representó en cada grupo el coeficiente del test (ρ) y el p valor



RESULTADOS

4.2.4 Correlación de la respuesta IgM, IgG total, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes con el tiempo transcurrido desde inicio de síntomas hasta extracción de la muestra de suero, total y por grado de severidad

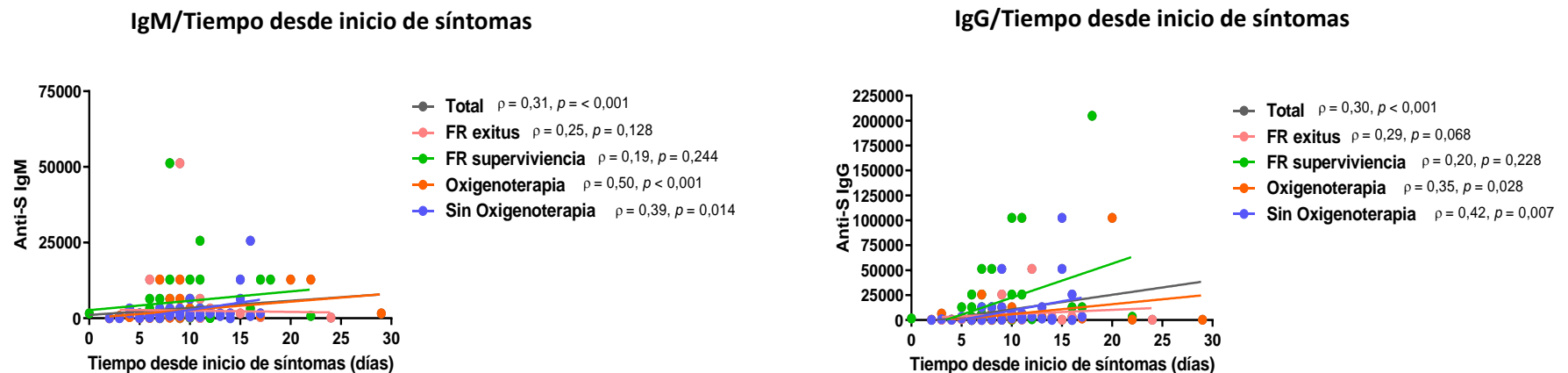
Se analizó la correlación entre la magnitud de los títulos de los isotipos IgM e IgG, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes con los días transcurridos desde el inicio de síntomas a la extracción de la muestra de suero en la cohorte total de pacientes y por grupo clínico (Figura 17).

En la cohorte total se observó una correlación directa y significativa entre los títulos de IgM, IgG, IgG1, IgG3 y anticuerpos neutralizantes con los días desde el inicio de síntomas a la extracción de la muestra de suero [(IgM $\rho = 0,31$; $p < 0,001$), (IgG total $\rho = 0,30$; $p < 0,001$), (IgG1 $\rho = 0,29$; $p < 0,001$), (IgG3 $\rho = 0,29$; $p < 0,001$) y (anticuerpos neutralizantes $\rho = 0,40$; $p < 0,001$), respectivamente].

Al hacer el análisis por grupos clínicos, se observó una correlación directa y significativa entre el título de IgM y los días desde inicio de síntomas a la extracción del suero en los dos grupos clínicos de pacientes que no hicieron FR ($\rho = 0,50$; $p < 0,001$ en pacientes que recibieron oxigenoterapia y $\rho = 0,39$; $p = 0,014$ en pacientes que no la recibieron). También en el caso de la correlación con el título de IgG total, esta era directa y significativa en pacientes que no desarrollaron FR ($\rho = 0,35$; $p = 0,028$ en pacientes que recibieron oxigenoterapia y $\rho = 0,42$; $p = 0,007$ en pacientes que no la recibieron). Dentro de las subclases de IgG, los títulos IgG1 e IgG3 de los pacientes sin FR también tenían correlaciones directas y significativas o casi significativas con los días transcurridos desde el inicio de los síntomas a la extracción de la muestra [(IgG1 $\rho = 0,29$; $p = 0,071$ en pacientes que recibieron oxigenoterapia y $\rho = 0,58$; $p < 0,001$ en pacientes que no la recibieron) e (IgG3 $\rho = 0,34$; $p = 0,032$ en pacientes que recibieron oxigenoterapia y $\rho = 0,51$; $p < 0,001$ en pacientes que no la recibieron)]. Respecto a los anticuerpos neutralizantes, de nuevo los pacientes que no habían desarrollado FR presentaban una correlación directa y significativa de los títulos neutralizantes con los días transcurridos desde el inicio de síntomas ($\rho = 0,41$; $p = 0,009$ en pacientes que recibieron oxigenoterapia y $\rho = 0,67$; $p < 0,001$ en pacientes que no la recibieron) aunque además, se observó curiosamente esta correlación en el grupo de pacientes que fallecieron tras el FR, siendo esta la única excepción ($\rho = 0,45$; $p = 0,003$).

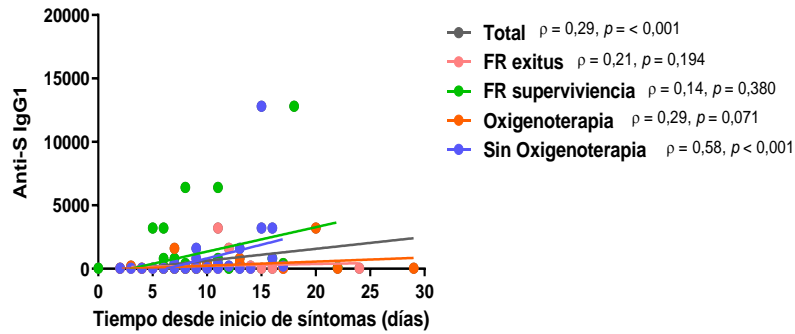
RESULTADOS

Figura 17. Correlación del título de IgM, IgG total, subclases de IgG y anticuerpos neutralizantes con los días transcurridos desde inicio de síntomas hasta extracción de la muestra de suero. Los niveles de IgM, IgG total, IgG1, IgG3 y anticuerpos neutralizantes fueron representados con círculos respecto a los días transcurridos desde el inicio de síntomas para la cohorte total de pacientes (círculos grises, n = 160) y para los diferentes grupos clínicos: FR exitus (círculos rosas, n = 40), FR supervivencia (círculos verdes, n = 40), oxigenoterapia (círculos naranjas, n = 40) y sin oxigenoterapia (círculos azules, n = 40). El análisis estadístico se realizó usando la correlación de Spearman, se representó en cada grupo el coeficiente del test (ρ) y el p valor.

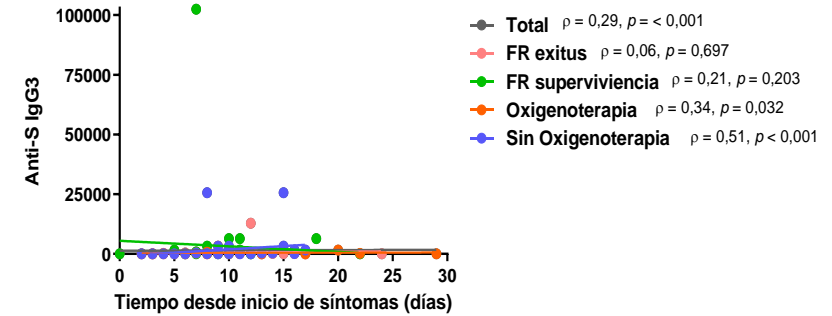


RESULTADOS

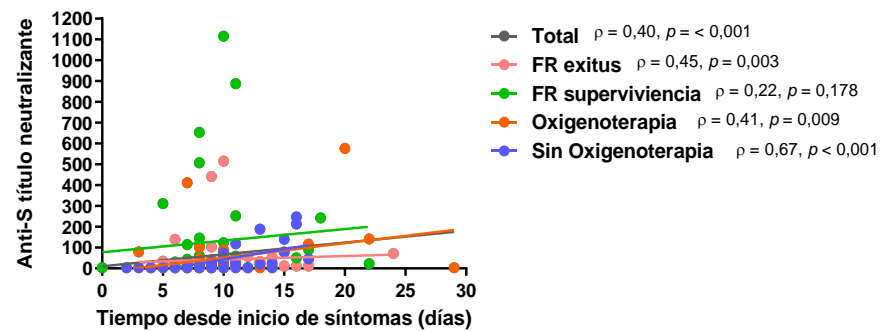
IgG1/Tiempo desde inicio de síntomas



IgG3/Tiempo desde inicio de síntomas



Anticuerpos neutralizantes/Tiempo desde inicio de síntomas



RESULTADOS

4.2.5 Asociación entre variables demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento, respuesta inmune humoral y evolutivas del paciente con la actividad neutralizante frente a la proteína S del SARS-CoV-2

Con el objetivo de explorar cuales eran las características de los pacientes que pudiesen condicionar el título de anticuerpos neutralizantes, en una primera aproximación se estudió la correlación o asociación de las variables cuantitativas y cualitativas con el título de anticuerpos neutralizantes.

En cuanto a las **variables cuantitativas**, se observaron correlaciones significativas con el título de anticuerpos neutralizantes en:

- Saturación de oxígeno ($\rho = -0,20$; $p = 0,013$)
- Recuento de leucocitos ($\rho = 0,35$; $p < 0,001$)
- Recuento de neutrófilos ($\rho = 0,39$; $p < 0,001$)
- Recuento de plaquetas ($\rho = 0,27$; $p = 0,001$)
- PCR ($\rho = 0,33$; $p < 0,001$)
- LDH ($\rho = 0,28$; $p < 0,001$)
- ALT ($\rho = 0,19$; $p = 0,014$)
- Procalcitonina ($\rho = 0,31$; $p = 0,014$)
- Ferritina ($\rho = 0,21$; $p = 0,014$)
- Fibrinógeno ($\rho = 0,41$; $p < 0,001$)
- Dímeros D ($\rho = 0,21$; $p = 0,034$)
- IgM ($\rho = 0,68$; $p < 0,001$)
- IgG ($\rho = 0,65$; $p < 0,001$)
- IgG1 ($\rho = 0,64$; $p < 0,001$)
- IgG3 ($\rho = 0,61$; $p < 0,001$)
- Días inicio síntomas a suero basal ($\rho = 0,40$; $p < 0,001$)
- Días desde inicio de síntomas hasta resultado clínico ($\rho = 0,25$; $p = 0,001$) [hasta alta ($\rho = 0,21$; $p = 0,021$) o hasta exitus ($\rho = 0,29$; $p = 0,071$)]

En cuanto a las **variables cualitativas**, se observaron asociaciones significativas con el título de anticuerpos neutralizantes en:

- Pacientes que recibieron tocilizumab frente a los que no (28 (3,3 – 113,5) vs 3,3 (3,3 – 33,3), respectivamente; $p = 0,012$)

RESULTADOS

- Pacientes con reactividad conjunta IgM e IgG frente a los que no (14 (3,3 – 52) vs 3,3 (3,3 – 3,3), respectivamente; $p = 0,002$)
- Pacientes con reactividad conjunta IgG1 e IgG3 frente a los que no (50 (24,5 – 166,5) vs 3,3 (3,3 – 16), respectivamente; $p < 0,001$)

4.2.5.1 Variables predictoras del título de anticuerpos neutralizantes. Análisis univariante y multivariante

Una vez conocidas las asociaciones individuales de las variables cuantitativas y cualitativas con el título de anticuerpos neutralizantes, se procedió a hacer un análisis univariante mediante regresión lineal, utilizando cada una de las variables que previamente habían mostrado una asociación o correlación significativa con el título neutralizante. Finalmente, se hizo un análisis multivariante mediante regresión lineal múltiple con aquellas variables significativas en el análisis univariante. El resultado fue evidenciar que características del paciente predecían el título de anticuerpos neutralizantes (Tabla 8).

Análisis univariante

Tras regresión lineal, las variables que mostraron una asociación significativa y la capacidad de predicción del título neutralizante (Coeficiente de regresión B) fueron:

- Recuento de leucocitos (B = 15,393 (IC 95%: 7,501 – 23,285); $p < 0,001$)
- Recuento de neutrófilos (B = 16,694 (IC 95%: 8,585 – 24,803); $p < 0,001$)
- Recuento de plaquetas (B = 0,509 (IC 95%: 0,201 – 0,816); $p = 0,001$)
- LDH (B = 0,168 (IC 95%: 0,023 – 0,314); $p = 0,024$)
- Fibrinógeno (B = 0,270 (IC 95%: 0,122 – 0,418); $p < 0,001$)
- Tocilizumab (B = 67,344 (IC 95%: 11,221 – 123,468); $p = 0,019$)
- Días inicio síntomas a suero basal (B = 5,851, (IC 95%: 0,311 – 11,392); $p = 0,039$)
- Días inicio síntomas hasta resultado clínico (B = 2,369 (IC 95%: 0,194 – 4,543); $p = 0,033$)
- IgM (B = 0,013 (IC 95%: 0,010 – 0,016); $p < 0,001$)
- IgG (B = 0,003 (IC 95%: 0,002 – 0,003); $p < 0,001$)
- IgG1 (B = 0,03 (IC 95%: 0,017 – 0,043); $p < 0,001$)
- Reactividad IgG1/IgG3 (B = 125,890 (IC 95%: 78,080 – 173,700); $p < 0,001$)

RESULTADOS

Análisis multivariante

Tras regresión lineal múltiple incluyendo las variables significativas del análisis univariante se concluyó que las características del paciente que mejor predecían el título de anticuerpos neutralizantes fueron el título de IgM y el título de la subclase IgG1, aunque el título de IgG total estuvo cerca de la significación estadística.

La capacidad de predicción del título neutralizante (Coeficiente de regresión B), el intervalo de confianza y la significación estadística fueron:

- IgM (B = 0,012 (IC 95%: 0,008 – 0,015); $p < 0,001$)
- IgG1 (B = 0,040 (IC 95%: 0,014 – 0,066); $p = 0,003$)
- IgG (B = -0,002 (IC 95%: -0,003 – 0,000); $p = 0,054$)

Tabla 8. Características demográficas, clínicas, analíticas, de tratamiento, respuesta inmune humoral y evolutivas del paciente que mejor predijeron el título de anticuerpos neutralizantes. Análisis univariante y multivariante.

Características	Univariante			Multivariante		
	Coeficiente de regresión B	IC 95%	p valor	Coeficiente de regresión B	IC 95%	p valor
Saturación de oxígeno	-2,389	-5,794 – 1,016	0,168			
Leucocitos	15,393	7,501 – 23,285	< 0,001			
Neutrófilos	16,694	8,585 – 24,803	< 0,001			
Plaquetas	0,509	0,201 – 0,816	0,001			
PCR	2,141	-0,210 – 4,492	0,074			
LDH	0,168	0,023 – 0,314	0,024			
ALT	0,628	-0,015 – 1,270	0,056			
Procalcitonina	23,257	-15,791 – 62,305	0,238			
Ferritina	0,001	-0,010 – 0,011	0,889			
Fibrinógeno	0,270	0,122 – 0,418	< 0,001			
Dímeros D	0,000	-0,002 – 0,002	0,787			
Tocilizumab	67,344	11,221 – 123,468	0,019			
Días inicio síntomas hasta suero basal	5,851	0,311 – 11,392	0,039			
Días inicio síntomas hasta resultado clínico	2,369	0,194 – 4,543	0,033			
IgM	0,013	0,010 – 0,016	< 0,001	0,012	0,008 – 0,015	< 0,001
IgG	0,003	0,002 – 0,003	< 0,001	-0,002	-0,003 – 0,000	0,054
IgG1	0,03	0,017 – 0,043	< 0,001	0,040	0,014 – 0,066	0,003
IgG3	0,001	-0,002 – 0,003	0,609			
Reactividad IgM/IgG	65,091	-21,598 – 151,779	0,140			
Reactividad IgG1/IgG3	125,890	78,080 – 173,700	< 0,001			

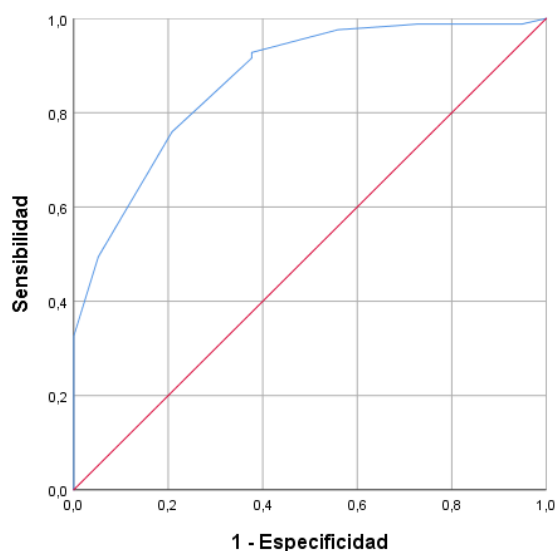
RESULTADOS

4.2.5.2 Puntos de corte de variables predictoras para conocer actividad neutralizante

Una vez conocidas las variables que mejor predecían el título de anticuerpos neutralizantes, se pretendió buscar un punto de corte del título de IgM e IgG1 capaz de predecir la presencia o no de actividad neutralizante en el suero del paciente al ingreso. Se calculó el área bajo la curva ROC y la sensibilidad y la especificidad máximas para cada uno de esos puntos de corte. También se calculó para el título de IgG, ya que había quedado cerca de la significación estadística. (Ver [Anexo I. Material suplementario. 8.3 Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM, IgG y subclases de IgG para predecir la actividad neutralizante del suero con su sensibilidad y especificidad](#)).

IgM

Para un título de IgM superior a 1.200 se predijo la actividad neutralizante con un AUC: 0,869 (IC 95%: 0,815 – 0,923); $p < 0,001$). Para ese punto de corte la sensibilidad alcanzada era de un 76% mientras que la especificidad fue de un 79% para detectar la actividad neutralizante del suero. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S1](#)).

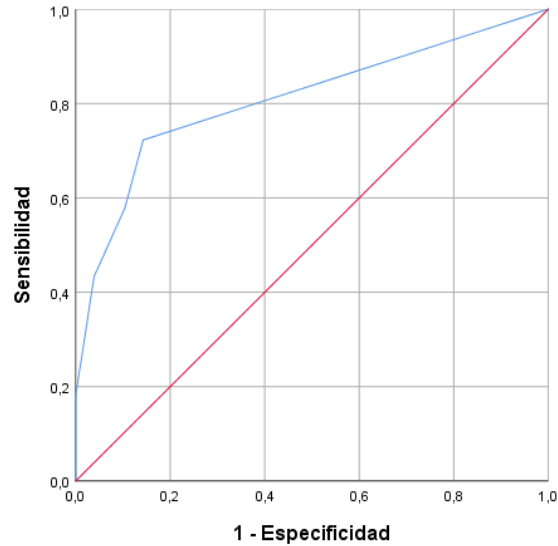


ROC AUC (IC 95%) = 0,869 (0,815-0,923)

IgG1

Para un título de IgG1 superior a 70 se predijo la actividad neutralizante con un AUC: 0,809 (IC 95%: 0,740 – 0,877); $p < 0,001$). Para ese punto de corte la sensibilidad alcanzada era de un 72% mientras que la especificidad fue de un 86% para detectar la actividad neutralizante del suero. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S2](#)).

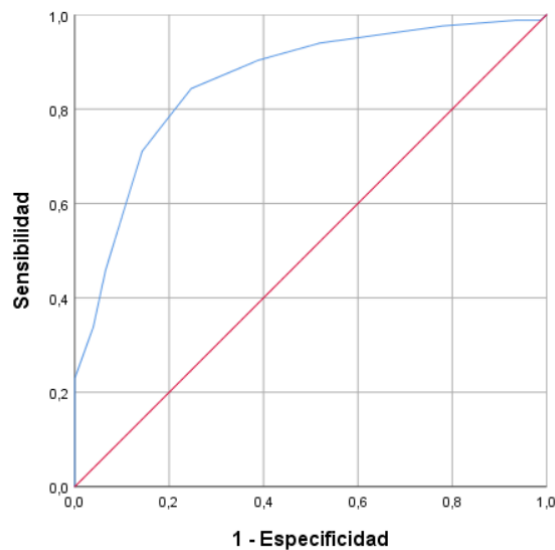
RESULTADOS



ROC AUC (IC 95%) = 0,809 (0,740-0,877)

IgG

Para un título de IgG superior a 1.200 se predijo la actividad neutralizante con un AUC: 0,858 (IC 95%: 0,800 – 0,917); $p < 0,001$. Para ese punto de corte la sensibilidad alcanzada era de un 84% mientras que la especificidad fue de un 75% para detectar la actividad neutralizante del suero. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S3](#)).



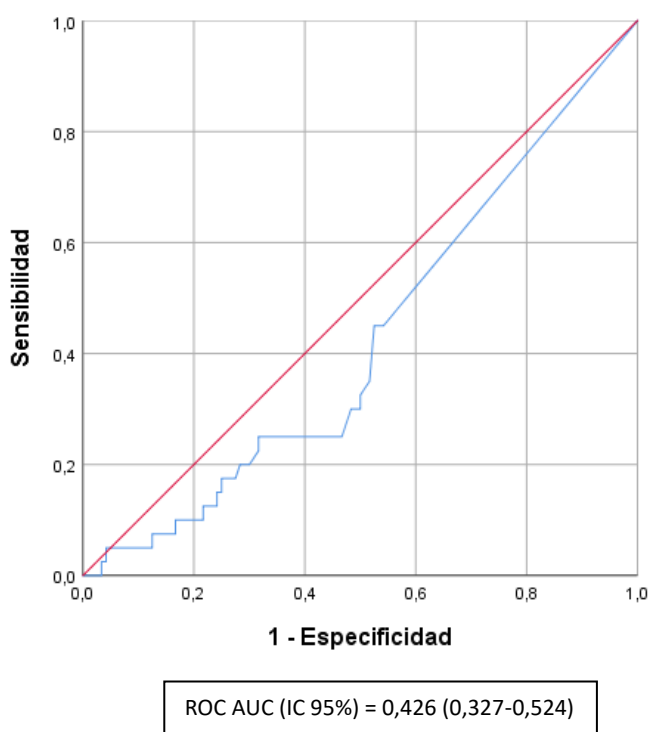
ROC AUC (IC 95%) = 0,858 (0,800-0,917)

RESULTADOS

4.2.6 Identificación de puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad

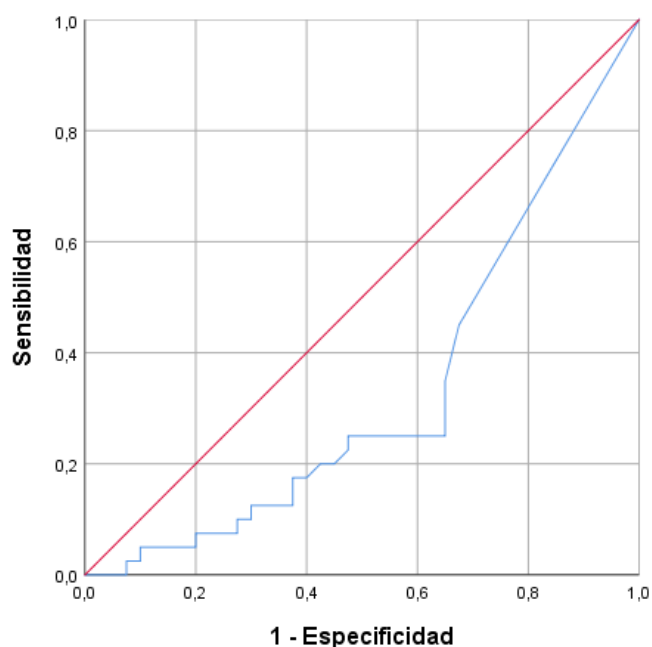
Con el objeto de predecir la mortalidad de un paciente a través del nivel de anticuerpos neutralizantes en suero al ingreso, se calculó el área bajo la curva ROC para conocer un punto de corte y su capacidad de predicción. Fue realizado sobre la cohorte total de infectados y entre aquellos pacientes que desarrollaron FR, supervivientes y fallecidos. (Ver [Anexo I. Material suplementario. 8.4 Puntos de corte de las curvas ROC del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con su sensibilidad y especificidad](#)).

Analizando la cohorte total, la capacidad de predicción de mortalidad a través del título de anticuerpos neutralizantes fue AUC: 0,426 (IC 95%: 0,327 – 0,524); $p = 0,159$), siendo no estadísticamente significativo y con unos valores de sensibilidad y especificidad muy bajos o extremos, independientemente del punto de corte empleado. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S4](#)).



Al centrar el estudio sobre los pacientes que desarrollaron FR, la capacidad predictora de mortalidad empleando el título de anticuerpos neutralizantes fue AUC: 0,332 (IC 95%: 0,212 – 0,452); $p = 0,010$), siendo estadísticamente significativo, pero con unos valores de sensibilidad y especificidad muy bajos o extremos, independientemente del punto de corte empleado. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S5](#)).

RESULTADOS



ROC AUC (IC 95%) = 0,332 (0,212-0,452)

4.3 Bloque 2: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en sujetos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech) (Cohorte de estudio 2). Comparación de las respuestas entre las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos

4.3.1 Características demográficas, clínicas, relacionadas con el trasplante y con el tratamiento inmunosupresor en las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech)

Las características de las dos subcohortes (TOS e inmunocompetentes sanos inmunizados con la vacuna ARNm-1273) de la Cohorte de estudio 2 se muestran en la Tabla 9.

Subcohorte de TOS inmunizados:

Todos los TOS excepto dos pacientes, recibieron dos dosis de la vacuna (95,4%; 41/43). Un paciente trasplantado renal se negó a recibir la segunda dosis por unas molestias gastrointestinales y otro, trasplantado hepático, fue hospitalizado debido a una infección moderada por SARS-CoV-2 tres semanas después de recibir la primera dosis de la vacuna, posponiéndose la segunda dosis hasta la resolución de los síntomas y por tanto desajustándose de la pauta de 4 semanas (28 días) desde primera y segunda dosis

RESULTADOS

que tenían el resto de TOS. Sólo un receptor de TOS tenía COVID-19 diagnosticado hace 6 meses.

1. Características demográficas, clínicas y relacionadas con el trasplante

La edad media de la subcohorte de trasplantados fue de $52,2 \pm 11,5$ años, con un 62,8 % (27/43) de varones y un 86 % (37/43) de raza caucásica. La mediana de tiempo desde el trasplante fue de 2,3 (1,3-4,8) años. Las comorbilidades más frecuentes fueron hipertensión 74,4 % (32/43), enfermedad cardiovascular 32,6 % (14/43), diabetes 25,6 % (11/43) y dislipemia 25,6 % (11/43).

En cuanto al tipo de trasplante, los receptores de riñón tenían mayor edad, y mayor porcentaje de varones y de raza caucásica en comparación con los receptores de hígado, pero no se observaron diferencias significativas (53,7 años vs 49,1 años ($p = 0,221$), 65,5 % vs 57,1 % ($p = 0,594$) y 86,2 % vs 85,7 % ($p = 0,965$), respectivamente). No obstante, si se observaron diferencias significativas entre los años transcurridos desde el trasplante, siendo los receptores renales los que tenían menos años de trasplante comparado con los receptores hepáticos (2 (1-3,3) años vs 4,3 (1,3-23,3) años, respectivamente; $p = 0,031$). Además, los receptores de trasplante renal tenían más hipertensión y dislipemia que los receptores de trasplante hepático (96,6 % vs 28,6 % ($p < 0,001$) y 37,9 % vs 0 % ($p = 0,008$), respectivamente). Únicamente, los receptores hepáticos tenían más neoplasia que los receptores renales (14,3 % vs 0 %, respectivamente; $p = 0,037$).

2. Tratamiento inmunosupresor

En cuanto al régimen de inmunosupresión, la combinación triple de tacrolimus, micofenolato de mofetilo o micofenolato sódico y prednisona fue la combinación farmacológica más frecuente 53,5 % (23/43). Los trasplantados hepáticos recibieron más tacrolimus en monoterapia que los trasplantados renales (28,6 % vs 0 %, respectivamente; $p = 0,003$) y los trasplantados renales recibieron más combinación triple de tacrolimus, micofenolato mofetilo o micofenolato sódico y prednisona que los trasplantados hepáticos, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellos (65,5 % vs 35,7 %; $p = 0,065$).

Subcohorte de inmunocompetentes sanos inmunizados:

Todos los participantes del grupo control de inmunocompetentes sanos recibieron dos dosis de vacuna. Ninguno de los sujetos seleccionados tenía comorbilidades significativas ni sospecha o documentación previa de COVID-19 (Tabla 9).

1. Características demográficas

La edad media de la subcohorte de inmunocompetentes sanos fue de $40,2 \pm 10,1$ años con un 36,4% (12/33) de hombres y un 100% (33/33) de etnia caucásica. La subcohorte inmunocompetente era más joven, caucásica y femenina que la subcohorte de pacientes con TOS ($p < 0,001$, $p = 0,03$ y $p = 0,022$, respectivamente).

RESULTADOS

Tabla 9. Características demográficas, clínicas y de tratamiento inmunosupresor en la subcohorte de TOS y en la subcohorte de inmunocompetentes sanos.

Características	Subcohorte TOS (n=43)	Renales (n=29)	Hepáticos (n=14)	Subcohorte inmunocompetentes (n=33)	P valor
Edad (años), media ± SD	52,2 ± 11,5	53,7 ± 12	49,1 ± 10,2	40,2 ± 10,1	<0,001 ^e
Sexo, masculino, n°. (%)	27 (62,8)	19 (65,5)	8 (57,1)	12 (36,4)	0,022 ^e
Raza, n°. (%)					0,03 ^e
Caucásica	37 (86)	25 (86,2)	12 (85,7)	33 (100)	
Latino americana	3 (7)	2 (6,9)	1 (7,1)	0 (0)	
Otras	3 (7)	2 (6,9)	1 (7,1)	0 (0)	
Comorbilidades, n°. (%)					
Hipertensión	32 (74,4)	28 (96,6)	4 (28,6)		<0,001 ^f
Enfermedad cardiovascular	14 (32,6)	11 (37,9)	3 (21,4)		0,279 ^f
Evento tromboembólico	7 (16,3)	5 (17,2)	2 (14,3)		0,806 ^f
Neumopatía crónica	4 (9,3)	3 (10,3)	1 (7,1)		0,735 ^f
Diabetes	11 (25,6)	9 (31)	2 (14,3)		0,238 ^f
Dislipidemia	11 (25,6)	11 (37,9)	0 (0)		0,008 ^f
Obesidad	6 (14)	5 (17,2)	1 (7,1)		0,371 ^f
Tabaquismo	7 (16,3)	5 (17,2)	2 (14,3)		0,806 ^f
Neoplasia	2 (4,7)	0 (0)	2 (14,3)		0,037 ^f
Enfermedad reumatológica	2 (4,7)	2 (6,9)	0 (0)		0,314 ^f
Tipo de trasplante, n°. (%)					
Renal	29 (67,4)				
Hepático	14 (32,6)				
Tiempo desde el trasplante (años), mediana (IQR)	2,3 (1,3-4,8)	2 (1-3,3)	4,3 (1,3-23,3)		0,031 ^f
Tipo de regimen inmunosupresor, n°. (%) ^a					
Tacrolimus, MMF/MPS y prednisona	24 (55,8)	19 (65,5)	5 (35,7)		0,065 ^f
Tacrolimus and MMF/MPS	5 (11,6)	2 (6,9)	3 (21,4)		0,164 ^f
Tacrolimus en monoterapia	4 (9,3)	0 (0)	4 (28,6)		0,003 ^f

RESULTADOS

Tacrolimus, prednisona e inhibidor de mTOR	4 (9,3)	4 (13,8)	0 (0)	0,145 ^f
Otros ^{b, c, d}	6 (14) ^b	4 (13,8) ^c	2 (14,3) ^d	0,965 ^f

IQR: rango intercuartílico; MMF/MPS: micofenolato de mofetilo o micofenolato sódico; MPA: Ácido micofenólico; mTOR: diana de la rapamicina en mamíferos; SD: desviación estándar.

^a En el momento de la administración de la primera dosis de la vacuna mRNA-1273.

^b Ciclosporina y MMF (n = 1); Ciclosporina, MMF y prednisona (n = 1); MPA y everolimus (n=1); Prednisona y everolimus (n=1); MPA, prednisona y everolimus (n = 1); Prednisona y tacrolimus (n=1).

^c Ciclosporina, MMF and prednisona (n = 1); Prednisona y everolimus (n=1); MPA, prednisona y everolimus (n = 1); Prednisona y tacrolimus (n=1).

^d Ciclosporina y MMF (n = 1); MPA y everolimus (n=1).

^e Comparación entre TOS e inmunocompetentes sanos.

^f Comparación entre tipos de TOS.

4.3.2 Magnitud de la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes

4.3.2.1 Título de IgM por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes

Respuesta cualitativa

Se detectaron títulos de IgM en suero basal por encima del límite de detección (más de 50) en el 74,4% (32/43) de los receptores de trasplante y en el 93,9% (31/33) de las personas inmunocompetentes, siendo el porcentaje significativamente más bajo en trasplantados que en las personas inmunocompetentes ($p = 0,025$). Tras la primera dosis, se detectó una respuesta IgM en el 61,9% (26/42) de los receptores de trasplante y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, con una diferencia significativa ($p < 0,001$). Después de la segunda dosis, se detectó la respuesta IgM en el 82,9% (34/41) de los receptores de trasplante y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, también con una diferencia significativa ($p = 0,013$).

Según el tipo de trasplante, en la muestra de suero basal se identificó una respuesta IgM en el 65,5% (19/29) de los trasplantados renales frente al 92,6% (13/14) de los hepáticos, no habiendo diferencia significativa entre ambos, aunque cerca de la significación ($p = 0,054$). En el suero tras primera dosis el 55,2% (16/29) de los trasplantados renales tenían respuesta IgM frente al 76,9% (10/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrarse diferencia significativa ($p = 0,180$). Tras segunda dosis, la respuesta IgM se identificó en el 78,6% (22/28) de los trasplantados renales y en el 92,3% (12/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrar de nuevo diferencias significativas entre ambos tipos de trasplante ($p = 0,277$).

Respuesta cuantitativa

Las diferencias entre títulos de IgM por dosis de vacuna y según las subcohortes analizadas se representan en la Figura 18.

RESULTADOS

En los receptores de TOS, la primera dosis de la vacuna no produjo un aumento significativo de los títulos de IgM en comparación con los niveles del suero basal (100 (40 - 400) vs 100 (40 - 200), respectivamente; $p = 1,000$), mientras que la segunda dosis sí produjo este aumento de los títulos de IgM (400 (150 - 800)) en comparación con los de la primera dosis (100 (40 - 400); $p = 0,002$) y los del suero basal (100 (40 - 200); $p < 0,001$). También se analizaron los títulos de IgM en función del tipo de trasplante. En los receptores de riñón, los niveles de IgM fueron más altos después de la segunda dosis (200 (100 - 400) que en la muestra basal (100 (40 - 200); $p = 0,023$) y en la primera dosis (100 (40 - 200); $p = 0,005$), mientras que los pacientes con trasplante de hígado sólo tuvieron un aumento significativo del título de IgM después de la segunda dosis (800 (400 - 800)) en comparación con el suero basal (200 (100 - 300); $p = 0,032$).

El grupo inmunocompetente también mostró un aumento significativo de los títulos de IgM después de la segunda dosis (1.600 (400 - 1.600)) en comparación con la primera dosis (400 (400 - 1.200); $p < 0,001$) y con la muestra basal (200 (100 - 400); $p < 0,001$), pero no se detectaron diferencias significativas en los títulos entre la primera (400 (400 - 1.200) y la segunda dosis (1.600 (400 - 1600); $p = 0,109$).

Haciendo la comparativa de títulos de IgM entre las dos subcohortes de TOS e inmunocompetentes, se observó que los inmunocompetentes tenían un título significativamente más elevado que los TOS tanto en la muestra basal (200 (100 - 400) vs 100 (40 - 200), respectivamente; $p = 0,022$), como tras primera dosis (400 (400 - 1200) vs 100 (40 - 400), respectivamente; $p < 0,001$) y como tras segunda dosis (1600 (400 - 1600) vs 400 (150 - 800), respectivamente; $p < 0,001$).

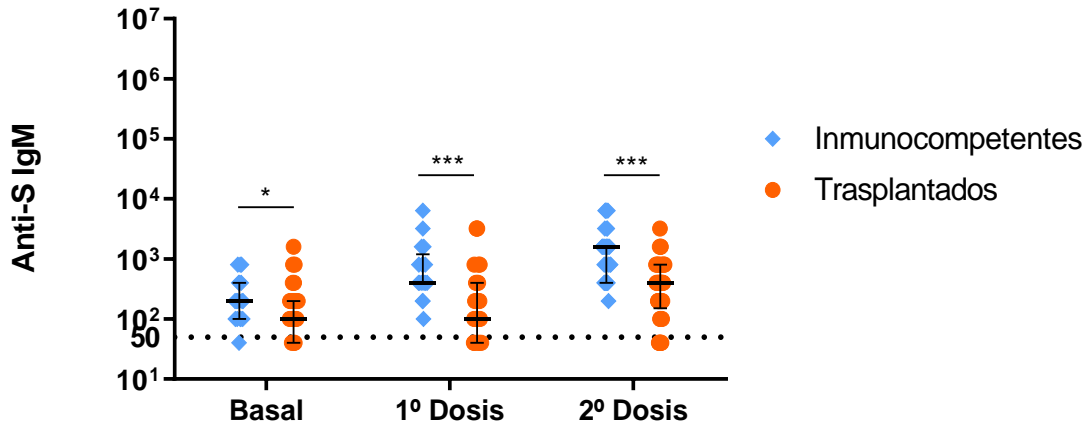
Subanalizando por el tipo de trasplante, los títulos de IgM después de la primera dosis fueron significativamente menores en los receptores de trasplante renal en comparación con los receptores de trasplante hepático ((100 (40 - 200) vs 400 (70 - 800), respectivamente; $p = 0,035$). Igualmente, tras segunda dosis los títulos de IgM fueron significativamente menores en los receptores de trasplante renal en comparación con los receptores de trasplante hepático (200 (100 - 400) vs 800 (400 - 800), respectivamente; $p = 0,016$).

Figura 18. Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna. Se determinaron los títulos de IgM en la subcohorte de inmunocompetentes, representados como rombos azules ($n = 33$) y se compararon con los de la subcohorte de pacientes trasplantados, representados como círculos naranjas ($n = 43$) (panel A). También se compararon con cada tipo de trasplante (panel B): trasplante de riñón, representado con círculos verdes ($n = 29$) y trasplante de hígado, representado con triángulos rojos ($n = 14$) en el suero basal y después de la primera y segunda dosis de la vacuna. El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar entre grupos en cada dosis de vacuna, y el test de Friedman para comparar entre dosis de vacuna, ambos tests seguidos de la prueba de comparaciones

RESULTADOS

múltiples de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica. Las comparaciones por pares entre las dosis se representan en tablas debajo de cada figura por grupo de sujetos.

A



* $p = 0,022$ y *** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en inmunocompetentes (valor p)

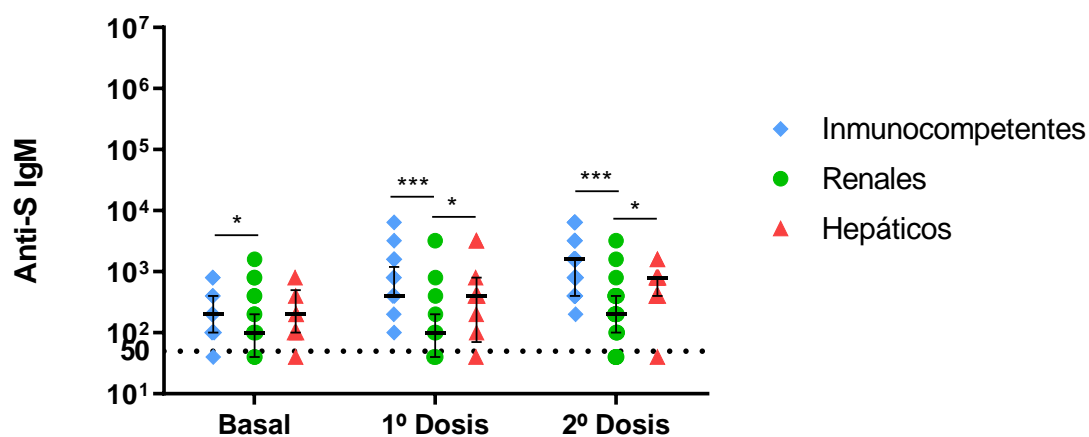
	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.109	< 0.001
1º Dosis	0.109	1.000	< 0.001
2º Dosis	< 0.001	< 0.001	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	1.000	< 0.001
1º Dosis	1.000	1.000	0.002
2º Dosis	< 0.001	0.002	1.000

RESULTADOS

B



Basal: * $p = 0,009$. 1º Dosis: * $p = 0,035$ y *** $p < 0,001$. 2º Dosis: * $p = 0,016$ y *** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en trasplantados renales (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	1.000	0.023
1º Dosis	1.000	1.000	0.005
2º Dosis	0.023	0.005	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados hepáticos (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.980	0.032
1º Dosis	0.980	1.000	0.350
2º Dosis	0.032	0.350	1.000

RESULTADOS

4.3.2.2 Título de IgG por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes. Combinación respuesta IgM/IgG

Respuesta cualitativa

Se detectó una respuesta IgG en suero basal por encima del límite de detección (más de 50) en el 79,1% (34/43) de los receptores de trasplante y en el 81,8% (27/33) de las personas inmunocompetentes, sin que hubiese diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,765$). Tras la primera dosis, se evidenció la respuesta IgG en el 88,1% (37/42) de los receptores de trasplante y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, con una diferencia significativa ($p = 0,040$). Después de la segunda dosis, la respuesta IgG se detectó en el 95,1% (39/41) de los receptores de trasplante y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, sin existir una diferencia significativa ($p = 0,198$).

Según el tipo de trasplante, en la muestra de suero basal se identificó una respuesta IgG en el 75,9% (22/29) de los trasplantados renales frente al 85,7% (12/14) de los hepáticos, no habiendo diferencia significativa entre ambos ($p = 0,457$). En el suero tras primera dosis el 86,2% (25/29) de los trasplantados renales tenían respuesta IgG frente al 92,3% (12/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrarse diferencia significativa ($p = 0,573$). Tras segunda dosis, la respuesta IgG se identificó en el 92,9% (26/28) de los trasplantados renales y en el 100% (13/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrar de nuevo diferencias significativas entre ambos tipos de trasplante ($p = 0,323$).

Respuesta cuantitativa

Las diferencias entre títulos de IgG por dosis de vacuna y según las subcohortes analizadas se representan en la Figura 19.

Dentro de los receptores de TOS, la primera dosis de la vacuna no produjo un aumento significativo de los títulos de IgG en comparación con los niveles iniciales (200 (100 – 3.200) vs 100 (100 – 200), respectivamente; $p = 0,082$), mientras que la segunda dosis sí produjo este aumento de los títulos de IgG (3.200 (200 – 51.200)) en comparación con los de la primera dosis (200 (100 - 3200); $p = 0,001$) y los de la muestra inicial (100 (100 – 200); $p < 0,001$). Analizando en función del tipo de trasplante, en los receptores renales los niveles de IgG fueron más altos después de la segunda dosis (600 (200 – 11.200) que en la muestra basal (100 (55 - 200); $p < 0,001$) y que en la primera dosis (200 (100 - 1300); $p = 0,033$). Igualmente, en los receptores hepáticos el título de IgG fue significativamente mayor tras la segunda dosis (51.200 (3.200 – 153.600)) en comparación con la muestra basal (200 (100 - 900); $p < 0,001$) y con la primera dosis (3.200 (200 – 12.800); $p = 0,032$).

En el grupo de inmunocompetentes todas las dosis de la vacuna generaron un título de IgG significativamente superior al de la dosis anterior. De tal manera que los niveles de IgG tras la primera dosis (25.600 (6.400 – 38.400)) fueron superiores a los del suero basal (200 (100 – 300); $p < 0,001$) y los de la segunda dosis (204.800 (102.400 – 204.800)) superiores a los de la primera dosis (25.600 (6.400 – 38.400); $p < 0,001$). Además, hay

RESULTADOS

que añadir que el título de IgG tras la segunda dosis fue significativamente mayor al del suero inicial (204.800 (102.400 – 204.800) vs 200 (100 – 300), respectivamente; $p < 0,001$).

Al realizar la comparación del título de IgG entre las subcohortes de trasplante e inmunocompetentes, se evidenció que los inmunocompetentes tenían un título significativamente más elevado que los trasplantados, pero solamente tras la primera dosis (25.600 (6.400 – 38.400) vs (200 (100 – 3.200), respectivamente; $p < 0,001$) y tras la segunda dosis (204.800 (102.400 – 204.800) vs 3.200 (200 – 51.200), respectivamente; $p < 0,001$).

Según el tipo de trasplante, tras la primera dosis no hubo diferencias significativas en el título de IgG entre ambos tipos de trasplante (3.200 (200 – 12.800) en hepáticos vs 200 (100 – 1.000) en renales; $p = 0,144$), sin embargo, tras la segunda dosis sí que se pudo observar que los receptores de trasplante hepático tenían un título significativamente más elevado que el que mostraron los receptores renales (51.200 (3.200 – 153.600) vs 600 (200 – 11.200), respectivamente; $p = 0,042$).

Combinación respuesta IgM/IgG

Se identificó una respuesta combinada de IgM e IgG en suero basal en el 65,1% (28/43) de los trasplantados y en el 75,8% (25/33) de los sujetos inmunocompetentes, sin diferencias entre ambas subcohortes ($p = 0,317$). Tras la primera dosis, se detectó la respuesta combinada en el 54,8% (23/42) de los trasplantados y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, habiendo una diferencia significativa ($p < 0,001$). Después de la segunda dosis, la respuesta combinada se identificó en el 80,5% (33/41) de los trasplantados y en el 100% (33/33) de los inmunocompetentes, con diferencia significativa entre ambas subcohortes ($p = 0,007$).

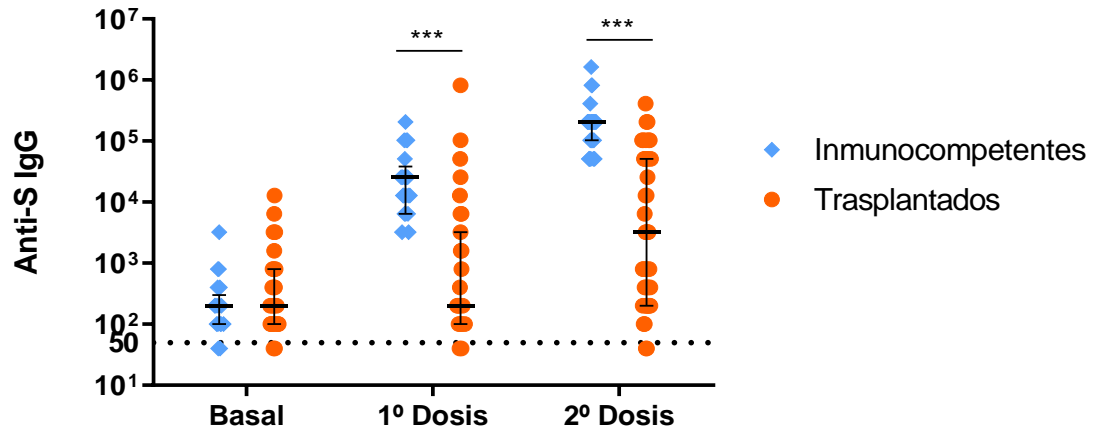
Estudiando la respuesta combinada entre los tipos de trasplante, se observó que en el suero basal el 58,6% (17/29) de los trasplantados renales presentaron respuesta combinada frente al 78,6% (11/14) de los trasplantados hepáticos, sin diferencia significativa ($p = 0,198$). En el suero tras primera dosis el 48,3% (14/29) de los trasplantados renales tenían respuesta combinada frente al 69,2% (9/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrarse diferencia significativa ($p = 0,207$). Tras segunda dosis, la respuesta combinada se identificó en el 75% (21/28) de los trasplantados renales y en el 92,3% (12/13) de los trasplantados hepáticos, sin encontrar de nuevo diferencias significativas entre ambos tipos de trasplante ($p = 0,193$).

RESULTADOS

Figura 19. Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna. Se determinaron los títulos de IgG en la subcohorta de inmunocompetentes, representados como rombos azules (n = 33) y se compararon con los de la subcohorta de pacientes trasplantados, representados como círculos naranjas (n = 43) (panel A). También se compararon con cada tipo de trasplante (panel B): trasplante de riñón, representado con círculos verdes (n = 29) y trasplante de hígado, representado con triángulos rojos (n = 14) en el suero basal y después de la primera y segunda dosis de la vacuna. El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar entre grupos en cada dosis de vacuna, y el test de Friedman para comparar entre dosis de vacuna, ambos test seguidos de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica. Las comparaciones por pares entre las dosis se representan en tablas debajo de cada figura por grupo de sujetos.

RESULTADOS

A



*** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en inmunocompetentes (valor p)

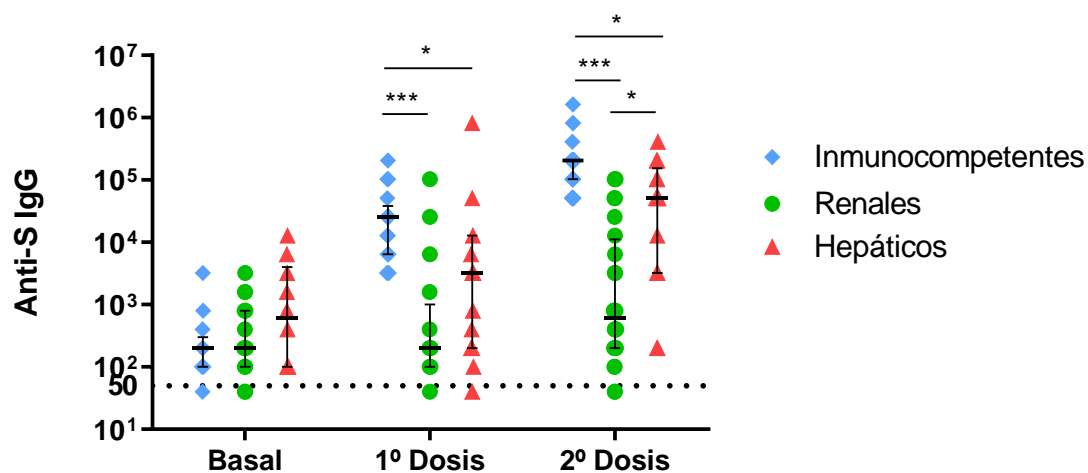
	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	< 0.001	< 0.001
1º Dosis	< 0.001	1.000	< 0.001
2º Dosis	< 0.001	< 0.001	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.082	< 0.001
1º Dosis	0.082	1.000	0.001
2º Dosis	< 0.001	0.001	1.000

RESULTADOS

B



1º Dosis: * $p = 0,025$ y *** $p < 0,001$. 2º Dosis: *_{I-H} $p = 0,030$, *_{R-H} $p = 0,042$ y *** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en trasplantados renales (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.247	< 0.001
1º Dosis	0.247	1.000	0.033
2º Dosis	< 0.001	0.033	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados hepáticos (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.509	< 0.001
1º Dosis	0.509	1.000	0.032
2º Dosis	< 0.001	0.032	1.000

RESULTADOS

4.3.2.3 Título de anticuerpos neutralizantes por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes

Respuesta cualitativa

Se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes en suero por encima del límite de detección (más de 5) en el 2,3% (1/43) de los receptores de trasplante y en ninguno de los sujetos inmunocompetentes (0/33) al inicio del estudio, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,378$). Tras la primera dosis, se detectó una respuesta neutralizante en el 11,9% (5/42) de los receptores de trasplante y en el 45,5% (15/33) de los inmunocompetentes, con una diferencia significativa ($p = 0,001$). Después de la segunda dosis, se detectó la respuesta neutralizante en el 31,7% (13/41) de los receptores de trasplante y en la totalidad (33/33) de los inmunocompetentes, también con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Según el tipo de trasplante, en la muestra de suero basal se identificó una respuesta neutralizante en el 3,4% (1/29) de los trasplantados renales frente a ninguno (0/14) de los hepáticos, no habiendo diferencia significativa entre ambos ($p = 0,482$). En el suero tras primera dosis el 3,4% (1/29) de los trasplantados renales tenían respuesta neutralizante frente al 30,8% (4/13) de los trasplantados hepáticos, existiendo una diferencia significativa entre ellos ($p = 0,011$). Tras segunda dosis, la respuesta neutralizante se identificó en el 21,4% (6/28) de los trasplantados renales y en el 53,8% (7/13) de los trasplantados hepáticos, existiendo también diferencia significativa entre ambos tipos de trasplante ($p = 0,038$).

Respuesta cuantitativa

Las diferencias entre títulos de anticuerpos neutralizantes por dosis de vacuna y según las subcohortes analizadas se representan en la Figura 20.

En los receptores de TOS, la primera dosis de la vacuna no produjo un aumento significativo de los títulos neutralizantes en comparación con los niveles iniciales (3,3 (3,3 – 3,3) vs 3,3 (3,3 – 3,3), respectivamente; $p = 0,978$), por su parte, la segunda dosis tampoco produjo este aumento de los títulos neutralizantes (3,3 (3,3 – 33,8)) en comparación con los de la primera dosis (3,3 (3,3 – 3,3); $p = 0,978$) y los de la muestra inicial (3,3 (3,3 – 3,3); $p = 0,149$). También se analizaron los títulos neutralizantes en función del tipo de trasplante y tampoco se observaron diferencias. En los receptores de riñón, los niveles de anticuerpos neutralizantes no fueron más altos después de la segunda dosis (3,3 (3,3 – 3,3)) que en la muestra basal (3,3 (3,3 – 3,3); $p = 0,768$) y en la primera dosis (3,3 (3,3 – 3,3); $p = 1,000$), tampoco entre la primera dosis y la muestra basal (3,3 (3,3 – 3,3) vs 3,3 (3,3 – 3,3), respectivamente; $p = 1,000$). Por su parte, los pacientes con trasplante de hígado tampoco tuvieron un aumento significativo del título neutralizante después de la segunda dosis (32 (3,3 – 133,5) en comparación con el suero basal (3,3 (3,3 – 3,3); $p = 0,187$) y en la primera dosis (3,3 (3,3 – 35,5); $p = 1,000$), tampoco entre la primera dosis y la muestra basal (3,3 (3,3 – 35,5) vs 3,3 (3,3 – 3,3), respectivamente; $p = 0,509$).

RESULTADOS

El grupo inmunocompetente sí mostró un aumento significativo de los títulos de anticuerpos neutralizantes después de la segunda dosis (90 (70,5 - 135)) en comparación con la primera dosis (3,3 (3,3 - 16); $p < 0,001$) y con la muestra basal (3,3 (3,3 - 3,3); $p < 0,001$), pero no se detectaron diferencias significativas en los títulos entre la primera dosis (3,3 (3,3 - 16) y la muestra basal (3,3 (3,3 - 3,3); $p = 0,195$).

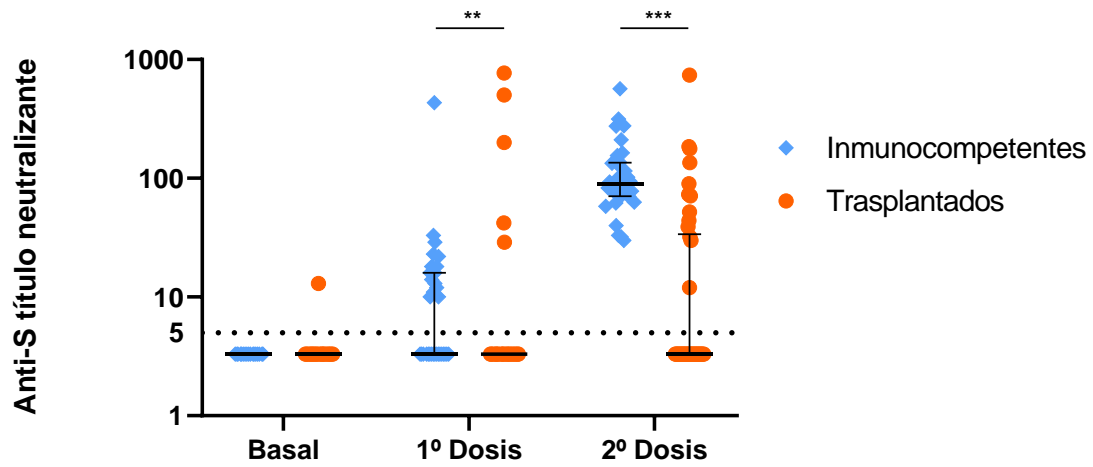
Haciendo la comparativa de títulos neutralizantes entre las dos subcohortes de TOS e inmunocompetentes, se observó que los inmunocompetentes tenían un título significativamente más elevado que los TOS tanto en la primera dosis (3,3 (3,3 - 16) vs 3,3 (3,3 - 3,3), respectivamente; $p = 0,005$), como tras segunda dosis (90 (70,5 - 135) vs 3,3 (3,3 - 35,5), respectivamente; $p < 0,001$).

Subanalizando por el tipo de trasplante, tras la primera dosis no hubo diferencias significativas en el título neutralizante entre ambos tipos de trasplante (3,3 (3,3 - 35,5) en hepáticos vs 3,3 (3,3 - 3,3) en renales; $p = 0,110$). Tampoco tras la segunda dosis se pudo observar que los receptores de trasplante hepático tuviesen un título significativamente más elevado que el que mostraron los receptores renales (32 (3,3 - 133,5) vs 3,3 (3,3 - 3,3), respectivamente; $p = 0,108$).

Figura 20. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes inmunocompetentes y trasplantados según la dosis de la vacuna. Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en la subcohortes de inmunocompetentes, representados como rombos azules ($n = 33$) y se compararon con los de la subcohortes de pacientes trasplantados, representados como círculos naranjas ($n = 43$) (panel A). También se compararon con cada tipo de trasplante (panel B): trasplante de riñón, representado con círculos verdes ($n = 29$) y trasplante de hígado, representado con triángulos rojos ($n = 14$) en el suero basal y después de la primera y segunda dosis de la vacuna. El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 5. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar entre grupos en cada dosis de vacuna, y el test de Friedman para comparar entre dosis de vacuna, ambos test seguidos de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica. Las comparaciones por pares entre las dosis se representan en tablas debajo de cada figura por grupo de sujetos.

RESULTADOS

A



** $p = 0,005$ y *** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en inmunocompetentes (valor p)

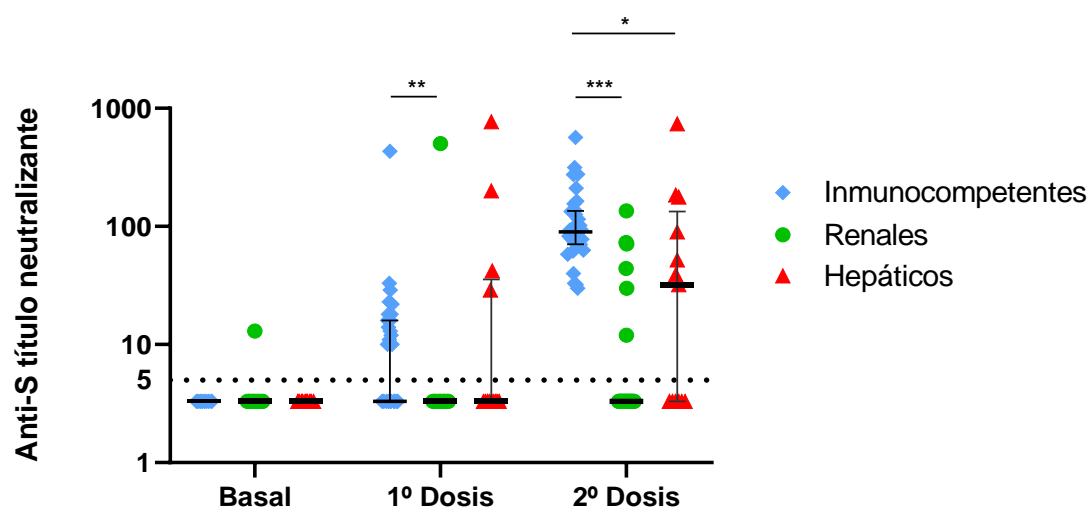
	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.195	< 0.001
1º Dosis	0.195	1.000	< 0.001
2º Dosis	< 0.001	< 0.001	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.978	0.149
1º Dosis	0.978	1.000	0.978
2º Dosis	0.149	0.978	1.000

RESULTADOS

B



** $p = 0,002$, * $p = 0,025$ y *** $p < 0,001$.

Comparación entre dosis en trasplantados renales (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	1.000	0.768
1º Dosis	1.000	1.000	1.000
2º Dosis	0.768	1.000	1.000

Comparación entre dosis en trasplantados hepáticos (valor p)

	Basal	1º Dosis	2º Dosis
Basal	1.000	0.509	0.187
1º Dosis	0.509	1.000	1.000
2º Dosis	0.187	1.000	1.000

RESULTADOS

4.3.3 Correlación de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG con la actividad neutralizante frente a la proteína S del SARS-CoV-2 por dosis de vacuna y según la subcohorte de trasplantados o inmunocompetentes

Para analizar cómo se relacionaban linealmente los títulos de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas con el título neutralizante en cada dosis de la vacuna y según qué población de pacientes, se estudió si existía una correlación estadísticamente significativa y la magnitud de esta. Las correlaciones de los títulos de isotipos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes en población inmunocompetentes y en trasplantados totales por dosis de la vacuna se representan en la Figura 21.

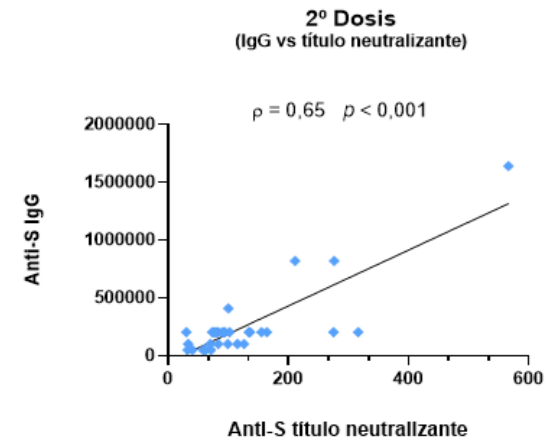
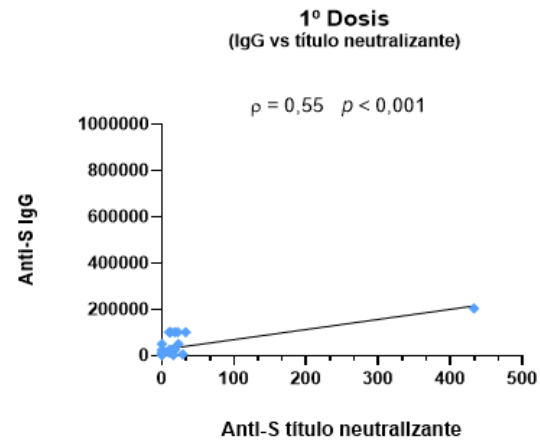
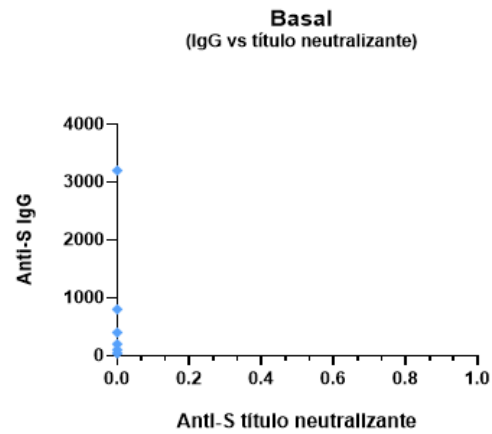
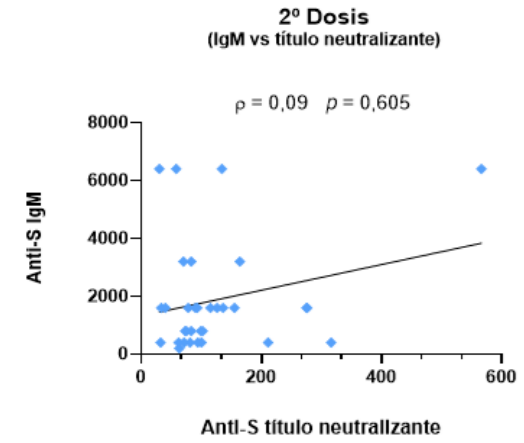
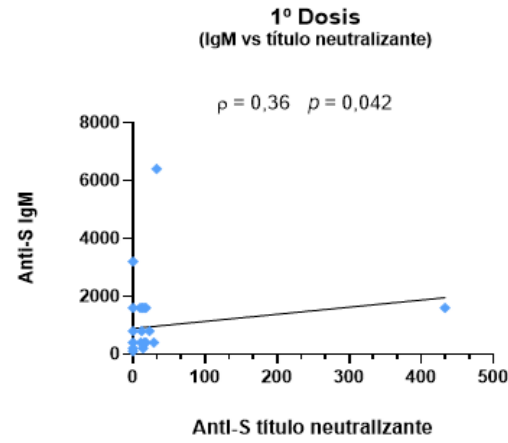
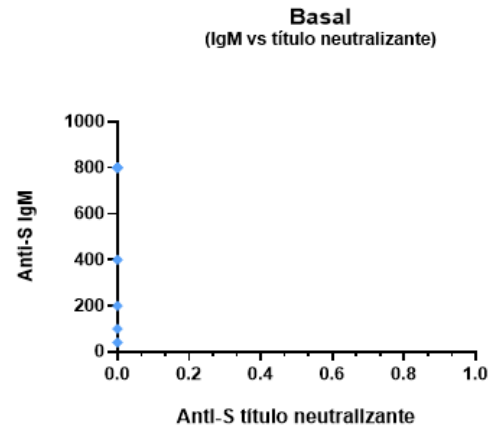
En los individuos inmunocompetentes se encontró una correlación entre los títulos de IgM y los de anticuerpos neutralizantes únicamente tras la primera dosis ($\rho = 0,36$; $p = 0,042$), tras la segunda dosis la correlación no era significativa ($\rho = 0,09$; $p = 0,605$). Mientras, la correlación entre IgG y anticuerpos neutralizantes se evidenció tanto tras primera ($\rho = 0,55$; $p < 0,001$) como tras segunda dosis ($\rho = 0,65$; $p < 0,001$), siendo esta última donde había mayor correlación.

En los receptores de trasplante se encontraron diferencias tanto en IgM como en IgG con el título neutralizante en las dos dosis recibidas. La correlación de IgM con el título neutralizante tras primera dosis fue de $\rho = 0,52$; $p < 0,001$, mientras que tras segunda fue de $\rho = 0,48$; $p = 0,001$. Por su parte, la correlación mostrada entre IgG y anticuerpos neutralizantes tras primera dosis fue de $\rho = 0,55$; $p < 0,001$ y tras segunda dosis fue de $\rho = 0,80$; $p < 0,001$.

Figura 21. Correlaciones de los títulos de anticuerpos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en las subcohortes de inmunocompetentes y de trasplantados según la dosis de la vacuna. Se determinaron las correlaciones entre los títulos de IgM e IgG con respecto a los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 en la subcohorte de inmunocompetentes en el suero basal ($n = 33$), en el suero tras la primera dosis ($n = 33$) y en el suero tras la segunda dosis ($n = 33$), representados como rombos azules (panel A). Se determinaron las correlaciones entre los títulos de IgM e IgG con respecto a los títulos de anticuerpos neutralizantes en la subcohorte de trasplantados en el suero basal ($n = 43$), el suero después de la primera dosis ($n = 42$) y el suero después de la segunda dosis ($n = 41$), representados como círculos naranjas (panel B). El análisis estadístico se realizó usando la correlación de Spearman, se representó en cada grupo el coeficiente del test (ρ) y el p valor.

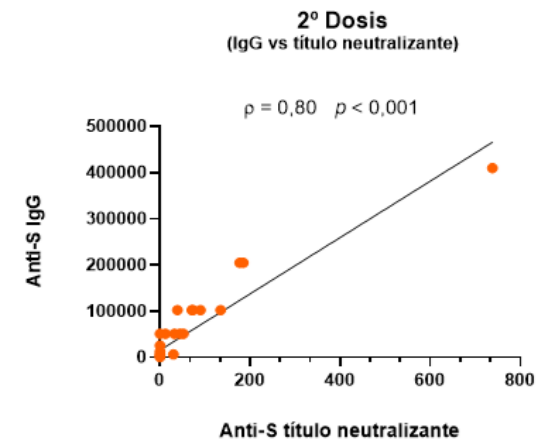
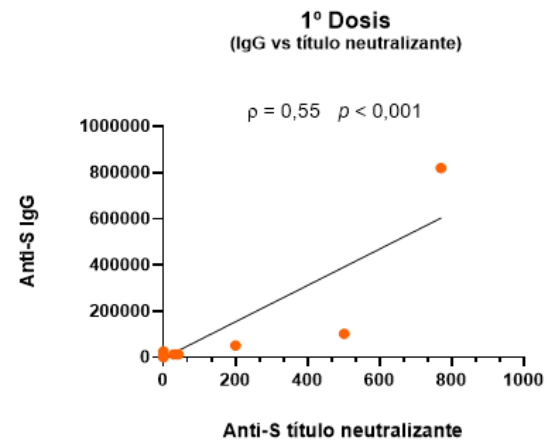
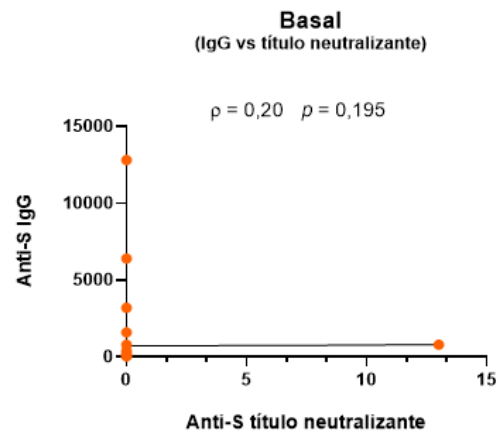
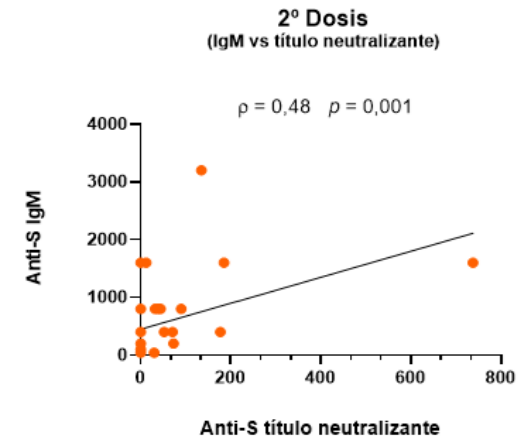
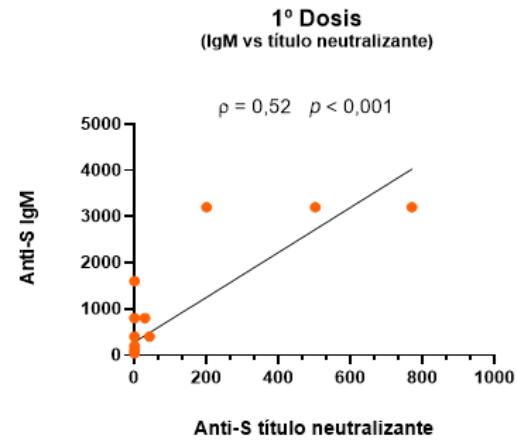
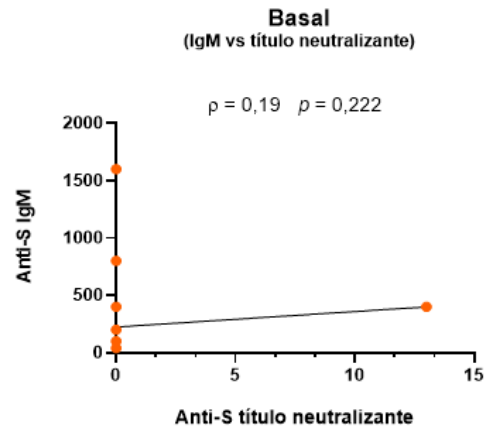
RESULTADOS

A



RESULTADOS

B



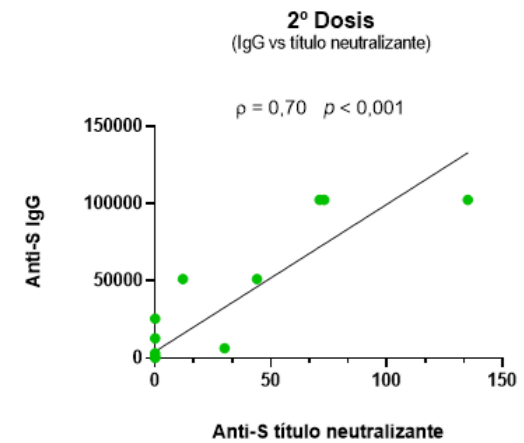
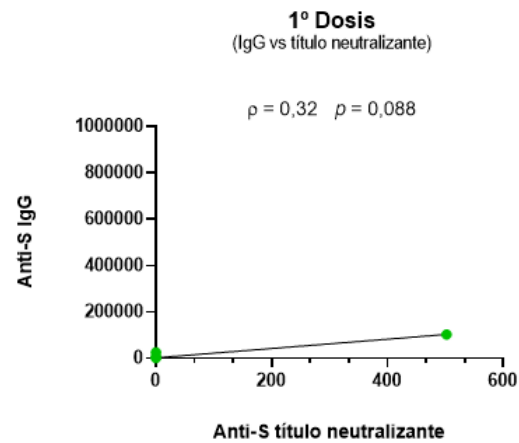
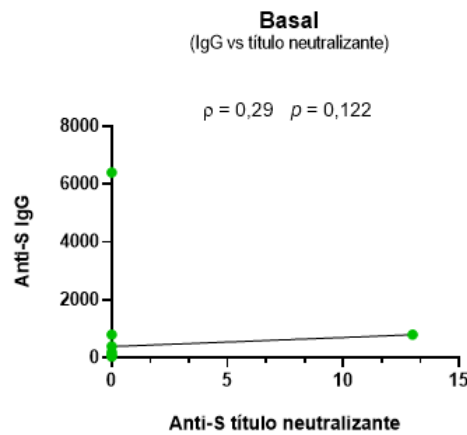
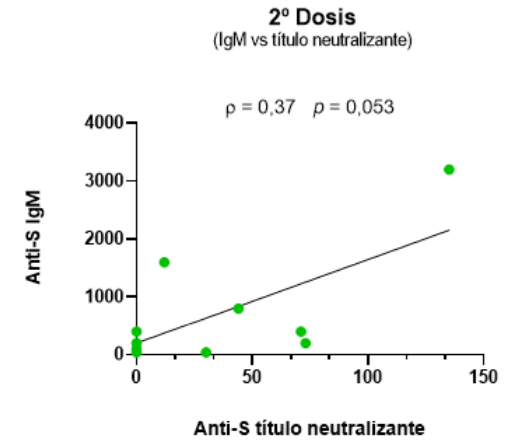
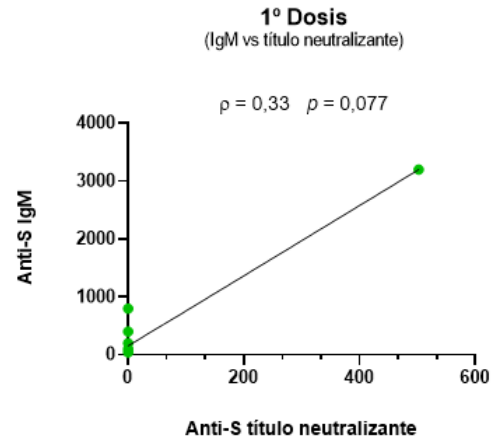
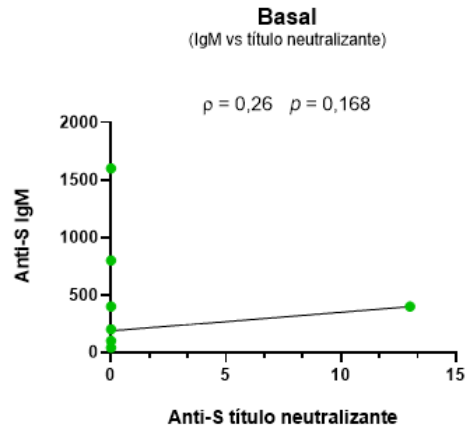
RESULTADOS

Entre los trasplantados, los receptores renales no mostraron correlación de la IgM con el título neutralizante ni tras primera dosis ($\rho = 0,33$; $p = 0,077$) ni tras segunda ($\rho = 0,37$; $p = 0,053$), aunque cerca de la significación estadística. Fue con el título de IgG y anticuerpos neutralizantes donde se halló la correlación significativa tras la segunda dosis únicamente ($\rho = 0,70$; $p < 0,001$), tras la primera dosis no se evidenció que fuese significativa ($\rho = 0,32$; $p = 0,088$). En el caso de los receptores hepáticos, la correlación entre títulos IgM y neutralizantes solo se mostró significativa tras la primera dosis ($\rho = 0,67$; $p = 0,015$), tras la segunda esta fue de $\rho = 0,39$; $p = 0,189$. Las correlaciones más elevadas y significativas fueron las obtenidas entre los títulos de IgG y los títulos neutralizantes tras la primera dosis ($\rho = 0,82$; $p < 0,001$) y sobre todo tras la segunda dosis ($\rho = 0,92$; $p < 0,001$). Las correlaciones de los títulos de isotipos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes en los dos tipos de trasplantados por dosis de la vacuna se representan en la Figura 22.

Figura 22. Correlaciones de los títulos de anticuerpos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los tipos de trasplantados según la dosis de la vacuna. Se determinaron las correlaciones entre los títulos de IgM e IgG con respecto a los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 en los receptores de trasplante de riñón en el suero basal ($n = 29$), en el suero tras la primera dosis ($n = 29$) y en el suero tras la segunda dosis ($n = 28$), representados como círculos verdes (panel A). Se determinaron las correlaciones entre los títulos de IgM e IgG con respecto a los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 en los receptores de trasplante de hígado en el suero basal ($n = 14$), en el suero tras la primera dosis ($n = 13$) y en el suero tras la segunda dosis ($n = 13$), representados como triángulos naranjas (panel B). El análisis estadístico se realizó usando la correlación de Spearman, se representó en cada grupo el coeficiente del test (ρ) y el p valor.

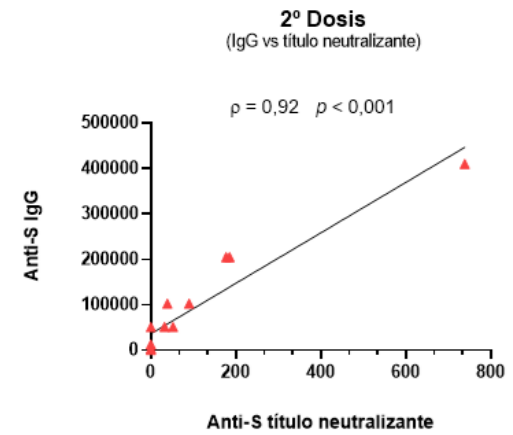
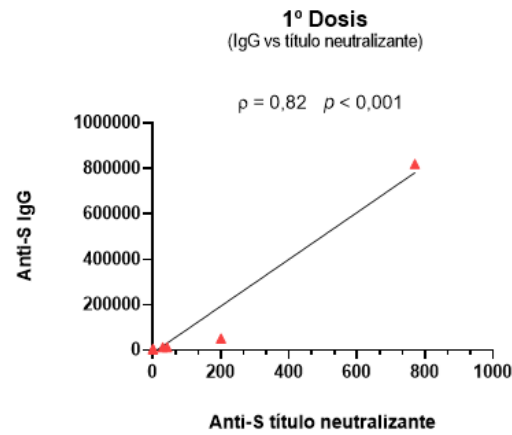
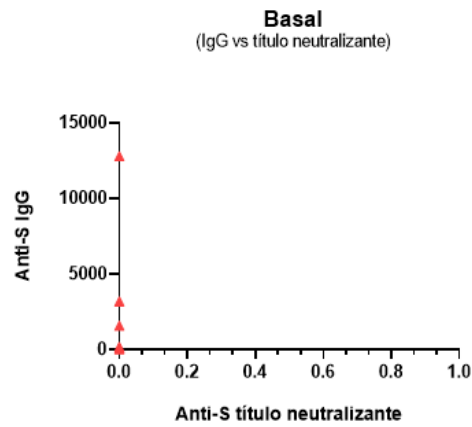
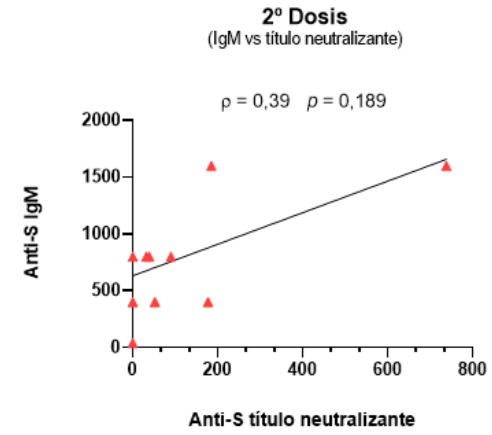
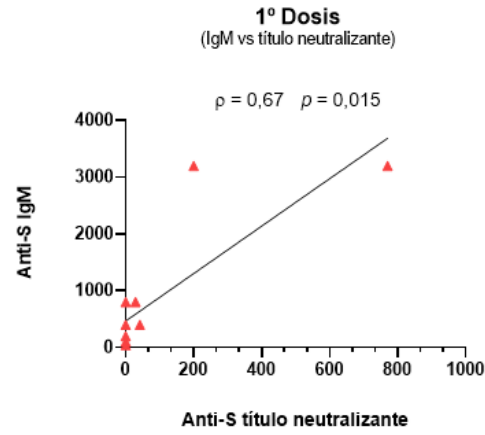
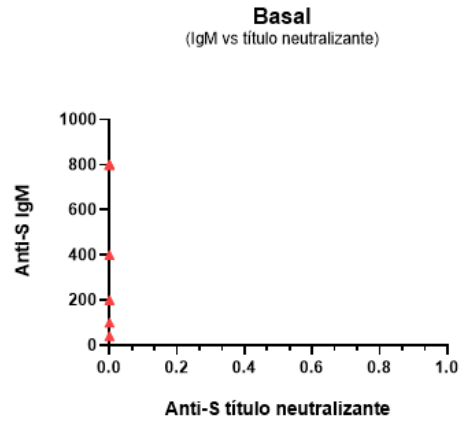
RESULTADOS

A



RESULTADOS

B



RESULTADOS

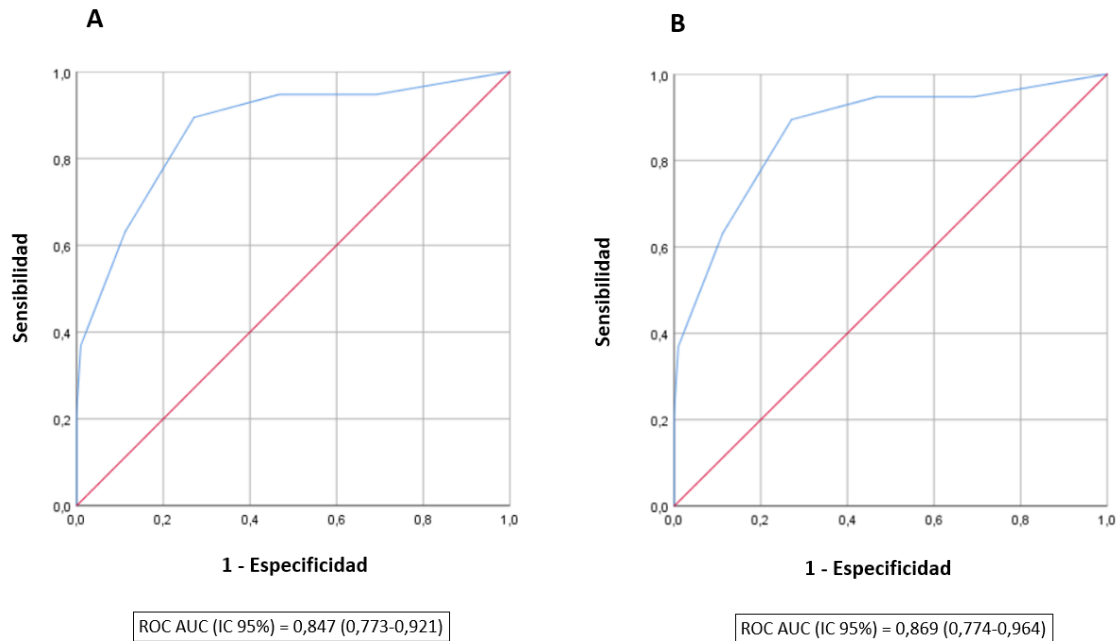
4.3.4 Predicción del desarrollo de actividad neutralizante en suero tras la vacunación mediante la magnitud de la respuesta de anticuerpos totales

En las dos subcohortes del estudio, inmunocompetentes y receptores de TOS, los niveles de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 de los isotipos IgM e IgG tuvieron una buena correlación con el título de anticuerpos neutralizantes, especialmente el isotipo IgG. Utilizando una curva de característica operativa del receptor (ROC), se calculó el umbral de IgM e IgG que mejor podía predecir la presencia de anticuerpos neutralizantes para cada subcohorte. (Ver [Anexo I. Material suplementario. 8.5 Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM e IgG para predecir la actividad neutralizante del suero tras la vacunación con su sensibilidad y especificidad](#)).

En el grupo de individuos inmunocompetentes, los valores de IgM iguales o superiores a 600 predijeron la actividad neutralizante con una sensibilidad del 69% y una especificidad del 80% (AUC: 0,847 (IC 95%: 0,773 - 0,921); $p < 0,001$). En los trasplantados, los títulos de IgM iguales o superiores a 300 predijeron la presencia de anticuerpos neutralizantes con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 73% (AUC: 0,869 (IC 95%: 0,774 - 0,964); $p < 0,001$). Las curvas ROC para calcular el punto de corte del título de IgM predictor de la actividad neutralizante en inmunocompetentes y trasplantados se representan en la Figura 23. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S6 y Tabla S7](#)).

Figura 23. Curvas de característica operativa del receptor (ROC) para predecir la actividad neutralizante mediante el título de IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2. Curva ROC del título de IgM frente a la proteína S que discrimina la presencia de actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en sujetos inmunocompetentes vacunados (A). Curva ROC del título de IgM frente a la proteína S que discrimina la presencia de actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en la subcohorte de trasplantados vacunados (B). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando curvas de característica operativa del receptor, expresando área bajo la curva, sensibilidad, especificidad y valor p del punto de corte calculado.

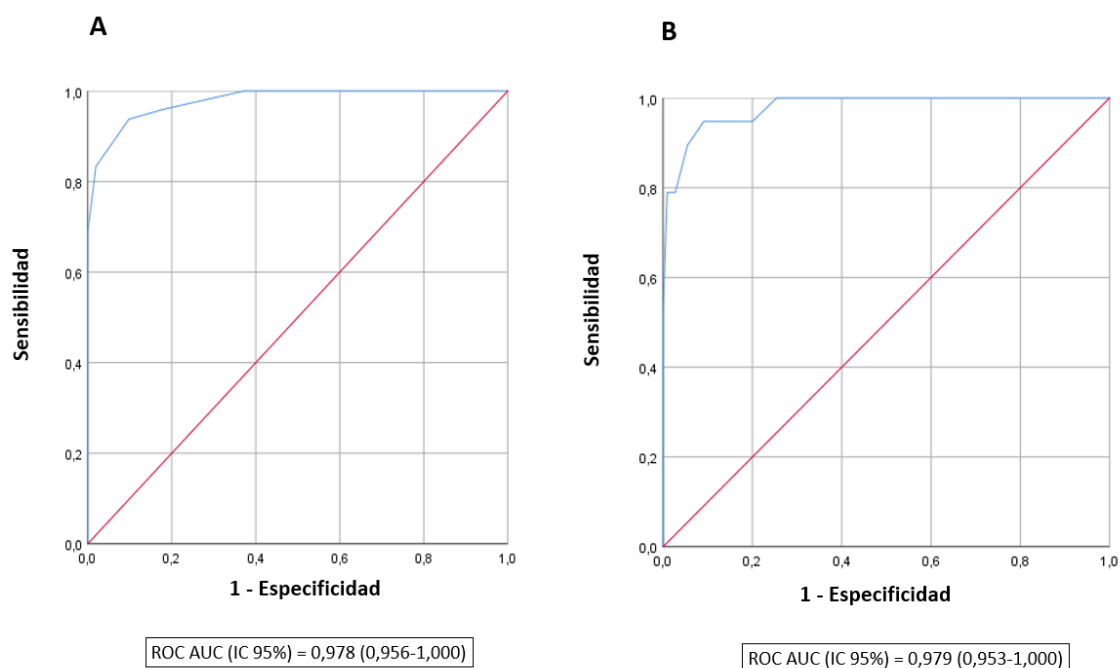
RESULTADOS



Analizando IgG, en individuos inmunocompetentes, los valores iguales o superiores a 19.200 de IgG predijeron la actividad neutralizante con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 90% (AUC: 0,978 (IC 95%: 0,956 - 1,000); $p < 0,001$). En la subcohorte de trasplantados, los títulos iguales o superiores a 4.800 predijeron la presencia de anticuerpos neutralizantes con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 91% (AUC: 0,979 (IC 95%: 0,953 - 1,000); $p < 0,001$). Las curvas ROC para calcular el punto de corte del título de IgG predictor de la actividad neutralizante en inmunocompetentes y trasplantados se representan en la Figura 24. (Ver [Anexo I. Material suplementario. Tabla S8 y Tabla S9](#)).

Figura 24. Curvas de característica operativa del receptor (ROC) para predecir la actividad neutralizante mediante el título de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2. Curva ROC del título de IgG frente a la proteína S que discrimina la presencia de actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en sujetos inmunocompetentes vacunados (A). Curva ROC del título de IgG frente a la proteína S que discrimina la presencia de actividad neutralizante frente al SARS-CoV-2 en la subcohorte de trasplantados vacunados (B). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando curvas de característica operativa del receptor, expresando área bajo la curva, sensibilidad, especificidad y valor p del punto de corte calculado.

RESULTADOS



4.3.5 Comparativa entre los títulos de anticuerpos generados por vacunados inmunocompetentes frente a la COVID-19 y los generados por pacientes con COVID-19 agudo

Respuesta y título de IgM

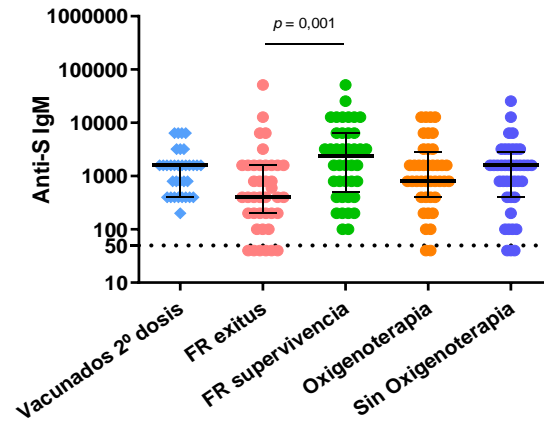
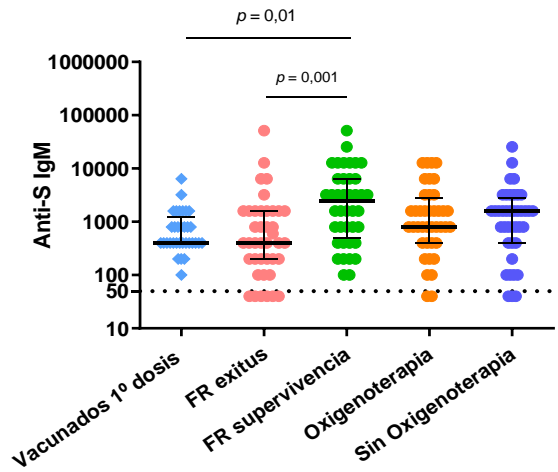
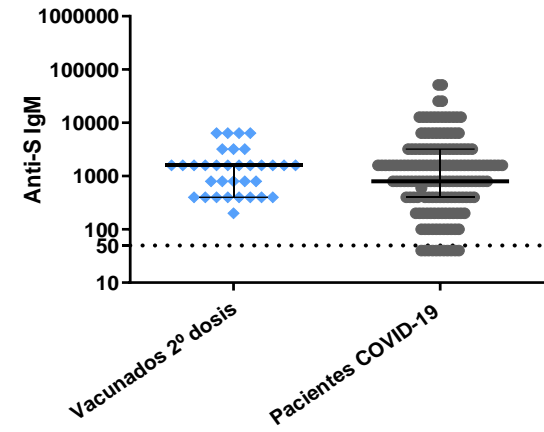
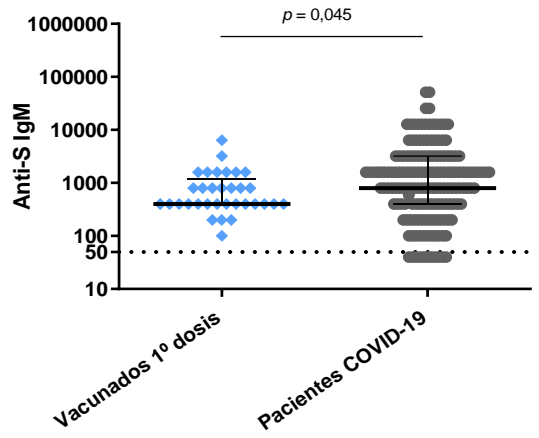
La totalidad de los sujetos vacunados mostraron tanto tras primera como tras segunda dosis una respuesta de IgM detectable (más de 50), no así en los pacientes con COVID-19 agudo, en los que fue el 93,13% (149/160) los que desarrollaron esta respuesta, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,121$).

Al estudiar la magnitud del título de IgM, se observó que los vacunados tras primera dosis generaban un título significativamente inferior al que generaba la cohorte total de pacientes COVID-19 agudo (400 (400 – 1.200) vs 800 (400 – 3.200), respectivamente; $p = 0,045$). Esta diferencia no fue significativa entre los vacunados tras segunda dosis y los pacientes COVID-19 agudo, aunque tenían estos últimos un título inferior (1.600 (400 – 1.600) vs 800 (400 – 3.200), respectivamente; $p = 0,511$). Al subanalizar la cohorte total de pacientes COVID-19 por su gravedad y compararla con los pacientes vacunados, se pudo comprobar que solamente en los vacunados tras primera dosis el título de IgM generado era significativamente inferior al desarrollado por los pacientes que sobrevivieron al FR (400 (400 – 1.200) vs 2.400 (500 – 6.400), respectivamente; $p = 0,01$). En los vacunados tras segunda dosis el título de IgM era similar al generado por todos los grupos clínicos de COVID-19 agudo. Los títulos de IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados y en los pacientes con COVID-19 agudo se representan en la Figura 25.

RESULTADOS

Figura 25. Títulos de anticuerpos IgM frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico. La cohorte total de pacientes con COVID-19 agudo se representa con círculos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules (n=40). Los pacientes vacunados se representan con rombos azules (n=33) El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante los tests no paramétricos de U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.

RESULTADOS



RESULTADOS

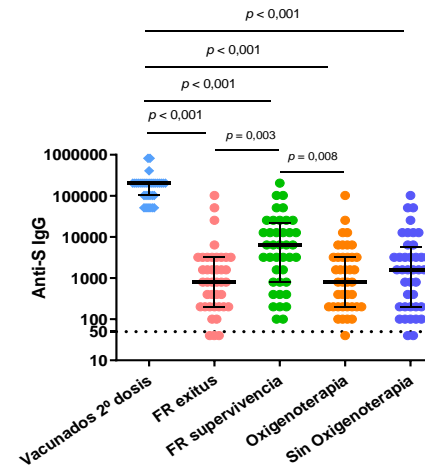
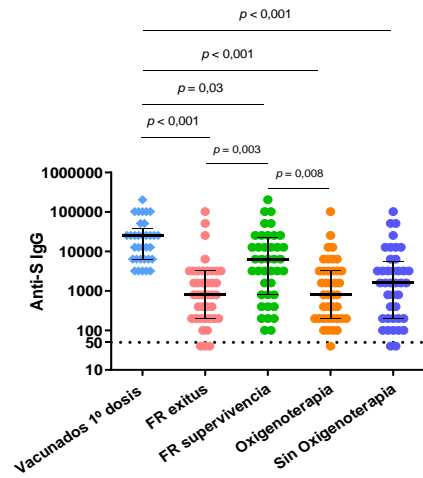
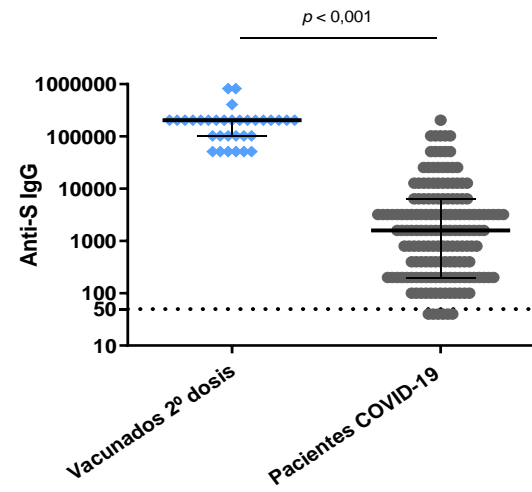
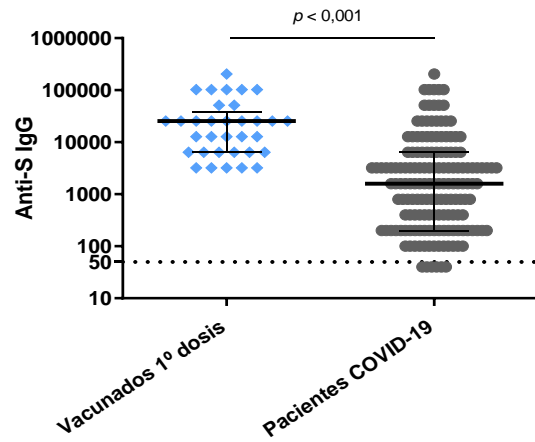
Respuesta y título de IgG

Al igual que con IgM, la respuesta a IgG fue detectada (más de 50) en el 100% de los pacientes vacunados, independientemente de la dosis recibida. En la cohorte total de paciente COVID-19 la respuesta positiva a IgG se observó en el 96,25% (154/160) de pacientes, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,258$).

Respecto al valor de los títulos de IgG, los vacunados tras primera dosis mostraron unos títulos superiores a los de la cohorte total de pacientes COVID-19 (25.600 (6.400 – 38.400) vs 1.600 (200 – 6.400), respectivamente; $p < 0,001$). Igualmente, tras la segunda dosis los vacunados también poseían un título de IgG significativamente superior al de los pacientes COVID-19 (204.800 (102.400 – 204.800) vs 1.600 (200 – 6.400), respectivamente; $p < 0,001$). Analizando por grupos clínicos, en todos ellos la magnitud de IgG era inferior a la de los pacientes vacunados tras primera dosis (todos con diferencias de $p < 0,001$ excepto FR y supervivencia vs vacunados tras primera dosis; $p = 0,03$) y tras segunda dosis (en todos los grupos clínicos la diferencia fue de $p < 0,001$). Los títulos de IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados y en los pacientes con COVID-19 agudo se representan en la Figura 26.

Figura 26. Títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico. La cohorte total de pacientes con COVID-19 agudo se representa con círculos grises ($n=160$), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas ($n=40$), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes ($n=40$), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas ($n=40$) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules ($n=40$). Los pacientes vacunados se representan con rombos azules ($n=33$) El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante los tests no paramétricos de U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.

RESULTADOS



RESULTADOS

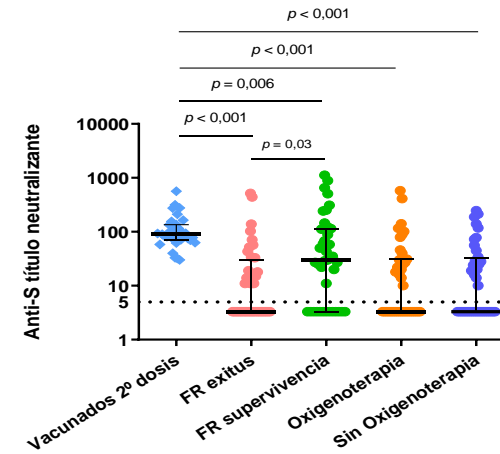
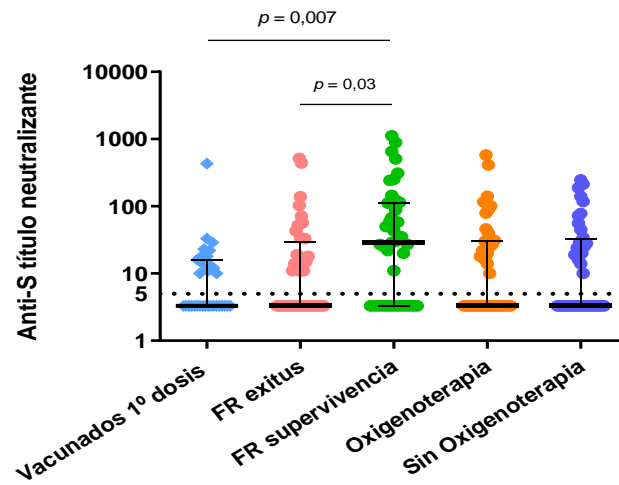
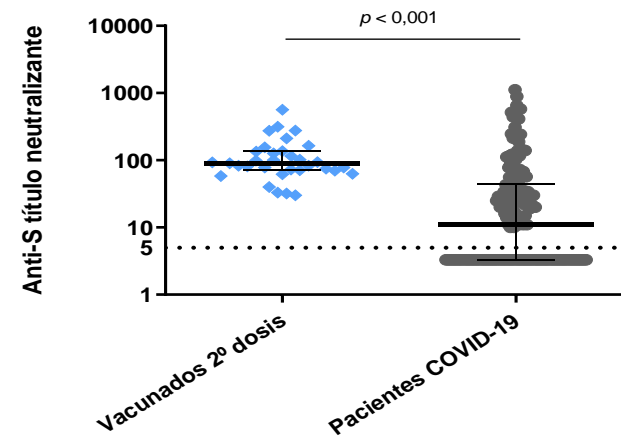
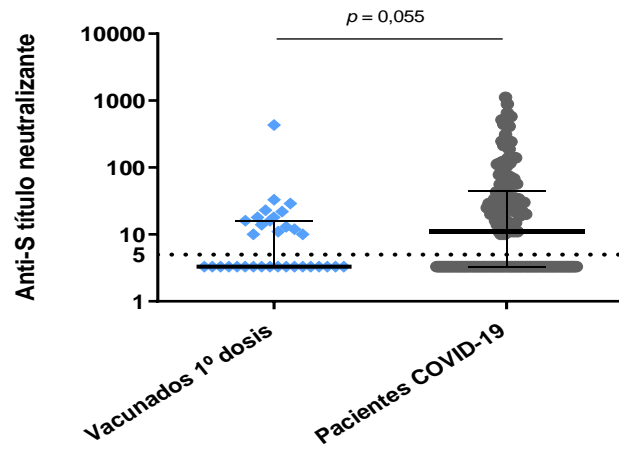
Respuesta y título de anticuerpos neutralizantes

A diferencia de lo constatado con IgM e IgG, la respuesta de anticuerpos neutralizantes no se observó en todos los pacientes vacunados tras la primera dosis, de ellos el 45,5% (15/33) respondieron mientras que en la cohorte total de pacientes COVID-19 agudo el porcentaje de respuesta fue del 51,9% (83/160), no observándose diferencias significativas ($p = 0,502$). Tras la segunda dosis, los vacunados sí que alcanzaron respuesta neutralizante en el 100% de los casos, lo cual fue estadísticamente significativo respecto al porcentaje de respuesta de los pacientes COVID-19 ($p < 0,001$).

Conforme a la magnitud del título de anticuerpos neutralizantes, en los vacunados tras primera dosis se observó una tendencia a tener menor título neutralizante respecto a los pacientes con la enfermedad aguda, aunque sin lograr la significación estadística (3,3 (3,3 – 16) vs 11 (3,3 – 44,5), respectivamente; $p = 0,055$). Sin embargo, tras la segunda dosis se invirtió esta tendencia y los vacunados generaron un título significativamente mayor que el de los pacientes agudos (90 (70,5 – 135) vs 11 (3,3 – 44,5), respectivamente; $p < 0,001$). Al comparar los títulos neutralizantes de vacunados con los de los diferentes grupos de gravedad de la enfermedad aguda se pudo demostrar que los vacunados tras primera dosis tuvieron unos títulos similares a los de todos los grupos clínicos salvo el grupo de supervivencia al FR, donde los títulos eran superiores a los de los vacunados (29,5 (3,3 – 113,5) vs 3,3 (3,3 – 16), respectivamente; $p = 0,007$). Tras la segunda dosis, el título neutralizante de los vacunados fue superior al de todos los grupos clínicos de la COVID-19 aguda (todos con diferencias de $p < 0,001$ excepto FR y supervivencia vs vacunados; $p = 0,006$). Los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados y en los pacientes con COVID-19 agudo se representan en la Figura 27.

Figura 27. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sujetos vacunados según la dosis y en los pacientes con COVID-19 agudo, totales y según grupo clínico. La cohorte total de pacientes con COVID-19 agudo se representa con círculos grises (n=160), los pacientes con FR y exitus con círculos rosas (n=40), los pacientes con FR y supervivencia con círculos verdes (n=40), los pacientes que recibieron oxigenoterapia con círculos naranjas (n=40) y los pacientes que no requirieron oxigenoterapia con círculos azules (n=40). Los pacientes vacunados se representan con rombos azules (n=33) El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 5. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante los tests no paramétricos de U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.

RESULTADOS



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral evalúa la respuesta inmune humoral generada por el huésped tras entrar en contacto con el SARS-CoV-2, bien a través de una infección natural o de la vacunación con ARNm-1273 (Moderna Biotech). Se investigó de qué manera esta respuesta influenciaba el desarrollo de la enfermedad en el paciente hospitalizado. Para ello se estudió la presencia de los isotipos IgM e IgG, y de sus cuatro subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También se analizó la funcionalidad neutralizante de los anticuerpos detectados y su correlación con el cuadro clínico. Así mismo, también se estudió qué características de los pacientes favorecían la presencia de anticuerpos con funcionalidad neutralizante, y si una determinada magnitud de estos, era capaz de predecir un buen pronóstico de la enfermedad (Bloque 1).

Por otro lado, se analizó la magnitud de los isotipos IgM e IgG, su funcionalidad neutralizante en pacientes vacunados con varias dosis de ARNm-1273 (Moderna Biotech). Se evaluó también si un determinado nivel de anticuerpos totales era capaz de predecir su actividad neutralizante tras la vacunación. Finalmente se comparó la magnitud de la respuesta inmune humoral entre los pacientes con infección aguda por SARS-CoV-2 y los sujetos vacunados (Bloque 2).

5.1 Bloque 1: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 con infección aguda (Cohorte de estudio 1)

Un primer resultado de nuestro estudio puso en evidencia que aquellos pacientes que no tenían títulos detectables de IgM al ingreso tenían cuatro veces más riesgo de fallecer. Por el contrario, todos los pacientes que desarrollaron fallo respiratorio (FR) y sobrevivieron tenían títulos detectables de IgM.

Por el contrario, la ausencia de títulos detectables de IgG al ingreso no supuso un mayor riesgo de muerte por COVID-19, aunque los pacientes que desarrollaron FR y sobrevivieron tenían títulos de IgG significativamente mayores que los que desarrollaron FR y fallecieron.

La gran mayoría de pacientes (91,87%) tuvieron una respuesta humoral conjunta para los isotipos IgM e IgG. Si bien este porcentaje fue menor en los pacientes que fallecieron por FR, y de hecho fue el grupo en el que con más frecuencia no se detectó ningún tipo de respuesta humoral, ya fuese IgM o IgG. De hecho, el porcentaje de pacientes fallecidos era significativamente mayor entre los que no tenían ningún tipo de respuesta humoral frente a los que tenían algún tipo de respuesta, IgM o IgG. Esta observación refuerza la hipótesis de que la respuesta humoral tiene un papel fundamental a la hora de determinar la progresión clínica de la COVID-19.

Del análisis de las diferentes subclases de IgG, se comprobó que la subclase IgG1 fue la más frecuentemente detectada entre las cuatro subclases analizadas. Aunque de forma global no se demostró que la mortalidad fuera mayor en los pacientes que carecían de

DISCUSIÓN

respuesta IgG1, cuando nos centrábamos en los pacientes con FR, aquellos que no alcanzaron un título de IgG1 detectable tenían cuatro veces más riesgo de fallecer. De hecho, el grupo de pacientes que sobrevivieron al FR alcanzaron títulos de IgG1 mayores, con diferencias significativas, respecto a los otros 3 grupos clínicos.

La subclase IgG3 alcanzó niveles inferiores, pero fue la segunda subclase de IgG en cuanto a magnitud del título y porcentaje de respuesta. Al igual que con IgG1, los pacientes con FR que no desarrollaban título de IgG3 tenían más riesgo de fallecer, concretamente dos veces más riesgo. Es más, no tener una respuesta conjunta de IgG1 e IgG3 supuso un incremento de casi tres veces en el riesgo de fallecer en aquellos pacientes que habían desarrollado FR.

Por el contrario, la subclase IgG2 no se detectó en ningún paciente y la IgG4 se detectó sólo en 6 pacientes.

Este predominio observado de la IgG1 e IgG3 ya ha sido descrito previamente en pacientes con COVID-19, así como en pacientes con otras infecciones víricas (261,265,266).

Al contrario de lo que sucedía con la detección de IgM e IgG, donde la gran mayoría de pacientes desarrolló una respuesta detectable (93,13% y 96,25% respectivamente), solo la mitad de los pacientes de esta serie desarrolló títulos de anticuerpos neutralizantes (51,9%). No se demostró que la ausencia de títulos neutralizantes supusiese un mayor riesgo de fallecimiento de forma global. No obstante, aquellos pacientes con FR que no tenían actividad neutralizante tuvieron dos veces más riesgo de fallecer que los pacientes que sí tenían actividad neutralizante. Además, el título de anticuerpos neutralizantes del grupo de pacientes que sobrevivieron al FR fue significativamente mayor que el del grupo de pacientes que falleció tras desarrollar FR. Esta observación sugiere que la presencia temprana de anticuerpos neutralizantes protege de la progresión clínica de la COVID-19 hacia cuadros más graves (76,267,268).

Sin embargo, es interesante destacar, que los pacientes con oxigenoterapia (menos graves) tuvieron títulos de anticuerpos IgG e IgG1 inferiores a los pacientes con FR que sobrevivieron (más graves), lo que se opondría a la idea de que un mayor título de anticuerpos protegería de las formas graves de la enfermedad. Esta es una observación muy interesante que se ha constatado también en otras enfermedades virales, en las que pacientes más graves tienen títulos de anticuerpos mayores, y podría explicarse porque un estado inflamatorio de mayor duración e intensidad daría lugar a una respuesta de anticuerpos más intensa, pero también a un cuadro clínico más grave (269–271). Otra explicación a este suceso podría estar en la mayor carga viral que suelen tener los pacientes más graves respecto a los más leves, esta mayor carga del virus supondría un incremento proporcional del nivel de anticuerpos específicos frente al patógeno por lo que se estaría observando una correlación directa entre la gravedad del paciente, la carga viral y el título de anticuerpos, algo ya descrito en otros trabajos (272). El hecho de que la mayor carga viral y el mayor título de anticuerpos se relacionen con la gravedad del cuadro clínico podría basarse en el fenómeno de potenciación

DISCUSIÓN

dependiente de anticuerpos, el cual podría tener lugar por la entrada del virus a una célula fagocítica a través de anticuerpos de baja afinidad donde proliferaría descontroladamente, o por una unión de antígeno anticuerpo que generaría una respuesta efectora Fc y exagerada con liberación de citoquinas, atracción de células inmunes y activación del complemento, lo cual desembocaría en una respuesta hiperinflamatoria (85,91).

En resumen, se puede concluir que los pacientes con COVID-19 más graves que lograban sobrevivir tenían títulos de anticuerpos (IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3) y de anticuerpos neutralizantes más elevados que los otros 3 grupos clínicos. Aunque *a priori* este hecho pueda parecer paradójico, ya que una mayor magnitud de los títulos permitiría controlar la replicación viral y por tanto proteger del agravamiento del cuadro clínico, otros autores han descrito una respuesta humoral de mayor envergadura en los pacientes más graves (74). Esto podría ser explicado porque en las formas severas se genera un estado de hiperinflamación y replicación viral descontrolada que daría lugar a una hiperproducción de anticuerpos, situación que no tiene lugar en los cuadros leves (74,83,84). Sin embargo, dentro de los dos grupos de pacientes más graves (los que desarrollaron FR), aquellos que sobrevivieron tenían un título de IgM, IgG, IgG1, y anticuerpos neutralizantes significativamente mayor que aquellos pacientes que fallecían, este resultado sí confirmaría la hipótesis inicial de este trabajo y la de otros trabajos, que postulan que un título mayor de anticuerpos tendría un papel fundamental a la hora de evitar la forma más grave de la enfermedad, además de servir como una herramienta pronóstica de la COVID-19 (88,101,267,268). Se investigó también si existía alguna correlación entre la cifra de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas y la actividad neutralizante de estos anticuerpos. Conviene aclarar que, aunque tanto el isotipo IgM como el IgG son anticuerpos con funcionalidad neutralizante, es la IgG la principal responsable de la eficacia de la actividad neutralizante. Dentro de la IgG total, las subclases IgG1 e IgG3 son las que mayoritariamente desempeñan esta función (73,261,265). Se demostró que existía una correlación significativa entre los niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas y sus subclases (IgG1 e IgG3) y la actividad neutralizante. No obstante, llamó la atención el hecho de que la mayor correlación con el título de anticuerpos neutralizantes se lograra con los títulos de IgM y no con los de IgG o sus subclases, como esperábamos. Tal vez, al tratarse de pacientes con enfermedad aguda con una mediana de 9 días transcurridos desde el inicio de síntomas, podría explicar que no hubiese transcurrido el tiempo necesario para que se generalizase la maduración de la respuesta inmune humoral con anticuerpos neutralizantes del isotipo IgG, los cuáles suelen aparecer más tardíamente. Interesantemente, la mayor correlación con la actividad neutralizante se observó con IgM y precisamente en los pacientes que fallecieron. Este hecho sugeriría que los anticuerpos neutralizantes del isotipo IgM tendrían una función menos eficaz a la hora de neutralizar la infección viral.

Por el contrario, en el grupo con menor gravedad la actividad neutralizante se relacionó con la presencia tanto de IgG total como de sus subclases IgG1 e IgG3, mostrándose, por

DISCUSIÓN

tanto, que los pacientes con mejor pronóstico son los que tienen actividad neutralizante correlacionada con los niveles de IgG.

En cuanto a la dinámica de la respuesta humoral, existía cierta correlación entre los títulos alcanzados de IgM, IgG total, subclases IgG1 e IgG3 y anticuerpos neutralizantes y el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. Este hecho se confirma en otras series que han estudiado la respuesta humoral en pacientes con infección por SARS-CoV-2 (273,274).

Fue llamativo encontrar que los pacientes que desarrollaron FR presentaban títulos de anticuerpos, incluidos los anticuerpos neutralizantes, de forma más precoz que aquellos que tuvieron un curso más benigno de su enfermedad. Esta observación podría estar indicando que en los pacientes más graves hay un desajuste en la dinámica de generación de anticuerpos. Al no aumentar progresivamente el título de anticuerpos, sino sólo de forma precoz, se impediría un adecuado control humoral de la infección en los días siguientes y en última instancia existiría un mayor riesgo de sufrir un cuadro clínico de mayor gravedad. De hecho, la alteración en la cinética de producción de anticuerpos desde el momento de la infección es una de las causas observadas de la gravedad de los cuadros de COVID-19 (87,275).

En nuestro análisis de los factores asociados al desarrollo de respuesta neutralizante encontramos que la mayor correlación se observó con las variables de respuesta inmune humoral, es decir, con los títulos alcanzados de IgM, IgG y las subclases IgG1 e IgG3, especialmente con el título de IgM. Aunque en la infección por SARS-CoV-2 los anticuerpos neutralizantes generados suelen ser mayoritariamente del isotipo IgG y sobre todo de las subclases IgG1 e IgG3, eso no descarta que también haya un número considerable de anticuerpos neutralizantes del isotipo IgM (73,261,265–267). La respuesta combinada de los isotipos IgM e IgG o de las subclases IgG1 e IgG3 se asoció también con una mayor actividad neutralizante. De hecho, la inmensa mayoría de pacientes con título neutralizante tenían a la vez IgM e IgG (98,8%) y más de la mitad de los pacientes con título neutralizante tenían una respuesta conjunta de IgG1 e IgG3 (55,42%). Estas observaciones se alinean con lo descrito previamente en la literatura, donde la mayoría de los anticuerpos neutralizantes son de las subclases IgG1 e IgG3, pero también los hay del isotipo IgM (73,261,265).

No hubo relación entre el título de anticuerpos neutralizantes y una menor duración de la estancia hospitalaria, de la estancia en UCI o en del número de días con ventilación mecánica invasiva. Curiosamente los pacientes que habían recibido tocilizumab, un inhibidor del receptor de la IL-6, tuvieron un título de anticuerpos neutralizantes significativamente superior al de los que no lo habían recibido. Este suceso *a priori* puede resultar paradójico, pues el bloqueo del receptor de IL-6 precisamente dificultaría

DISCUSIÓN

La diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas y en última instancia reduciría la producción de inmunoglobulinas (276,277). Debe notarse que el tocilizumab se administró mayormente a pacientes que habían desarrollado FR, precisamente aquellos con mayor título de anticuerpos neutralizantes.

Utilizando un modelo invariante pudimos comprobar que el recuento de leucocitos, neutrófilos, nivel de LDH, fibrinógeno, el haber recibido tocilizumab, los días transcurridos desde el inicio síntomas hasta la extracción del suero basal, los días transcurridos desde el inicio síntomas hasta el resultado clínico, el título de IgM, de IgG, de IgG1, de IgG3 y la reactividad conjunta a las subclases IgG1 e IgG3 fueron las variables con mayor capacidad de predicción del título de anticuerpos neutralizantes.

Finalmente, utilizando el modelo multivariante, se concluyó que las características del paciente que mejor predijeron el título de anticuerpos neutralizantes fueron el título de IgM y el título de la subclase IgG1. No obstante, el título de IgG total se quedó cerca de la significación estadística.

En este trabajo nos propusimos establecer un punto de corte del valor del título de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG a partir del cual se pudiese determinar si el paciente tenía en el suero anticuerpos con actividad neutralizante. Para el isotipo IgM, el punto de corte calculado fue de 1.200, de tal manera que un valor de IgM inferior a este punto de corte podía descartar la actividad neutralizante con una sensibilidad del 76%. Si el valor estaba por encima de ese punto de corte, se confirmaba la actividad neutralizante con una especificidad del 79%. Para la subclase IgG1, el punto de corte calculado fue de 70, de tal manera que un valor de IgG1 inferior a este punto de corte podía descartar la actividad neutralizante con una sensibilidad del 72%. Si el valor estaba por encima de ese punto de corte, se confirmaba la actividad neutralizante con una especificidad del 86%. Para el isotipo IgG, el punto de corte calculado fue de 1.200, de tal manera que un valor de IgG inferior a este punto de corte podía descartar la actividad neutralizante con una sensibilidad del 84%. Si el valor estaba por encima de ese punto de corte, se confirmaba la actividad neutralizante con una especificidad del 75%.

La utilización combinada de estos puntos de corte podría ofrecer una aproximación para conocer si una muestra de suero tiene actividad neutralizante, cuantificando solo el isotipo IgG y su subclase IgG1. La ampliación del tamaño muestral permitiría mejorar estos puntos de corte y su desempeño para calcular la actividad neutralizante del suero.

El hecho de que los pacientes que fallecían tras desarrollar FR tuvieran un título significativamente inferior de anticuerpos neutralizantes al de los pacientes que sobrevivían al FR, motivó la exploración de un valor de anticuerpos neutralizantes que pudiese llegar a predecir la mortalidad de los pacientes, tanto en la cohorte total como entre aquellos pacientes que desarrollaban FR. En la cohorte total no se consiguió

encontrar un punto de corte de anticuerpos neutralizantes aceptable para predecir la mortalidad, siendo el área bajo la curva muy bajo y sin significación estadística. Por su parte, en los pacientes con FR, aunque el área bajo la curva si fue estadísticamente significativo, tenía un valor muy bajo junto con unas sensibilidades y especificidades muy bajas en ambos casos o con valores extremos, dependiendo del punto de corte. Por lo tanto, no se pudo encontrar un punto de corte en el valor del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad del paciente. Aunque si se observaron diferencias significativas entre pacientes que fallecieron por FR y los que sobrevivieron tras FR, seguramente el tamaño muestral no ha permitido llegar a obtener un punto de corte significativo para realizar esta predicción de mortalidad en los pacientes COVID-19.

5.2 Bloque 2: Determinar la respuesta inmune humoral frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en sujetos inmunizados con la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech) (Cohorte de estudio 2). Comparación de las respuestas entre las subcohortes de TOS e inmunocompetentes sanos

Un primer aspecto a destacar es que un porcentaje elevado de pacientes (inmunocompetentes o no) mostraban respuesta IgM e IgG antes de ser vacunados, a pesar de no haber tenido datos clínicos de infección por SARS-CoV-2. Esto podría explicarse, o bien porque realmente hubo infecciones previas asintomáticas o porque la técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgM e IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 es muy sensible y pudo estar detectando anticuerpos frente a coronavirus estacionales, siendo por tanto estas respuestas fruto de la reactividad cruzada. Esta última hipótesis ganaría fuerza si se tiene en cuenta que en la mayoría de trabajos en los que se estudia la respuesta de IgM e IgG tras vacunación en trasplantados, estas no suelen detectarse en más del 50% de los pacientes estudiados tras dos dosis administradas (278). En este trabajo el porcentaje de pacientes trasplantados que poseían reactividad IgM e IgG superaba con creces el 50%, tanto tras primera como tras segunda dosis de la vacuna.

Estudiando a las subcohortes de trasplantados e inmunocompetentes, de manera esperable se observó que con cada nueva dosis de la vacuna el porcentaje de pacientes con respuesta iba aumentando, tanto en IgM como en IgG.

Los pacientes inmunocompetentes generaron, tanto tras primera como tras la segunda dosis, unos títulos superiores de IgG e IgM que los trasplantados; siendo especialmente marcada la diferencia respecto a los trasplantados renales, que fueron los trasplantados con títulos IgM e IgG más bajos. Este mayor nivel de la respuesta humoral IgM e IgG en inmunocompetentes tras vacunación va en la línea de otros trabajos al respecto en los que los sujetos no trasplantados siempre desarrollan unas respuestas humorales de mayor magnitud (279–281).

Entre los dos tipos de trasplantados del estudio se pudo constatar que los receptores hepáticos tuvieron siempre un título de IgM y de IgG superior al de los trasplantados

DISCUSIÓN

renales. Este hecho se explica por la mayor pauta inmunosupresora que reciben habitualmente los trasplantados renales para evitar el rechazo, y concretamente en este estudio porque además el trasplante había sido realizado más recientemente, lo que suele conllevar mayor inmunosupresión. Los receptores hepáticos normalmente tienen pautas de monoterapia que a la larga se traducen en una mayor respuesta inmune frente la vacunación (282,283).

Conforme al nivel de los anticuerpos detectados en general, se observó que la respuesta IgG fue de mayor intensidad que la respuesta IgM, tanto en trasplantados, independientemente del tipo, como en inmunocompetentes. Esta observación puede sustentarse principalmente porque las mediciones de los títulos se hicieron 4 semanas y 2 semanas después de la administración de la primera y la segunda dosis de la vacuna respectivamente. Como la respuesta IgG tarda más tiempo en aparecer, ya que se produce el cambio de isotipo en detrimento de la IgM, fue la inmunoglobulina con mayor magnitud (65).

Los pacientes inmunocompetentes desarrollaron más frecuentemente una respuesta simultánea de IgM e IgG a la vacuna que los trasplantados. Los trasplantados requirieron dos dosis para que el porcentaje de pacientes con respuesta para los dos isotipos fuese de por lo menos el 80%. Los receptores hepáticos tuvieron un porcentaje de respuesta combinada IgM e IgG superior al de los receptores renales, pero sin ser estadísticamente significativa la diferencia.

Pasando a discutir la funcionalidad neutralizante de los anticuerpos detectados, conviene mencionar en primer lugar que al contrario que lo observado con los elevados porcentajes de respuesta IgM e IgG en el suero basal, en el caso de la actividad neutralizante, esta fue solamente detectada en un paciente trasplantado renal, mientras que ninguno de los sujetos inmunocompetentes tenía una respuesta neutralizante detectable. Esto vendría a reforzar la hipótesis, ya mencionada con anterioridad, de que la técnica de ELISA empleada en este trabajo para detectar IgM e IgG sería muy sensible y estaría detectando anticuerpos frente a otros coronavirus estacionales, anticuerpos que no tienen actividad neutralizante frente a SARS-CoV-2, como ya se ha observado en varios estudios (284,285). En cuanto a los porcentajes de pacientes trasplantados con respuesta neutralizante, estos no superaron el 50% tras ninguna de las dos dosis de vacuna, una cifra similar a la descrita en la literatura (278,286).

Pasando al estudio de los títulos de anticuerpos neutralizantes, en el caso de los trasplantados, estos no se elevaron significativamente ni tras la primera dosis ni tras la segunda, independientemente del tipo de trasplante. Pero en el caso de los sujetos inmunocompetentes, si bien la primera dosis de la vacuna no consiguió elevar los títulos neutralizantes de manera significativa respecto al suero basal, tras la segunda dosis sí que aumentó el título en comparación con la primera dosis y con el suero basal.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes generados en pacientes inmunocompetentes fueron superiores a los de los trasplantados, tanto tras primera como tras segunda dosis

DISCUSIÓN

de la vacuna. La mayor magnitud de la respuesta humoral, incluida la respuesta neutralizante, es característica tras la vacunación de sujetos inmunocompetentes si lo comparamos con pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido (279,280,287).

Cuando investigamos la relación entre la respuesta IgG e IgM y el título de anticuerpos neutralizantes tras recibir ambas dosis, encontramos que existía una correlación tanto en trasplantados como en inmunocompetentes, exceptuando en estos últimos y tras la segunda dosis en la que no hubo correlación entre IgM y anticuerpos neutralizantes.

Del subanálisis de la subcohorta de trasplantados según el tipo de trasplante, se comprobó que los receptores de trasplante renal eran los que ofrecían menores correlaciones entre los títulos de isotipos IgM e IgG con los títulos de anticuerpos neutralizantes, mientras que los trasplantados hepáticos mostraron unas correlaciones superiores a las de los renales, llegando a ser las más altas del estudio, superando a las de los sujetos inmunocompetentes.

Llamó bastante la atención el hecho de que los pacientes trasplantados tuviesen una correlación de títulos IgM e IgG con títulos neutralizantes superior a la de los sujetos inmunocompetentes, especialmente en los trasplantados hepáticos. En principio cabría esperar que un individuo inmunocompetente vacunado desarrollaría una respuesta inmune más coordinada y madura, de tal manera que los anticuerpos generados tuviesen una mayor correlación con la capacidad neutralizante. Aunque la correlación observada en inmunocompetentes no es baja, sí es inferior a la correlación determinada en los trasplantados. De cara a los dos grupos de trasplantados, como cabía esperar son los receptores hepáticos los que tienen una correlación más elevada entre los anticuerpos totales y los anticuerpos neutralizantes, como ya se ha comentado anteriormente, el menor régimen inmunosupresor podría ser el motivo principal de esta observación.

Para poder predecir la presencia de actividad neutralizante en base a la magnitud de la respuesta de anticuerpos totales en el suero tras la vacunación, se decidió hacer el cálculo de manera individual para cada subcohorta, inmunocompetentes y trasplantados de órgano sólido. En cuanto al estudio de la IgM, en inmunocompetentes este punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad para predecir actividad neutralizante era superior al de los trasplantados, pero curiosamente el punto de corte de los trasplantados tenía mayor área bajo la curva y mayor sensibilidad y especificidad. Respecto al título de IgG, los inmunocompetentes de nuevo tenían un valor predictor de actividad neutralizante superior al que poseían los trasplantados. Sin embargo, en este caso los valores de área bajo la curva y de sensibilidad y especificidad era prácticamente idénticos, siendo sensiblemente superiores en trasplantados.

DISCUSIÓN

El hecho de que el valor del punto de corte predictor de actividad neutralizante sea mayor en inmunocompetentes, fue algo esperable ya que se trata de individuos sin ninguna limitación de la función inmune, por lo que previsiblemente sus títulos son superiores a los de sujetos que están recibiendo medicación inmunosupresora como son los trasplantados de órgano sólido. De la comparativa entre los títulos de IgM e IgG para realizar la predicción de la actividad neutralizante, se concluyó que el título de IgG era superior al de IgM para hacer esta predicción, indistintamente de la población inmunocompetente o trasplantada en la que se emplee. No fue una sorpresa ya que en este trabajo se ha podido evidenciar que la mayor correlación con el título neutralizante tras la vacunación es la del título de IgG.

Empleando por tanto el título de IgG tras la vacunación para predecir si un paciente desarrollaba actividad neutralizante o no, para inmunocompetentes que tuviesen un valor inferior a 19.200 de IgG, el 94% de ellos no tendrían respuesta de anticuerpos neutralizantes, mientras que los que tuviesen un valor de IgG igual o superior a este punto de corte, el 90% de ellos tendrían respuesta de anticuerpos neutralizantes. En los trasplantados de órgano sólido, aquellos con un valor de IgG inferior a 4.800, el 95% de ellos no habrían desarrollado actividad neutralizante mientras que los que tuviesen un valor de título superior o igual, el 91% tendrían actividad neutralizante.

Con el objetivo de conocer el grado de similitud de la respuesta inmune humoral generada tras la vacunación con la desarrollada tras la infección por SARS-CoV-2, se compararon los resultados de respuesta y magnitud del título de IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes tras cada una de las dosis vacunales con sus homólogos en los pacientes que habían experimentado una infección natural. Los vacunados inmunocompetentes se caracterizaron por tener una respuesta detectable de ambos isotipos (IgG e IgM) en la totalidad de los sujetos vacunados y tras las dos dosis vacunales. No así en los pacientes con la enfermedad aguda que, aunque si bien la mayoría de ellos tenían una respuesta detectable, esta no era del 100%. En cuanto a la actividad neutralizante, la primera dosis de la vacuna no fue suficiente para generar una respuesta en la totalidad de los vacunados, con un porcentaje de respuesta muy similar al de los pacientes con infección aguda. Sin embargo, la segunda dosis de la vacuna sí permitió que el 100% de los vacunados desarrollase título neutralizante detectable, con una diferencia significativa respecto a los pacientes con COVID-19.

En cuanto a la magnitud del título de anticuerpos, El isotipo IgM se caracterizó porque en los vacunados tras primera dosis su magnitud fue inferior a la de los pacientes con COVID-19 agudo, especialmente si se compara con la magnitud de IgM que desarrollaron los pacientes con FR y que sobrevivieron. Tras la segunda dosis de la vacuna, los títulos de IgM se incrementaron, pero solamente hasta valores similares a los presentados por los pacientes infectados.

Del isotipo IgG se pudo observar claramente que fue la inmuglobulina que más se elevó durante la vacunación, con unos valores muy altos y significativamente superiores a los

DISCUSIÓN

generados por los pacientes con la enfermedad aguda, esto fue observado ya en la primera dosis y superando a los valores de todos los grupos clínicos de COVID-19. Tras la segunda dosis, de nuevo se pudo constatar este hecho. Cabe destacar que la diferencia menos abultada del título de IgG en vacunados se observó al compararlo con el de los pacientes supervivientes al FR. Estos resultados se ajustan al escenario esperable en el caso de una vacunación con medición tardía de la respuesta inmune; la respuesta de la infección aguda se caracterizó por un mayor predominio del isotipo IgM mientras que tras la vacunación se observaba un mayor nivel de IgG.

Respecto al título de anticuerpos neutralizantes, la administración de la primera dosis en los vacunados solamente logró unos títulos similares o incluso más bajos que los de los pacientes COVID-19, de hecho, en el grupo de pacientes que sobrevivieron al FR este título era significativamente superior al de los vacunados. Fue necesario que los vacunados recibiesen la segunda dosis para generar un título neutralizante significativamente superior al de todos los grupos clínicos de pacientes con COVID-19 agudo.

Conviene destacar que el título de anticuerpos neutralizantes es un buen marcador subrogado de la eficacia de una vacuna, ya que teóricamente estos anticuerpos bloquean la capacidad del virus para infectar células sanas (88,288). Por lo tanto, alcanzar una magnitud en el título neutralizante equiparable al de la infección natural e incluso superior, va a permitir saber si la vacuna realmente tiene garantías de ser eficaz o estimar cuantas dosis de esta deben ser administradas para alcanzar este título.

En este trabajo se demuestra como una segunda dosis de la vacuna ARNm-1273 (Moderna Biotech) genera una respuesta humoral, sobre todo de IgG y anticuerpos neutralizantes, de elevada magnitud, siendo incluso superior a la generada tras la infección natural por SARS-CoV-2. Otros trabajos científicos ya han podido constatar este mismo hecho observado, lo que supone una garantía de la eficacia de este tipo de vacunas con las dos dosis establecidas (289,290).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con COVID-19 agudo la ausencia de un título detectable de IgM al ingreso incrementa cuatro veces la mortalidad, especialmente en los pacientes con fallo respiratorio, en los que una pobre respuesta humoral de anticuerpos específicos y de anticuerpos neutralizantes se asocia con un peor pronóstico.
2. En los pacientes con COVID-19 no grave (sin fallo respiratorio) existe una correlación directa entre el título de anticuerpos específicos y neutralizantes y la duración de los síntomas. En estos pacientes es en los que existe una más clara correlación entre el título de IgG total, IgG1 e IgG3 y el de anticuerpos neutralizantes.
3. Los títulos de IgM e IgG1 son las características del paciente con COVID-19 agudo que mejor predicen el título de anticuerpos neutralizantes en el suero al ingreso.
4. Se pudo identificar un punto de corte del título de IgG que ayuda a predecir la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero tras la vacunación, tanto en inmunocompetentes como en inmunodeprimidos (TOS).
5. La respuesta humoral a la vacuna de mRNA-1273 (Moderna Biotech) es superior en inmunocompetentes sanos que en TOS. En los trasplantados es necesario la administración de la segunda dosis de la vacuna para producir un incremento destacado de los títulos de IgM e IgG, sin embargo, no es suficiente para elevar significativamente el título de anticuerpos neutralizantes. Los trasplantados hepáticos muestran una respuesta humoral superior a los trasplantados renales.
6. La administración de vacuna de mRNA-1273 (Moderna Biotech) en individuos inmunocompetentes genera a los 15 días una respuesta humoral de elevada magnitud, tanto de IgG como de anticuerpos neutralizantes, superior a la generada tras la infección natural por SARS-CoV-2.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. El trabajo se llevó a cabo antes de la difusión generalizada de la variante Ómicron y sus respectivas subvariantes, que actualmente producen la mayoría de las infecciones a nivel mundial. Por lo tanto, la respuesta humoral a estas subvariantes puede ser diferente a la observada en este estudio.
2. Los grupos clínicos no fueron ajustados por edad, sexo ni raza, lo cual podría influir en que las diferencias significativas entre grupos halladas con otras variables, como el título de anticuerpos, podrían tener cierto sesgo a la hora de condicionar la gravedad del cuadro clínico. Principalmente la edad, ya que es el factor de riesgo más importante para sufrir un cuadro grave de COVID-19.
3. La cohorte total de pacientes se caracterizó por tener una elevada comorbilidad de base, lo que les haría tener una mayor predisposición a sufrir un cuadro grave. Por lo tanto, los resultados no son realmente extrapolables a la población general si no a una población con mayor riesgo de ingreso hospitalario. Los grupos clínicos tampoco fueron ajustados por comorbilidad, por lo que aquellos de más gravedad tenían un porcentaje superior de pacientes con comorbilidad, lo cual podría actuar como un confusor a la hora de interpretar los resultados de inmunidad humoral y gravedad.
4. Los tratamientos frente a la COVID-19 no fueron administrados en la misma proporción entre los grupos clínicos, destacando principalmente el tocilizumab que fue administrado mayoritariamente en el grupo que sobrevivió al FR. Por lo tanto, aunque el grupo de supervivencia al FR tuviese mayor título de anticuerpos específicos y neutralizantes que el grupo de fallecidos, el haber recibido más tocilizumab podría haber contribuido a su supervivencia, alterando por tanto el efecto real que haya podido tener el título de anticuerpos en la supervivencia.
5. El ingreso hospitalario y la extracción de la muestra de suero de los pacientes no fueron realizados en el mismo momento de evolución del cuadro clínico, lo cual podría distorsionar los resultados de supervivencia, gravedad y respuesta inmune. Sin embargo, las medianas del número de días desde el inicio de síntomas hasta el ingreso hospitalario o la extracción de la muestra de suero no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos clínicos, con lo que este efecto distorsionador quedaría considerablemente mitigado. Además, tras el análisis multivariante, los días transcurridos desde el inicio de síntomas hasta el ingreso o hasta la extracción de la muestra, no fueron variables que influyeron en el título de anticuerpos neutralizantes.
6. Aunque la tasa de vacunación completa fue muy alta en la cohorte de estudio 2, hubo dos pacientes de los 43 trasplantados que no recibieron la pauta completa, reduciendo por tanto el tamaño muestral.
7. Uno de los vacunados trasplantados había tenido COVID-19 seis meses antes de recibir la vacuna ARNm-1273. Por lo tanto, la respuesta inmune inducida por la vacunación estaría condicionada por esta infección previa.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

8. Las dos subcohortes de pacientes vacunados, trasplantados de órgano sólido e inmunocompetentes sanos, no pudieron ser ajustadas por edad, sexo, raza o comorbilidades, por lo que estas variables podrían ejercer cierto sesgo sobre los resultados obtenidos de respuesta humoral tras la vacunación. La subcohorte de inmunocompetentes sanos fue más joven, caucásica y femenina, aparte de no tener ninguna comorbilidad.

9. Dentro de la subcohorte de trasplantados de órgano sólido, los trasplantados renales tuvieron menos años desde el trasplante y menos neoplasias, pero más hipertensión y dislipemia que los receptores hepáticos; el no ajustar por años desde trasplante y comorbilidades también podría haber distorsionado los resultados obtenidos de respuesta humoral tras la vacunación.

ANEXO I.
MATERIAL SUPLEMENTARIO

8. ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.1 Resultados del western blot sobre los sueros control

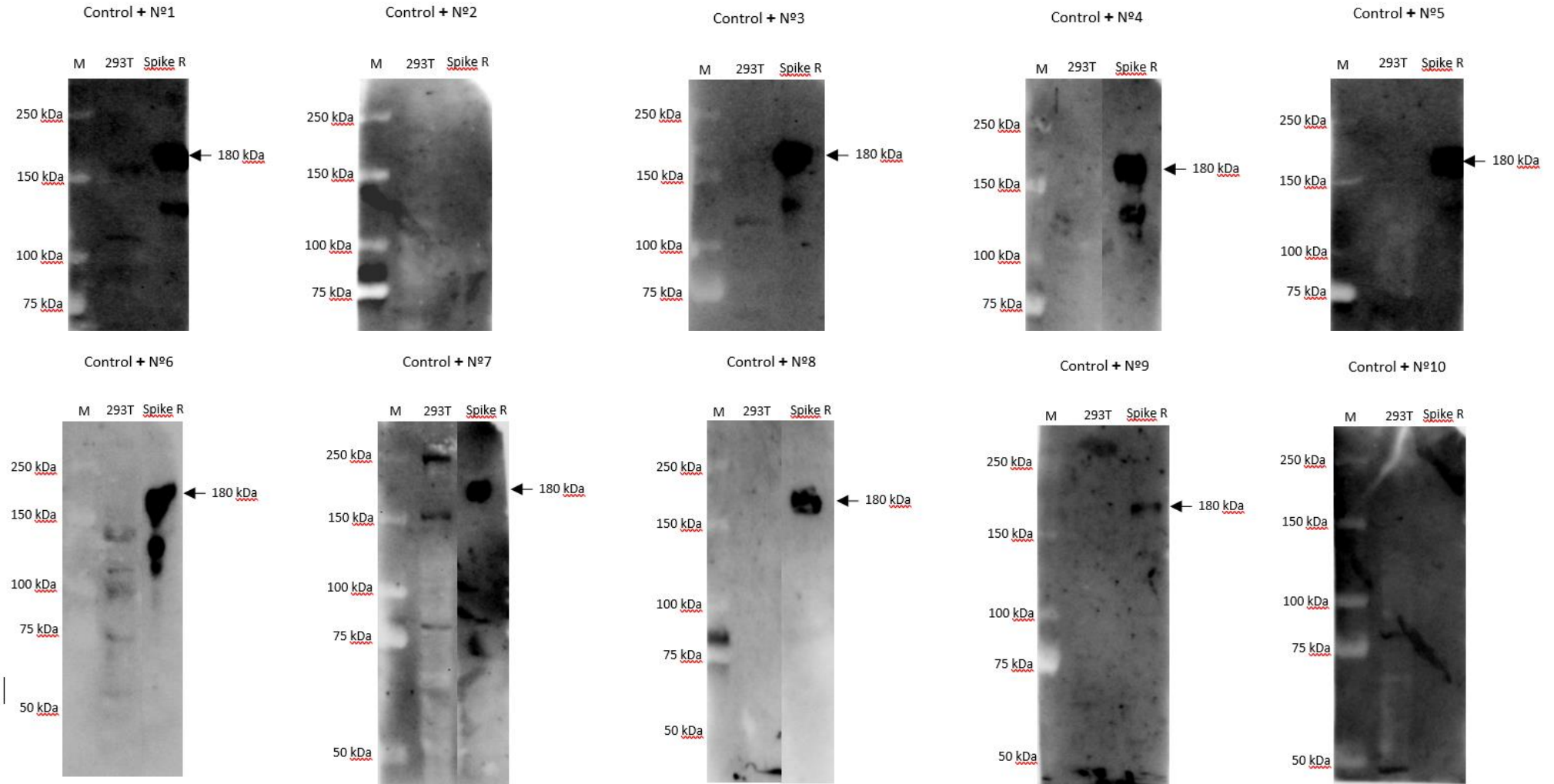
Tras la realización del western blot siguiendo el mismo protocolo para ambos sueros controles positivos y negativos se obtuvieron los siguientes resultados de reactividad entre la proteína S recombinante del SARS-CoV-2 y los anticuerpos específicos IgG (presencia de banda de 180 kDa): (las imágenes del western blot de cada control están representadas en la Figura 28):

- Sueros control positivo: 85% (17/20) de sueros reactivos frente a la proteína S recombinante del SARS-CoV-2. Solamente 3 sueros no mostraron reactividad.
- Sueros control negativo: 0% (0/0) de sueros reactivos frente a la proteína S recombinante del SARS-CoV-2.

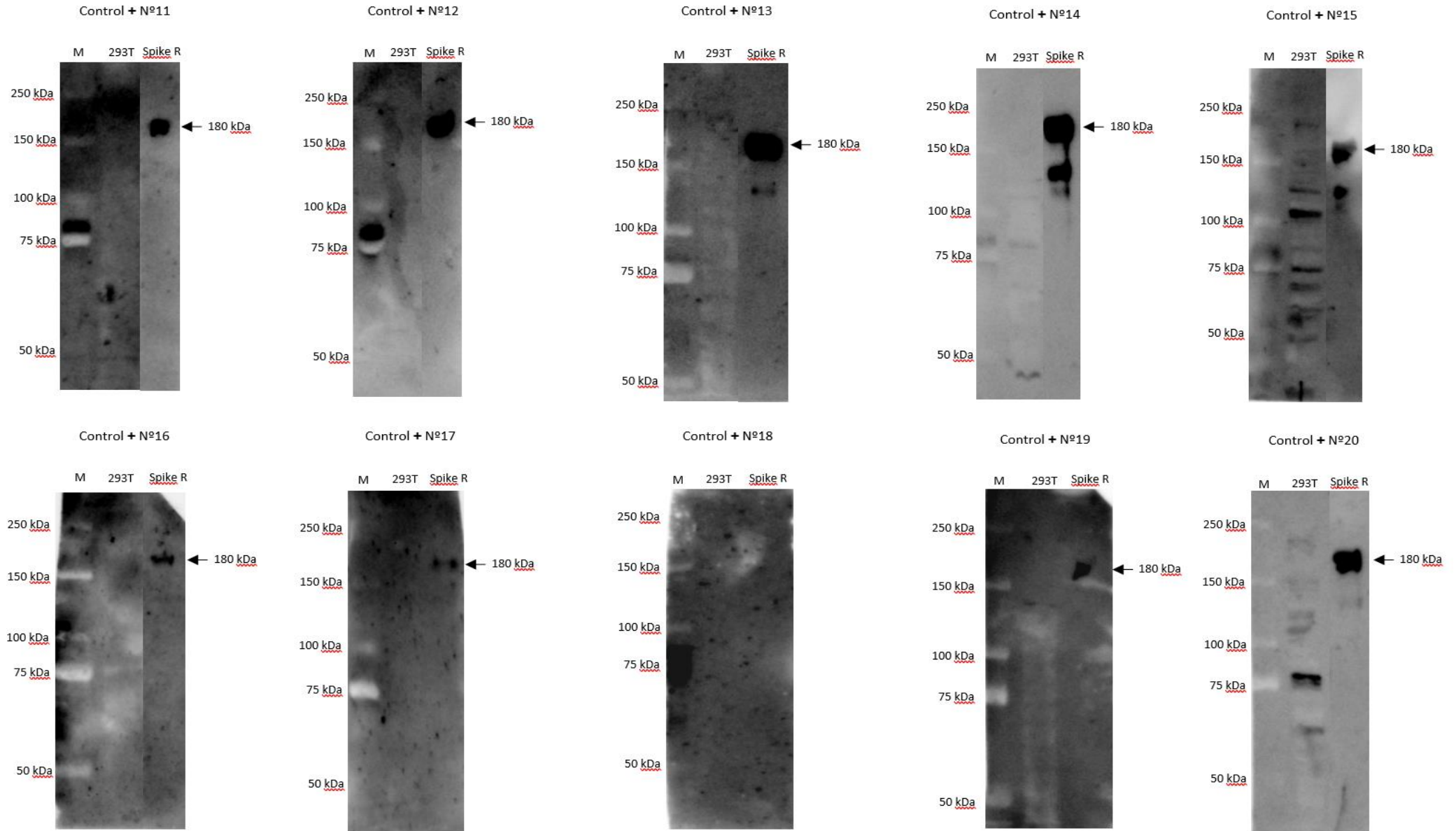
Finalmente se realizó un western blot utilizando un suero policlonal de la proteína S de SARS/SARS-CoV-2 (S1/S2) con el mismo procedimiento y se evidenció la presencia de la banda a 180 kDa, es decir, reactividad del suero policlonal frente a la proteína S recombinante de SARS-CoV-2 empleada en nuestros ensayos.

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

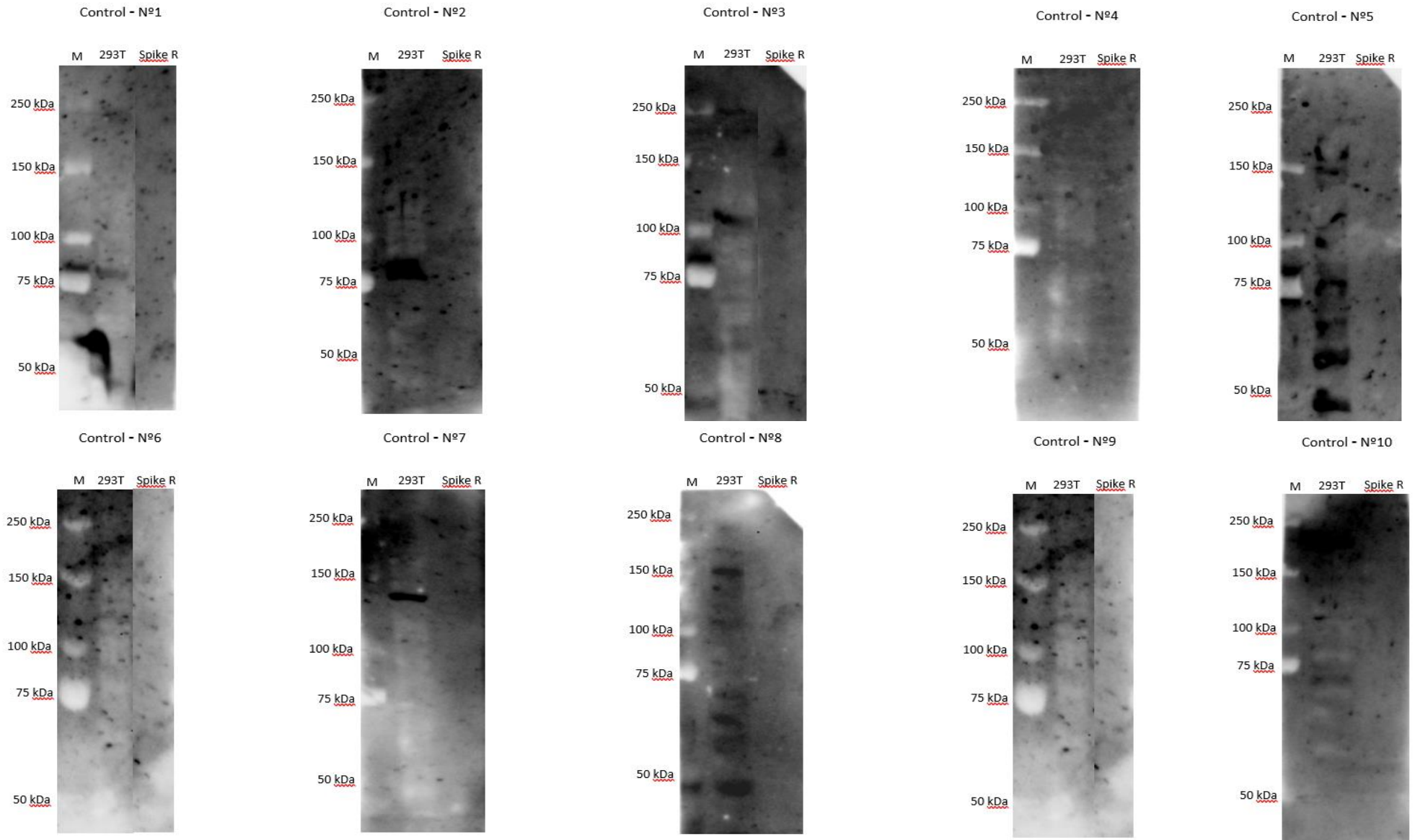
Figura S1. Imágenes de Western blot de los sueros control positivo, negativo y del anticuerpo policlonal SARS/SARS-CoV-2.



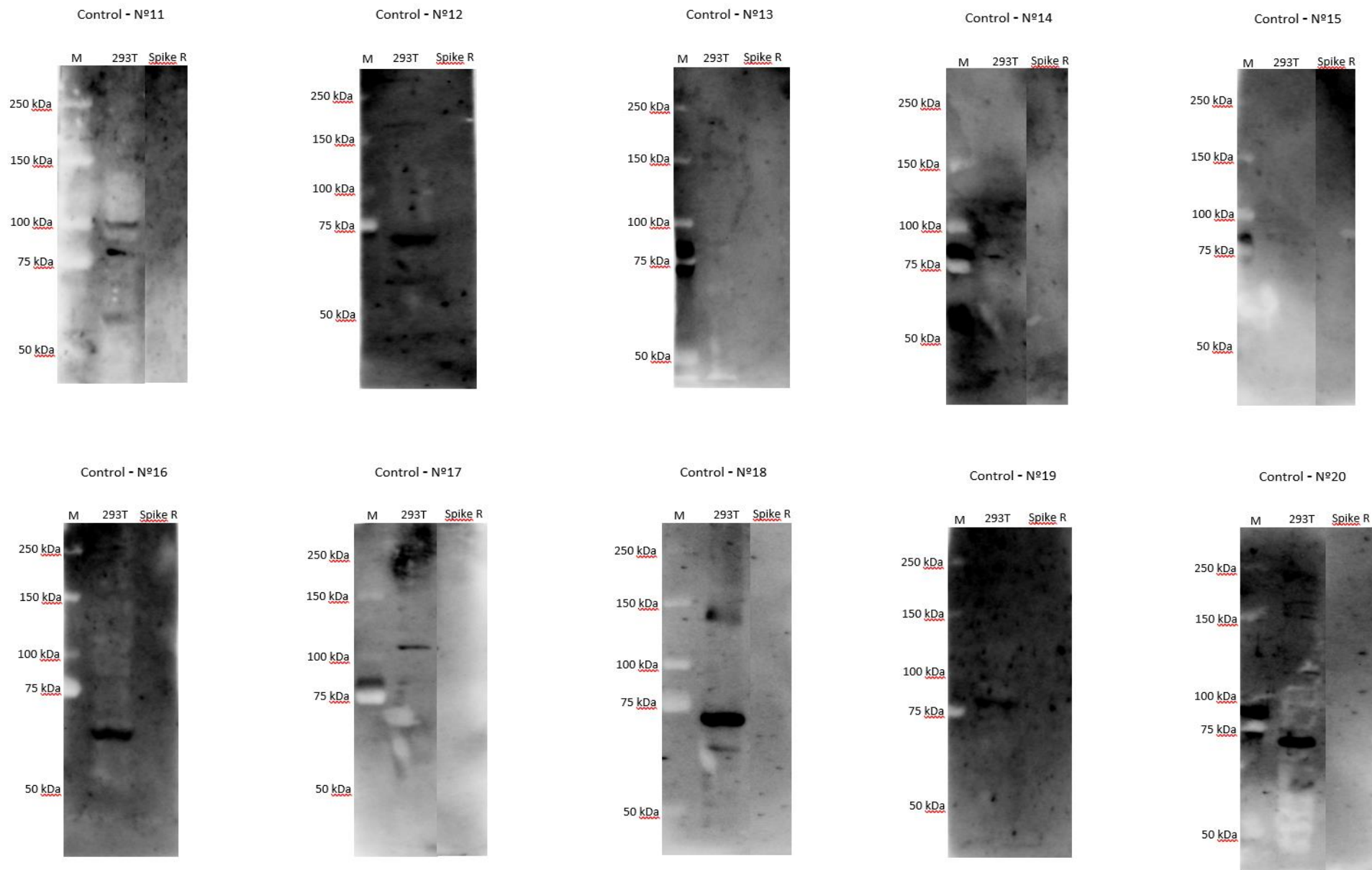
ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO



ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

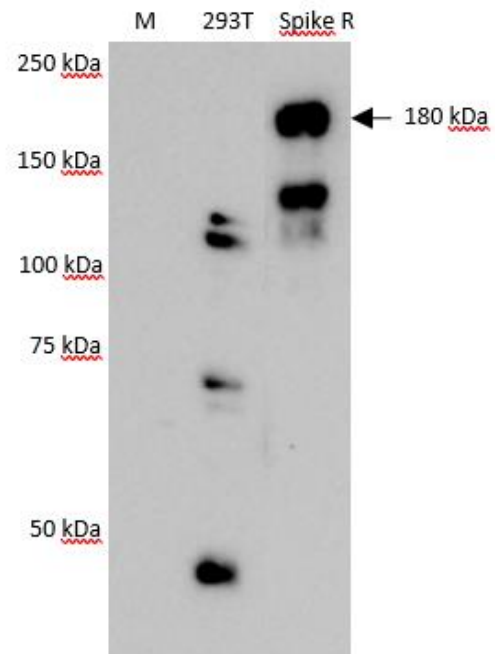


ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO



ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Ac monoclonal SARS/SARS-CoV-2



8.2 Resultados del ensayo ELISA para la detección de anticuerpos de isotipo IgM e IgG sobre los sueros control

Entre los 20 sueros control positivo se demostró positividad para IgM e IgG en todos ellos con el ensayo ELISA. El título de IgM presentó una mediana de 400 (IQR: 200 – 1.400) con un valor mínimo de 100 y un valor máximo de 1.600. El título de IgG tenía una mediana de 12.800 (IQR: 4.000 – 25.600) con un valor mínimo de 100 y un valor máximo de 51.200.

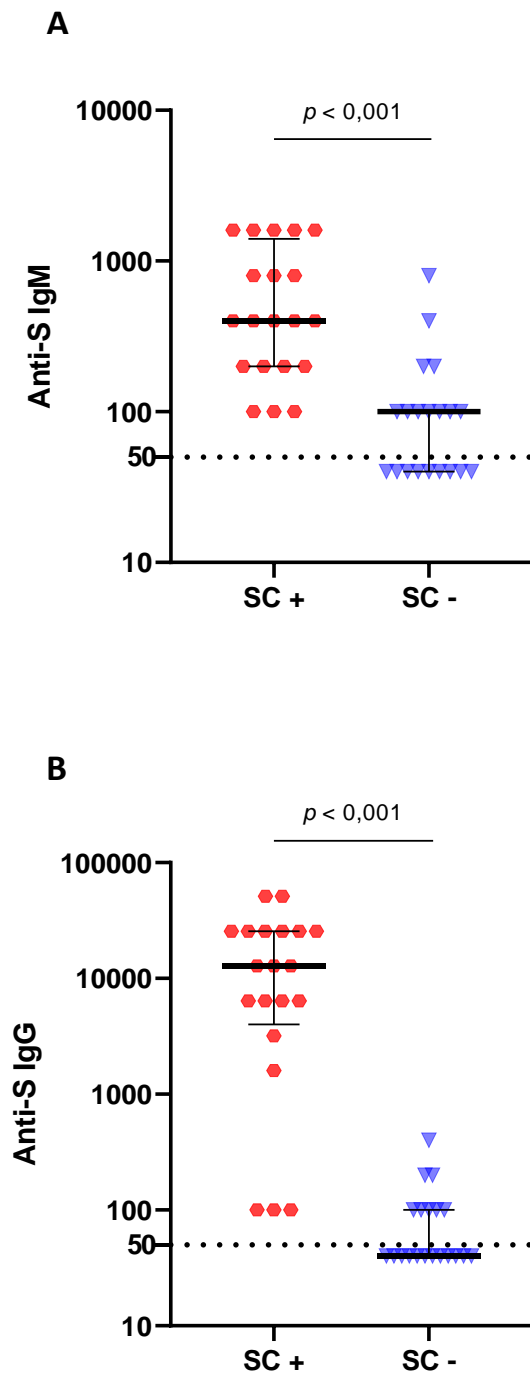
Entre los 20 sueros control negativo se evidenció positividad para IgM en el 55% (11/20) y positividad para IgG en el 40% (8/20). El título de IgM presentó una mediana de 100 (IQR: 40 – 100) con un valor mínimo de 40 y un valor máximo de 800. El título de IgG tenía una mediana de 40 (IQR: 40 – 100) con un valor mínimo de 40 y un valor máximo de 400.

La mediana del título de IgM de los controles positivos fue estadísticamente superior a la de los controles negativos (400 vs 100; $p < 0,001$). Igualmente, la del título de IgG también lo fue (12.800 vs 40; $p < 0,001$).

La representación gráfica del título de anticuerpos de isotipo IgM e IgG para los sueros controles positivo y negativo están plasmados en la figura 29.

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura S2. Títulos de IgM e IgG frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en los sueros control positivo (SC +) y control negativo (SC -). Los títulos de IgM se exponen en el panel A y los de IgG en el panel B. Los sueros control positivo se representan con hexágonos rojos (n=20), mientras que los sueros control negativo se representan con triángulos invertidos azules (n=20). El punto de cohorte de la técnica se indica mediante una línea discontinua en 50. La mediana y el rango intercuartílico se representan mediante líneas negras. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de U de Mann-Whitney. El eje de ordenadas se representa en escala logarítmica.



ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.3 Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM, IgG y subclases de IgG para predecir la actividad neutralizante del suero con su sensibilidad y especificidad

Tabla S1. Puntos de corte del título de IgM para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
29	100	0
35	99	5
70	99	13
150	99	27
300	98	44
500	93	62
700	92	62
1.200	76	79
2.400	49	95
4.800	33	100
9.600	19	100
19.200	5	100
38.400	2	100
51.201	0	100

Tabla S2. Puntos de corte del título de IgG1 para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
39	100	0
70	72	86
150	58	90
300	43	96
600	27	99

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

1.200	18	100
2.400	13	100
4.800	6	100
9.600	2	100
12.801	0	100

Tabla S3. Puntos de corte del título de IgG para predecir la actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
29	100	0
35	99	1
70	99	6
150	98	22
300	94	48
600	90	61
1.200	84	75
2.400	71	86
4.800	46	94
9.600	34	96
19.200	23	100
38.400	13	100
76.800	7	100
153.600	1	100
204.801	0	100

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.4 Puntos de corte de las curvas ROC del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con su sensibilidad y especificidad

Tabla S4. Puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con sus valores de sensibilidad y especificidad. En la cohorte total.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
2	100	0
7	45	46
11	45	48
13	35	48
15	33	50
16	30	50
17	30	52
19	28	53
20	25	53
21	25	56
23	25	58
25	25	58
26	25	61
28	25	63
29	25	64
30	25	66
31	25	68
32	25	68
34	23	68
35	20	70
38	20	71
42	20	72
44	18	73
46	18	73
48	18	74

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

51	18	75
54	15	75
57	15	76
58	13	76
59	13	77
64	13	78
70	13	78
72	10	78
76	10	79
79	10	80
84	10	81
95	10	83
102	10	83
108	8	83
113	8	84
115	8	85
117	8	86
121	8	87
131	8	88
140	5	88
141	5	88
143	5	89
167	5	90
201	5	91
228	5	92
245	5	93
250	5	93
282	5	94
361	5	95
426	5	96
474	3	96

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

511	3	97
546	0	97
615	0	98
770	0	98
1.001	0	99
1.116	0	100

Tabla S5. Puntos de corte del título de anticuerpos neutralizantes para predecir la mortalidad con sus valores de sensibilidad y especificidad. En los pacientes que desarrollaron FR.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
2	100	0
7	45	33
13	35	35
15	33	35
17	30	35
19	28	35
20	25	35
21	25	38
24	25	40
26	25	43
28	25	48
30	25	50
32	25	53
34	23	53
35	20	55
39	20	58
47	18	60
51	18	63

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

55	15	63
58	13	63
59	13	65
64	13	68
70	13	70
80	10	70
96	10	73
108	8	73
113	8	75
119	8	78
131	8	80
142	5	80
194	5	83
247	5	85
282	5	88
376	5	90
474	3	90
511	3	93
584	0	93
770	0	95
1.001	0	98
1.116	0	100

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

8.5 Puntos de corte de las curvas ROC del título de IgM e IgG para predecir la actividad neutralizante del suero tras la vacunación con su sensibilidad y especificidad

Tabla S6. Puntos de corte del título de IgM para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En inmunocompetentes vacunados.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
39	100	0
70	100	4
150	100	22
300	96	49
600	69	80
1.200	52	96
2.400	17	98
4.800	10	100
6.401	0	100

Tabla S7. Puntos de corte del título de IgM para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En TOS vacunados.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
39	100	0
70	95	31
150	95	53
300	89	73
600	63	89
1.200	37	99
2.400	21	100
3.201	0	100

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S8. Puntos de corte del título de IgG para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En inmunocompetentes vacunados.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
39	100	0
70	100	12
150	100	29
300	100	49
600	100	57
2.000	100	63
4.800	98	73
9.600	96	82
19.200	94	90
38.400	83	98
76.800	69	100
153.600	46	100
307.200	8	100
614.400	6	100
1.228.800	2	100
1.638.401	0	100

Tabla S9. Puntos de corte del título de IgG para predecir actividad neutralizante con sus valores de sensibilidad y especificidad. En TOS vacunados.

Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
39	100	0
70	100	15
150	100	37
300	100	62
600	100	75

ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

1.200	95	80
2.400	95	85
4.800	95	91
9.600	89	95
19.200	79	97
38.400	79	99
76.800	53	100
153.600	21	100
307.200	11	100
614.400	5	100
819.201	0	100

ANEXO II.
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

9. ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

9.1 Comunicaciones en congresos

- **XXV Congreso Nacional de la SEIMC (2-4 de junio, Granada - España).**

Comunicación oral: “Una elevada respuesta de IgM, IgG, IgG1 y Acs neutralizantes (AN) predice un menor riesgo de mortalidad en pacientes COVID-19 con fallo respiratorio”.

Autores: Octavio Carretero, Ana Tajuelo, Estéfani García-Ríos, Mireia López-Siles, Michael McConnell, Francisco Mancebo, Marcos Nuévalos, Rafael San-Juan, José María Aguado, Pilar Pérez-Romero.

Introducción: La respuesta inmune es fundamental para definir el curso de la infección por SARS-CoV-2. Aunque casi la totalidad de infectados desarrollan a las dos semanas IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes (AN) frente al virus, la magnitud de los mismos depende de las características de cada paciente y puede condicionar la severidad de la enfermedad.

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio transversal prospectivo en una cohorte de 160 pacientes adultos con COVID-19 en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Los pacientes fueron asignados a cuatro grupos clínicos según el grado de severidad de la infección: (1) fallo respiratorio y exitus, (2) fallo respiratorio y supervivencia, (3) precisaron oxigenoterapia pero no desarrollaron fallo respiratorio y (4) no precisaron oxigenoterapia. De ellos se extrajo una muestra de suero en el momento del ingreso, en la cual se determinaron los anticuerpos IgM, IgG, subclases de IgG y AN frente a la espícula del SARS-CoV-2. Los títulos de IgM, IgG y sus subclases se determinaron mediante un ensayo ELISA, mientras que el título de AN se midió mediante un ensayo de neutralización subrogada. Se analizaron las diferencias en el título de anticuerpos entre los grupos clínicos y la asociación entre las características clínicas y analíticas de los pacientes y los títulos de anticuerpos.

Resultados: Los pacientes con fallo respiratorio que sobrevivieron tuvieron un título de IgM cinco veces superior a los que fallecieron ($p = 0,001$). Los pacientes con fallo respiratorio que sobrevivieron tenían un título de IgG mayor que los que fallecieron ($p < 0,001$) y que aquellos que requirieron oxigenoterapia ($p < 0,05$). Estas diferencias fueron especialmente notables en la subclase IgG1; los pacientes con fallo respiratorio que sobrevivieron tuvieron un título de IgG1 cinco veces superior al de los que fallecían ($p < 0,001$) y al de los que recibieron oxigenoterapia ($p < 0,001$) y dos veces superior al de los que no requirieron oxigenoterapia ($p < 0,05$). Finalmente, los pacientes con fallo respiratorio que fallecieron tuvieron títulos de AN más bajos que los que no fallecieron ($p = 0,03$).

Se observó una elevada correlación entre el título de AN y los títulos de IgM ($\rho = 0,68$; $p < 0,001$). Realizando un análisis multivariante, se evidenció que los títulos de IgM ($B = 0,012$; (95% CI: 0,009-0,015) $p < 0,001$) e IgG1 ($B = 0,02$; (95% CI: 0,008-0,032) $p = 0,002$) eran las variables que mejor predecían el título de AN. No se observó correlación entre el título de AN y los días de ingreso hospitalario, o la necesidad de UCI o ventilación mecánica.

Conclusiones: Dentro de los pacientes que hicieron fallo respiratorio, aquellos que sobrevivieron fueron los que tuvieron un título de IgM, IgG, IgG1 y AN significativamente mayor. Las variables que mejor predijeron el título neutralizante fueron el título de IgM e IgG1. No se

observó que un mayor título de AN se relacionase con una menor estancia hospitalaria, ingreso en UCI o mayor duración de los días en ventilación mecánica.

9.2 Artículos publicados

- “Brief Research Report: Virus-Specific Humoral Immunity at Admission Predicts the Development of Respiratory Failure in Unvaccinated SARS-CoV-2 Patients” publicado en *Frontiers in Immunology*.



Brief Research Report: Virus-Specific Humoral Immunity at Admission Predicts the Development of Respiratory Failure in Unvaccinated SARS-CoV-2 Patients

OPEN ACCESS

Edited by:

David Sullivan,
The Johns Hopkins Hospital,
United States

Reviewed by:

Hyungh Yoon,
Albert Einstein College of Medicine,
United States
Rosal Gimrdin,
New York State Department of Health,
United States

*Correspondence:

Pilar Pérez-Romero
pperez@icil.es

[†]These authors share the first authorship

[‡]These authors contributed equally to this work and share the last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 18 February 2022

Accepted: 29 March 2022

Published: 25 April 2022

Citation:

Tajuelo A, Carretero O, García-Ríos E, López-Siles M, Cano O, Vázquez M, Mite V, Rodríguez-Goncer I, Lalueza A, López-Medrano F, Juan RS, Fernández-Ruiz M, Aguado JM, McConnell MJ and Pérez-Romero P (2022) Brief Research Report: Virus-Specific Humoral Immunity at Admission Predicts the Development of Respiratory Failure in Unvaccinated SARS-CoV-2 Patients. *Front. Immunol.* 13:878812. doi: 10.3389/fimmu.2022.878812

Ana Tajuelo^{1†}, Octavio Carretero^{2†}, Estéfani García-Ríos^{3,4}, Mireia López-Siles¹, Olga Cano⁵, Mónica Vázquez⁵, Vicente Más⁵, Isabel Rodríguez-Goncer², Antonio Lalueza^{6,7}, Francisco López-Medrano^{2,7,8}, Rafael San Juan^{2,7,8}, Mario Fernández-Ruiz^{2,7,8}, José M^o Aguado^{2,7,8}, Michael J. McConnell⁴ and Pilar Pérez-Romero^{3,4*}

¹Intrahospital Infections Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ²Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Madrid, Spain, ³Infecciones Víricas e Inmunidad en Enfermos Inmunodeprimidos, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ⁴Universidad Internacional de Valencia – VIU, Valencia, Spain, ⁵Biología Viral, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ⁶Department of Internal Medicine, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Madrid, Spain, ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain, ⁸Department of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Introduction: There is robust evidence indicating that the SARS-CoV-2-specific humoral response is associated with protection against severe disease. However, relatively little data exist regarding how the humoral immune response at the time of hospital admission correlates with disease severity in unimmunized patients. Our goal was to identify variables of the humoral response that could potentially serve as prognostic markers for COVID-19 progression in unvaccinated SARS-CoV-2 patients.

Methods: A prospective cross-sectional study was carried out in a cohort of 160 unimmunized, adult COVID-19 patients from the Hospital Universitario 12 de Octubre. Participants were classified into four clinical groups based on disease severity: non-survivors with respiratory failure (RF), RF survivors, patients requiring oxygen therapy and those not receiving oxygen therapy. Serum samples were taken on admission and IgM, IgG, IgG subclass antibody titers were determined by ELISA, and neutralizing antibody titers using a surrogate neutralization assay. The differences in the antibody titers between groups and the association between the clinical and analytical characteristics of the patients and the antibody titers were analyzed.

Results: Patients that developed RF and survived had IgM titers that were 2-fold higher than non-survivors ($p = 0.001$), higher levels of total IgG than those who developed RF and succumbed to infection ($p < 0.001$), and than patients who required oxygen therapy ($p < 0.05$), and had 5-fold higher IgG1 titers than RF non-survivors ($p < 0.001$) and those who

needed oxygen therapy ($p < 0.001$), and 2-fold higher than patients that did not require oxygen therapy during admission ($p < 0.05$). In contrast, RF non-survivors had the lowest neutralizing antibody levels, which were significantly lower compared those with RF that survived ($p = 0.03$). A positive correlation was found between IgM, total IgG, IgG1 and IgG3 titers and neutralizing antibody titers in the total cohort ($p \leq 0.0036$).

Conclusions: We demonstrate that patients with RF that survived infection had significantly higher IgM, IgG, IgG1 and neutralizing titers compared to patients with RF that succumb to infection, suggesting that using humoral response variables could be used as a prognostic marker for guiding the clinical management of unimmunized patients admitted to the hospital for SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID disease severity, humoral response, IgG, IgM 2

INTRODUCTION

Although most cases of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection are asymptomatic or manifest as mild disease, a significant proportion of patients develop severe disease, most commonly pneumonia that can progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and organ failure (1, 2). Severe SARS-CoV-2 infection is associated with high mortality (3, 4), and advanced age, male gender, high blood pressure, diabetes, obesity and chronic lung disease have been associated with severe disease (5). Additionally, immunological and biochemical variables such as the total number of neutrophils and lymphocytes, interleukin-6 (IL-6), C reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase, d-dimers or ferritin levels have been associated with respiratory failure and death (6, 7).

The host immune response is essential in determining the course of disease after SARS-CoV-2 infection by promoting viral clearance and resolution of infection (8). Most symptomatic patients develop virus-specific IgM and IgG within two weeks after the onset of symptoms (9–11). However, the magnitude of the response is heterogeneous depending on the characteristics of the patients and their clinical course (12–14). Previous results have shown a correlation between IgG titers and neutralizing antibody titers, which function by blocking the entry of the virus into host cells (15–17). Higher virus-specific IgM and IgG, and virus neutralizing antibody titers against SARS-CoV-2 have been reported in patients with severe symptoms (10, 18–22). In addition, it has been suggested that the timing of the appearance of these antibodies is an important factor that conditions disease progression and viral load (23, 24). Additionally, the presence of antibodies during the early phases of infection has been correlated with improved clinical outcomes (25) and protection against reinfection (26–31).

In the present study we assess anti-SARS-CoV-2 spike (S) protein antibodies (IgM, IgG, and IgG subclasses) and neutralizing antibody titers in serum obtained at the time of admission from a cohort of unvaccinated patients hospitalized for coronavirus disease 2019 (COVID-19). We characterize associations between these indicators of virus-specific humoral immunity at hospital admission and respiratory failure in

order to identify potential prognostic markers for COVID-19 progression.

MATERIALS AND METHODS

Patient Recruitment and Sample Collection

Within an institutional cohort of consecutive patients admitted at the University Hospital "12 de Octubre" (Madrid, Spain) for COVID-19 within the first wave (between March and April 2020) we carried out a "nested case-control study" randomly selecting four groups of similar size with four different outcomes [respiratory failure (S/N) and death (S/N)], in which a "single-point assessment at the time of hospital admission" of humoral immunity was performed.

Blood samples were collected at the time of hospital admission (up to five days after admission) and stored at -80°C until analysis. Serum samples were analysed at the Spanish National Centre for Microbiology (Majadahonda, Spain). Socio-demographic, epidemiological and infection-related variables were recorded. The study was approved by the local Ethics Committee for Clinical Research and was conducted following the Declaration of Helsinki and the Guidelines for Good Clinical Practice. Based on the exceptional situation caused by the pandemic, patients agree to participate but no informed consent was obtained, which was approved by the local Ethics Committee for Clinical Research.

Study Definitions

Respiratory failure (RF) was defined as the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS), defined as a partial pressure of arterial oxygen/fraction of inspired oxygen [$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio] ≤ 200 mmHg (32) or the need for mechanical ventilation. Cardiovascular disease was defined as the presence of coronary heart disease, heart failure and/or stroke. Chronic lung disease was defined as the presence of chronic obstructive pulmonary disease or severe obstructive sleep apnea.

Cohort participants were classified into four clinical groups according to the WHO Ordinal Scale for Clinical Improvement COVID-19 criteria (33). The group of non-survivors with RF

corresponded to score 8 (death), RF survivors corresponded to score 7-5 (ventilation and additional organ support or intubation or mechanical ventilation and non-invasive ventilation or high-flow oxygen), patients that required oxygen therapy corresponded to score 4 (oxygen by mask or nasal prongs) and the group of patients not receiving oxygen therapy corresponded to score 3 (hospitalized, no oxygen therapy).

Oxygen saturation was obtained from hospital admission and on room air.

Length of clinical course was defined as the elapse from the symptoms onset to the end of the clinical stay (hospital discharge or death). Length of hospital stay was defined as the elapsed time from the hospital admission to the end of the clinical stay (hospital discharge or death).

Laboratory Measurements

CRP, IL-6, albumin, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), ferritin, D-dimer, fibrinogen, triglycerides and procalcitonin levels, platelet, neutrophil, lymphocyte and monocyte counts were routinely measured during standard care. All laboratory measurements were performed on the same day at admission.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Recombinant S protein was produced by transient transfection of FreeStyle 293F cells (Thermo Fisher) using polyethylenimine and a plasmid coding for a HexaPro derived construct (34) that includes the D614G substitution. The S ectodomain was purified from filtered cell supernatants using HisTrap™ Excel columns (CYTIVA) and subjected to an additional purification step by size-exclusion chromatography using a Superose 6 10/300 column (CYTIVA).

For indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) 96-well plates (Corning) were coated overnight with 100 ng per well of purified recombinant S protein in PBS. Unbound proteins were removed by washing twice with 200 μ L of 0.1% Tween 20 in PBS (PBST). Blocking was performed with 100 μ L of PBST supplemented with 5% skim milk (PBSTM) for 1 h. After the wells were washed twice as detailed above, serial two-fold dilutions of serum samples (from 1:100 to 1:204800) were added and incubated for 1 h at room temperature (RT), followed by three washing steps with PBST. Then, 100 μ L of horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG (1:3000 dilution; 62-8420, Invitrogen), anti-human IgM (1:10000 dilution; A18841, Novex), anti-human IgG1 (1:1000 dilution; MH1715, Invitrogen), anti-human IgG2 (1:1000 dilution; MH1722, Invitrogen), anti-human IgG3 (1:5000 dilution; MA5-16718, Invitrogen) or anti-human IgG4 (1:1000 dilution; A10654, Invitrogen) were added to each well and incubated for 1 h at RT. After four washing steps with PBST, 100 μ L of horseradish peroxidase substrate (54827-17-7, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 15 min at RT. The reaction was stopped using 50 μ L 1 N sulfuric acid. Absorbance at 450 nm was measured using a plate reader (Tecan Sunrise). Titers were defined as the highest dilution of serum at which the OD₄₅₀ was at least 0.2 above background wells (wells without serum).

ACE-2/S Protein Inhibition Assay

To evaluate the potential neutralizing activity of antibodies, S protein binding competition assays between the serum samples and a monomeric form of the human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) were performed. Briefly, microtiter 96-well plates were coated with a chimeric version of a monodonal anti-Foldon antibody (35) overnight at 8 ng/ μ L in PBS. The next day, plates were blocked with PBS supplemented with BSA fraction V (Sigma) at 1% (PBS-BSA 1%). Then, purified Hexapro (34) derived construct containing the D614G substitution was captured by incubation at 1 ng/ μ L in PBS-BSA 1% during 45 min at RT. Following protein incubation, plates were washed with PBS, and successive incubations at RT of sera dilutions and hACE-2 monomeric-StrepTag receptor (20 ng/ μ L) complexed with StrepTactin-HRP (1:5000) were performed. Sera incubation was prolonged for 45 min and after a 15 min incubation of receptor-StrepTactin HRP complexes, receptor binding to captured S protein was revealed with the OPD substrate (Sigma Aldrich), and the signal was measured in a spectrophotometer reading OD at 493-620 nm. Assay background was determined in parallel plates with a S protein locked in the closed conformation that is unable to bind the hACE-2 receptor. For this purpose, a purified HexaPro derived construct including a double cysteine substitution, S383C:D985C, was used. A pool of sera from individuals negative for anti-SARS-CoV-2 antibodies and hACE-2 monomeric untagged receptor were used as negative and positive controls, respectively. After subtraction of the background, the percentage of neutralization was calculated as $[1 - (OD_{493-620} \text{ test serum} / OD_{493-620} \text{ negative control})] \times 100\%$. In all experiments incubation of hACE-2 untagged receptor at 200 ng/ μ L achieved a neutralization rate higher than 85%.

Statistical Analyses

Patients were considered SARS-CoV-2 seropositive if antibody titers determined by ELISA were higher than 50 (limit of detection of the assay) and they were considered to have positive neutralizing antibodies if the titer was greater than 3.3 (36). Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables with parametric distribution or the median with interquartile range (IQR) for those with non-parametric distribution. Spearman's correlation coefficients and *P*-values were calculated to evaluate the correlation between quantitative variables. Comparison of antibody titers between groups was performed using the Kruskal-Wallis test. Subsequent pairwise analyses between disease severity groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. Non-parametric statistical tests were used given the non-normal distribution of the data and the lack of homoscedasticity as assessed by Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Statistical analyses and data plotting were performed using Prism 5 v.5.01 (GraphPad Software) and SPSS (IBM). *P*-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cohort Characteristics

Global characteristics of the four different clinical groups included in the study (RF non-survivors, RF survivors, oxygen

therapy and non-oxygen therapy) are shown in **Table 1** and **Supplementary Table 1**. The median age of the cohort was 61 years (IQR: 49.25-75) with 68.8% (110/160) of male patients and 70% (112/160) of Caucasian race. The age of RF non-survivors was significantly higher compared to the other three clinical groups ($P < 0.001$). The most frequent comorbidities were hypertension (35.6%), dyslipidemia (27.5%), diabetes (20%), cardiovascular disease (15.6%) and chronic lung disease (6.3%). As expected, the group of RF non-survivors had a significantly higher proportion of patients with hypertension ($p = 0.035$), chronic lung disease ($p = 0.006$) and diabetes ($p = 0.043$) than the other clinical groups. This group also had significantly ($p < 0.001$) lower oxygen saturation compared to the other three groups, while the group of RF survivors had significantly higher levels of LDH, CRP, AST and leukocyte and neutrophil counts ($p < 0.001$). No significant differences were observed in days from symptom onset to hospital admission or the timing of sampling across each of the clinical groups.

Humoral Response and Disease Severity

The magnitude of the humoral response at the time of admission was characterized for all patients by determining endpoint titers for SARS-CoV-2 IgM and total IgG and IgG subclasses (**Figure 1**). IgM titers ranged from 100 to 51200, and eleven samples had IgM titers below the limit of detection. Patients that developed RF and survived had IgM titers 2-fold higher than non-survivors ($p = 0.001$), whereas no significant differences in IgM titers were observed when compared with other subgroups. Patients that developed RF and survived also had higher levels of total IgG than those who developed RF and succumbed to infection ($p < 0.001$), and that patients who required oxygen therapy ($p < 0.05$). IgG titers ranged from 100 to 204800 and six patients had titers below the limit of detection at admission.

Regarding IgG subclasses, 44.38% of patients had detectable levels of IgG1, and 38.75% had detectable levels of IgG3. While no significant differences were found in the IgG3 titers between groups, the group of RF survivors had 5-fold higher IgG1 titers than RF non-survivors ($p < 0.001$) and those who needed oxygen therapy ($p < 0.001$), and 2-fold higher than patients that did not require oxygen therapy during admission ($p < 0.05$).

Surrogate neutralization assays were performed in order to characterize the functional activity of the antibodies present in patient samples at the time of admission. Neutralizing antibodies were detected in 51.9% of patients, with titers ranging from 10 to 1115 (**Figure 1**). Subjects within the group of RF non-survivors had the lowest level of neutralizing antibodies, that were significantly lower compared with those with RF that survived ($p = 0.03$).

Our analysis also allowed us to determine the effect of time from symptom onset on antibody and neutralizing titers. Serum samples from patients were extracted at hospital admission, but within a variable number of days from self-reported symptom onset. In order to characterize the effect of time from symptom

onset to antibody levels, antibody levels and neutralizing activity were analyzed between patients with samples collected within the first 9 days of symptoms (early serum sampling, $n = 94$) and those whose samples were collected from ten days of symptoms (late serum sampling, $n = 66$). In the total cohort, IgM and IgG titers were significantly higher in patients with late serum sampling ($p < 0.01$) (**Figure 2**). When considering the different clinical groups, RF survivors had higher IgM titers than non-survivors ($p < 0.05$), regardless the timing of sampling. However, when analyzing IgG titers, this significant difference was also observed in patients with late ($p < 0.05$) but not with early serum sampling (**Figure 2**). Regarding neutralizing activity, 37.2% of patients with early serum sampling presented neutralizing antibodies and the titer was lower than in patients with late serum sampling (72.7% $p < 0.001$) (**Figure 2**).

Correlation Between Antibody Response and Neutralizing Activity by Disease Severity

Correlation between IgM, total IgG, IgG1 and IgG3 titers and neutralizing antibody titers was assessed in the total cohort and in each disease group (**Supplementary Figure 1**), and in all cases a positive and significant correlation was found. However, differences in the correlation coefficient were observed. Specifically, the highest coefficient between IgM and neutralizing antibodies titers was found in the group of RF non-survivors ($\rho = 0.7287$). In contrast, the highest correlation coefficient between total IgG and neutralizing antibodies titers was observed in the group that required oxygen therapy ($\rho = 0.5625$). Regarding IgG subclasses, the highest correlation coefficient between neutralizing antibodies and IgG3 titers was also found in the group that required oxygen therapy ($\rho = 0.6182$), whereas for IgG1 and neutralizing antibodies titers the highest correlation coefficient was in the group of RF survivors ($\rho = 0.6218$).

Clinical Variables Associated With a Neutralizing Antibody Response

The most meaningful correlations with neutralizing titer were observed for IgM titer ($\rho = 0.68$; $p < 0.001$) and IgG titer ($\rho = 0.65$; $p < 0.001$), specifically IgG1 titer ($\rho = 0.64$; $p < 0.001$) and IgG3 titer ($\rho = 0.61$; $p < 0.001$). Neutralizing titers also correlated with oxygen saturation ($\rho = -0.20$; $p = 0.013$), LDH ($\rho = 0.28$; $p < 0.001$), CRP ($\rho = 0.33$; $p < 0.001$), leukocyte count ($\rho = 0.35$; $p < 0.001$), neutrophil count ($\rho = 0.39$; $p < 0.001$), platelet count ($\rho = 0.27$; $p < 0.001$), ALT ($\rho = 0.19$; $p = 0.014$), procalcitonin ($\rho = 0.31$; $p = 0.015$), ferritin ($\rho = 0.21$; $p = 0.014$), fibrinogen ($\rho = 0.41$; $p < 0.001$) and D-dimers ($\rho = 0.21$; $p = 0.034$). In addition, patients who received tocilizumab had higher neutralizing titers than those who did not [28 (IQR: 0-113.5) vs 0 (IQR: 0-33.3); $p = 0.012$]. There was no correlation between neutralizing antibody titers and days from admission or the length of invasive mechanical ventilation (IMV) or intensive care unit (ICU) admission. In patients with early serum sampling, the

ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Tajado et al.

Humoral Immunity and SARS-CoV-2 Severity

TABLE 1 | Demographic, clinical and analytical characteristics at hospital admission.

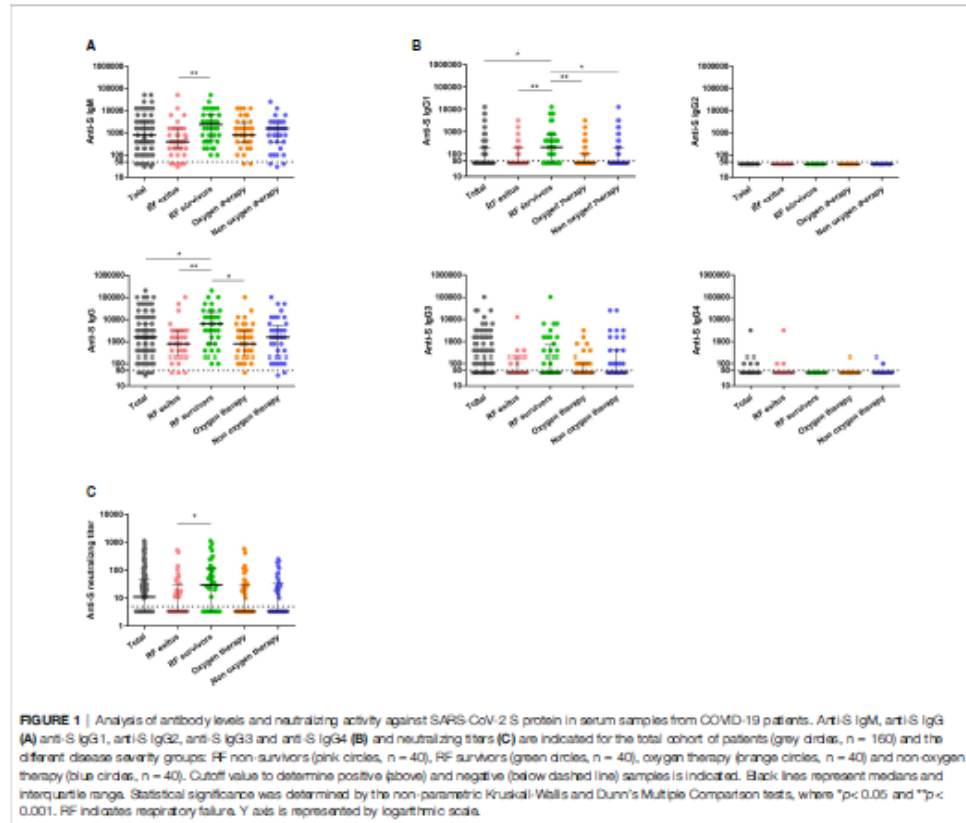
Characteristics	Total (N=160)	RF non-survivors (n=40)	RF survivors (n=40)	Oxygen therapy (Non RF) (n=40)	Non Oxygen therapy (n=40)	p-value
Age (y), median (IQR)	61 (49.25-70)	76.5 (68.75-83)	55 (47-60)	65 (48.75-75.75)	51.5 (43-57)	<0.001
Sex, male, no. (%)	110 (68.8%)	29 (72.5%)	30 (75%)	28 (70%)	23 (57.5%)	0.337
Race, no. (%)						0.287
Caucasian	112 (70%)	34 (85%)	22 (55%)	28 (70%)	28 (70%)	
Hispanic	43 (26.9%)	6 (15%)	15 (37.5%)	10 (25%)	12 (30%)	
Others	5 (3.1%)	0 (0%)	3 (7.5%)	2 (5%)	0 (0%)	
Comorbidities, no. (%)						
Hypertension	57 (35.6%)	19 (47.5%)	16 (40%)	15 (37.5%)	7 (17.5%)	0.035
Cardiovascular disease	25 (15.6%)	10 (25%)	5 (12.5%)	7 (17.5%)	3 (7.5%)	0.167
Chronic pneumopathy	10 (6.3%)	7 (17.5%)	1 (2.5%)	2 (5%)	0 (0%)	0.006
Diabetes	32 (20%)	13 (32.5%)	9 (22.5%)	7 (17.5%)	3 (7.5%)	0.043
Dyslipidemia	44 (27.5%)	15 (37.5%)	8 (20%)	11 (27.5%)	10 (25%)	0.263
Obesity	55 (33.8%)	19 (47.5%)	15 (37.5%)	11 (27.5%)	10 (25%)	0.161
*data not available in all cases	N=127	n=33	n=32	n=32	n=30	
Smoking	11 (7.2%)	2 (5.1%)	4 (10%)	3 (7.5%)	2 (5.3%)	0.795
*data not available in all cases	N=152	n=39	n=40	n=35	n=38	
Naplastia	15 (9.4%)	6 (15%)	2 (5%)	4 (10%)	3 (7.5%)	0.462
Charlson comorbidity index, median (IQR)	2 (1-4)	4 (3-6)	2 (1-3)	2.5 (1-4)	1 (0-2)	<0.001
Analytical characteristics §						
Oxygen saturation (%)	92 (88-96)	88 (83.25-90)	90 (85-92)	94 (91-96)	98 (95-99)	<0.001
*data not available in all cases	N=159	n=40	n=39	n=40	n=40	
LDH level (U/L)	379.5 (304.5-493.3)	443 (377.75-590.25)	494 (392-621)	335 (303.75-389.5)	290 (235.5-372)	<0.001
CRP level (mg/dL)	10.93 (4.75-18.03)	15.44 (10.74-23.57)	18 (9.87-25.53)	8.86 (3.9-12.34)	3.73 (1.62-7.66)	<0.001
ALT level (U/L)	32 (21-50)	30.5 (20-45.8)	42 (28-70.3)	29 (20.3-62.5)	29 (17-52)	0.07
*data not available in all cases	N=159	n=40	n=40	n=40	n=39	
AST level (U/L)	42.5 (30-62.8)	51 (37.8-70)	53 (39.3-74.5)	35.5 (30-59)	28 (24-47.5)	<0.001
Albumin level (g/dL)	3.8 (3.4-4.1)	3.6 (3.3-3.9)	3.6 (3.3-4.0)	3.9 (3.5-4.2)	4.1 (3.8-4.4)	<0.001
*data not available in all cases	N=151	n=39	n=38	n=37	n=37	
Ferritin level (ng/mL)	990 (508-1792)	1532 (739-2254)	1664 (978.3-2096.7)	784 (449.5-1422.5)	522.9 (201.3-840.3)	<0.001
*data not available in all cases	N=143	n=35	n=34	n=35	n=38	
Leucocyte count (x 10 ³ cells/μL)	6.1 (4.8-7.7)	6.1 (4.6-8.8)	7.2 (5.7-11.1)	5.8 (4.3-7.1)	5.4 (4.5-6.5)	<0.001
Neutrophil count (x 10 ³ cells/μL)	4.5 (3.3-6.2)	5 (3.4-7.4)	5.9 (4.4-9.5)	4.2 (2.9-5.8)	3.8 (2.7-4.5)	<0.001
Lymphocyte count (x 10 ³ cells/μL)	0.8 (0.5-1.2)	0.7 (0.6-1.05)	0.8 (0.6-1.1)	0.9 (0.53-1.2)	1 (0.7-1.38)	0.054
COVID-19 treatment on serum extraction, no. (%)						
Hydroxychloroquine	152 (95%)	37 (92.5%)	40 (100%)	38 (95%)	37 (92.5%)	0.368
Lopinavir/ritonavir	109 (68.8%) n=127	27 (67.5%) n=32	30 (75%) n=31	24 (60%) n=29	28 (70%) n=35	0.230
*data not available in all cases						
FN-b	32 (20.3%) n=158	16 (40%) n=40	12 (30.8%) n=39	2 (5.1%) n=39	2 (5%) n=40	<0.001
*data not available in all cases						
Tocilizumab	36 (22.5%)	8 (20%)	19 (47.5%)	7 (17.5%)	2 (5%)	<0.001
Corticosteroids	76 (47.5%)	26 (65%)	31 (77.5%)	14 (35%)	5 (12.5%)	<0.001
Time from onset of symptoms to hospital admission (d), median (IQR)	6 (4-8)	6 (4.25-8)	6 (4-7)	6 (5-8)	6.5 (4-9.75)	0.885
Time from onset of symptoms to serum extraction (d), median (IQR)	9 (7-11)	9 (6.25-11)	8 (7-10)	9 (7-10)	9 (6-11.75)	0.970
Length of clinical course (d), median (IQR)	17 (12-25)	14 (11-20)	27.5 (22-38.5)	17 (12.25-24.75)	13 (9.25-16)	<0.001

RF, respiratory failure; § represented median and interquartile range. Bold values indicate statistically significant.

variables with the highest correlation with neutralizing titer continued to be IgM ($p = 0.67$; $p < 0.001$) and IgG ($p = 0.65$; $p < 0.001$), and within this, IgG1 ($p = 0.66$; $p < 0.001$) and IgG3 ($p = 0.58$; $p < 0.001$) titers.

We performed a multivariate analysis including those variables that had significant association with neutralizing antibody titers in the univariate analysis (Supplementary

Table 2). We found that IgM ($B = 0.012$; (95% CI: 0.009-0.015) $p < 0.001$) and IgG1 titer ($B = 0.02$; (95% CI: 0.008-0.032) $p = 0.002$) were the variables that best predicted neutralizing antibody titer. In the case of patients with early samples, IgM titer ($B = 0.009$; (95% CI: 0.007-0.011) $p < 0.001$) and IgG1 titer ($B = 0.033$; (95% CI: 0.013-0.052) $p = 0.001$) were the best predictors of neutralizing antibody titer.



Correlation Between the Humoral Response and Age, Time Since Admission and Symptom Onset

To better understand the dynamics of the humoral response, total IgM and IgG levels were correlated with age, days since admission and time from symptom onset (Supplementary Figure 2). When considering the total cohort, a negative correlation was observed between both IgM and IgG and age ($p = 0.0004$ and $p = 0.0462$, respectively). This negative association was maintained only for IgM in the group that required oxygen therapy ($p = 0.030$). IgM and IgG titers showed a positive correlation with days from admission ($p = 0.0008$ and $p = 0.0014$, respectively) and from symptom onset ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) when considering the total cohort. Interestingly, patients with RF featured a positive correlation between both IgM and IgG titers during the first five days since admission, regardless of the clinical endpoint (survivors or non-survivors). A positive correlation

between IgM ($p = 0.0009$) and IgG ($p = 0.028$) levels and days after symptom onset was observed for patients that required oxygen therapy. In addition, a positive correlation between IgG levels and time post-symptom onset was observed in subjects that did not require oxygen therapy ($p = 0.007$).

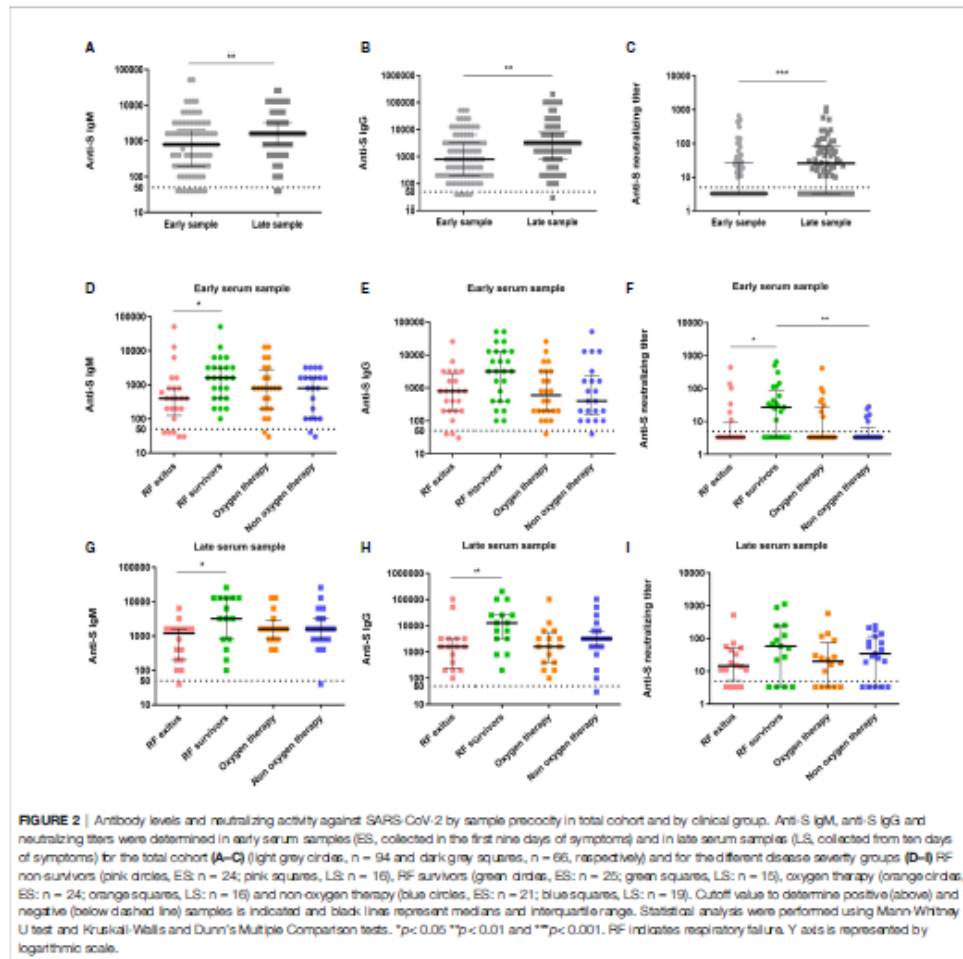
DISCUSSION

In the present study we characterized the virus-specific humoral response at the time of hospitalization in unvaccinated SARS-CoV-2 patients that presented different disease severities. Our results demonstrate that patients experiencing RF that survive infection have significantly higher anti-S protein IgM and IgG titers at the time of hospital admission compared to patients with RF that succumb to COVID-19. Additionally, non-survivors with RF demonstrated significantly lower neutralizing titers compared

ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Tajado et al.

Humoral Immunity and SARS-CoV-2 Severity



to patients with respiratory failure that survived. Taken together, these results indicate a protective role for S-protein specific and neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 patients with respiratory failure, and is in line with findings from previous studies (26, 28–31, 37–39). Interestingly, patients experiencing RF that survived infection also demonstrated significantly higher anti-S protein IgG, but not IgM or neutralizing antibodies, compared to hospitalized patients requiring only oxygen therapy. This result may seem paradoxical in that patients with more severe disease demonstrated higher IgG titers than patients with less severe infections. However, similar results were found in a recent study by Yates et al. (8), in which unvaccinated patients with more

severe disease had higher virus-specific and neutralizing antibody titers than patients with less severe infection (8). These results, as well as the results from our study, may suggest that patients experiencing more invasive disease mount a more robust humoral response to infection. These results should also be interpreted in the context of COVID-19 disease phase. The early appearance of IgM in the cohort groups likely corresponds to the viral phase, and these antibodies may play an important role in virus clearance. The latter IgG predominant response may be due to systemic inflammation and advanced disease.

Although there is robust evidence indicating that a humoral response directed against the SARS-CoV-2 S-protein, acquired

either through vaccination or natural infection, is protective against severe infection (40, 41), there is only limited data regarding the association between S-protein specific IgG subclasses after infection and disease severity in unimmunized hospitalized patients (42). Furthermore, information regarding how IgG subclasses at the time of hospital admission correlate with disease severity is limited. In this study, we demonstrate that IgG1 and IgG3 are the predominant IgG subclasses produced after viral infection in all disease severity groups. This is in line with recent reports indicating that these IgG subclasses predominate after natural infection with SARS-CoV-2 (8, 43, 44), and previous reports indicating that these subclasses predominate after viral infections (45). Importantly, these previous studies also demonstrate very low titers of virus-specific IgG2 and IgG4 (8, 43, 44), similar to our results in the present study. A separate study demonstrated a predominance of IgG1 in healthcare workers after natural infection, similar to our results, but indicated that IgG2 titers were the second highest, followed by IgG3 and IgG4 (46). These differences may be due to differences in characteristics of the cohorts (hospitalized patients vs. healthcare workers) and in disease severity.

Our study also allowed us to assess associations between IgG subclasses and disease severity and neutralizing antibody titers in this patient population. Our results indicate that, similar to what was observed with total anti-S protein antibody titers, IgG1 titers were higher in patients with RF that survived infection compared to patients with RF that succumbed to infection and patients receiving oxygen therapy. In contrast to what was observed with total IgG, IgG1 titers were also significantly higher in patients with RF that survived infection compared to hospitalized patients that did not receive oxygen therapy. There were no other significant differences for the other IgG subclasses between diseases severity groups, although it is important to note that for IgG2 and IgG4 there was not a sufficient number of patients with detectable titers to perform a robust analysis. With respect to the correlation between anti-S protein antibody titers and neutralizing titers, positive correlations were observed for IgM, IgG, IgG1 and IgG3 in samples taken at the time of admission. These findings are in line with previous studies indicating that antibodies against the S protein correlate well with neutralization (47–50).

One limitation of this study is that in a small percentage of patients the serum sample was not collected on the same day of admission and the association of antibody titers with the analytical parameters may not be exact. In addition, clinical groups were not established as a function of age, which is a well-established as a major risk factor for mortality in COVID-19. And finally, another limitation is that this study was carried out before the widespread dissemination of variants of concern that currently produce most infections globally, including the delta and omicron variants. The humoral response to these variants may be different than those assessed in this study, and resulting associations between disease severity and different variables of the immune response such as IgG, IgM and neutralizing titers may be different in unimmunized patients admitted to the hospital setting with infections caused by these variants. Further study is warranted in this area.

In conclusion, this study establishes correlations between COVID-19 severity and different variables of the humoral immune response at the time of hospital admission in unvaccinated patients. Our findings demonstrate that patients with RF that survived infection demonstrated significantly higher IgM, IgG, IgG1 and neutralizing titers compared to patients with RF that succumb to infection, suggesting that the humoral response plays a critical role in these patients, and raise the possibility of using humoral response variables as prognostic markers for guiding the clinical management of unimmunized patients admitted to the hospital for SARS-CoV-2 infection.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics committee for Clinical Investigation Hospital 12 de Octubre. Code: 20/269 Date:26/05/2020. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IR-G, AL, FL-M, RJ, MF-R, JA: Provided patient care, selected the patients for the study and recruited samples, revised final version of the manuscript. JA: Study supervision, obtained funding, revised final version of the manuscript. AT: Performed ELISA assays and results analysis, manuscript draft. OCa: Samples recruitment and processing, clinical data analysis, neutralization assays and manuscript draft. EG-R: Surrogate neutralization assays optimization, results analysis support, manuscript draft. ML-S: Assistance in ELISA assays and results analysis, manuscript draft. VM, OCa, MV: Assistance in ELISA and neutralization assays, revised final version of the manuscript. MM: Conceived and supervised the study, drafted the manuscript. PP-R: Conceived and supervised the study, drafted the manuscript, obtained funding

FUNDING

This work was supported by Mutua Madrileña Foundation (2020/0056) "Plan Nacional de I+D+I" and Instituto de Salud Carlos III (COVID-19 Research Call COV20/00181 and COV20_00679), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Spanish Ministry of Science and Innovation, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016) - co-financed by the European

Development Regional Fund (EDRF) and the European Social Fund (ESF) "A way to achieve Europe- The ESF invests in your future". Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), CB21/13/00079. EG-R is supported by the Sara Borrell Program (CD18CIII/00007), MLS is supported by the Sara Borrell Program (CD17CIII/00017), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades., and AT is supported by the Garantía Juvenil Program of the Comunidad Autónoma de Madrid. IRG holds a research training contract "Río Hortega" (CM19/00163) and MFR a research contract

"Miguel Servet" (CP18/00073), both from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.878812/full#supplementary-material>

REFERENCES

- 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* (2020) 323(11):1061–9. doi: 10.1001/jama.2020.1585
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* (2021) 19(3):141–54. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients With SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study. *Lancet Respir Med* (2020) 8(5):475–81. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
- Desai ZG, Zewotir T. Mortality-Related Risk Factors of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of 42 Studies and 423,117 Patients. *BMC Infect Dis* (2021) 21(1):855. doi: 10.1186/s12879-021-06536-3
- Singh AK, Gillies CL, Singh R, Singh A, Chudasama Y, Coles R, et al. Prevalence of Co-Morbidities and Their Association With Mortality in Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Obes Metab* (2020) 22(10):1915–24. doi: 10.1111/dom.14124
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients With Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* (2020) 27(6):992–1000.e3. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.009
- Laguna-Goya R, Utrero-Rico A, Talayero P, Lasa-Lazaro M, Ramirez-Fernandez A, Naranjo I, et al. IL-6-Based Mortality Risk Model for Hospitalized Patients With COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* (2020) 146(4):799–807.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2020.07.009
- Yates JL, Ehrbar DJ, Hunt DT, Girardin RC, Dupuis AP, Payne AF, et al. Serological Analysis Reveals an Imbalanced IgG Subclass Composition Associated With COVID-19 Disease Severity. *Cell Rep Med* (2021) 2(7):100329. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100329
- Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A Systematic Review of Antibody Mediated Immunity to Coronaviruses: Kinetics, Correlates of Protection, and Association With Severity. *Nat Commun* (2020) 11(1):4704. doi: 10.1038/s41467-020-18450-4
- Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With COVID-19. *Nat Med* (2020) 26(6):845–8. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
- Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, et al. Clinical and Immunological Assessment of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections. *Nat Med* (2020) 26(8):1200–4. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* (2020) 71(16):2027–34. doi: 10.1093/cid/cia344
- Mueller YM, Schrama J, Ruijten R, Schreurs MWJ, Graaf DGB, van de Werken HJG, et al. Stratification of Hospitalized COVID-19 Patients Into Clinical Severity Progression Groups by Immuno-Phenotyping and Machine Learning. *Nat Commun* (2022) 13(1):915. doi: 10.1038/s41467-022-28621-0
- Dogan M, Kocbaya I, Placki L, Gunter C, Yigit M, Hardy R, et al. SARS-CoV-2 Specific Antibody and Neutralization Assays Reveal the Wide Range of the Humoral Immune Response to Virus. *Commun Biol* (2021) 4(1):129. doi: 10.1038/s42003-021-01649-6
- Okba NMA, Miller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis* (2020) 26(7):1478–88. doi: 10.3201/eid2607.200841
- To KK, Tang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses During Infection by SARS-CoV-2: An Observational Cohort Study. *Lancet Infect Dis* (2020) 20(5):565–74. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1
- Macioka AK, La Raja M, Pacenti M, Salata C, De Silvestro G, Rosato A, et al. Neutralizing Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Recovered COVID-19 Patients Are Variable and Correlate With Disease Severity and Receptor-Binding Domain Recognition. *Front Immunol* (2022) 13:830710. doi: 10.3389/fimmu.2022.830710
- Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, van Looy B, van den Berge M, Veenemans J, et al. Differences in Antibody Kinetics and Functional Activity Between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections. *J Infect Dis* (2020) 222(8):1265–9. doi: 10.1093/infdis/jia463
- Lynch KL, Whitman JD, Lacaenieta NP, Beckerdite EW, Kastner SA, Shy BR, et al. Magnitude and Kinetics of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Responses and Their Relationship to Disease Severity. *Clin Infect Dis* (2021) 72(2):301–8. doi: 10.1093/cid/cia979
- Wang X, Gao X, Xin Q, Pan Y, Hu Y, Li J, et al. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients. *Chin Infect Dis* (2020) 71(10):2688–94. doi: 10.1093/cid/cia721
- Zohar T, Looi C, Fischinger S, Atyeo C, Wang C, Slein MD, et al. Compromised Humoral Functional Evolution Tracks With SARS-CoV-2 Mortality. *Cell* (2020) 183(6):1508–19.e12. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.052
- Klein SL, Pelosoz A, Park HS, Urán R, Shapiro JR, Benner SE, et al. Sex, Age, and Hospitalization Drive Antibody Responses in a COVID-19 Convalescent Plasma Donor Population. *J Clin Invest* (2020) 130(11):6141–50. doi: 10.1172/JCI142004
- Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, Kwan MYW, Chan WH, Chiu SS, et al. Neutralizing Antibody Titres in SARS-CoV-2 Infections. *Nat Commun* (2021) 12(1):63. doi: 10.1038/s41467-020-20247-4
- Masiá M, Telenti G, Fernández M, García JA, Aguiló V, Padilla S, et al. SARS-CoV-2 Seroreversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized With COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response. *Open Forum Infect Dis* (2021) 8(2):ofab005. doi: 10.1093/ofid/ofab005
- Dispensieri S, Secchi M, Pirillo MF, Tolazzi M, Borghi M, Bigazzi C, et al. Neutralizing Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Symptomatic COVID-19 Is Persistent and Critical for Survival. *Nat Commun* (2021) 12(1):2670. doi: 10.1038/s41467-021-22958-8
- Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing Antibody Levels Are Highly Predictive of Immune Protection From Symptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Nat Med* (2021) 27(7):1205–11. doi: 10.1038/s41591-021-01377-8
- Harvey RA, Bassen JA, Kabelac CA, Turenne W, Leonard S, Kleih R, et al. Association of SARS-CoV-2 Seropositive Antibody Test With Risk of Future Infection. *JAMA Intern Med* (2021) 181(5):672–9. doi: 10.1001/jamainternmed.2021.0366
- Yang HS, Racine-Bronstek SE, Karbachi M, Yee J, Dillard A, Steel PAD, et al. Testing-On-a-Probe Biosensors Reveal Association of Early SARS-CoV-2 Total Antibodies and Serum Neutralizing Antibodies With Mortality in COVID-19 Patients. *Biosens Bioelectron* (2021) 178:113008. doi: 10.1016/j.bios.2021.113008

29. Abu-Raddad IJ, Chemaitelly H, Coyle P, Malek JA, Ahmed AA, Mohamad YA, et al. SARS-CoV-2 Antibody-Positivity Protects Against Reinfection for at Least Seven Months With 95% Efficacy. *EClinicalMedicine* (2021) 35:100861. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100861
30. Addetia A, Crawford KHD, Dinges A, Zhu H, Roychoudhury P, Huang M-L, et al. Neutralizing Antibodies Correlate With Protection From SARS-CoV-2 in Humans During a Fishery Vessel Outbreak With a High Attack Rate. *J Clin Microbiol* (2020) 58(11):e02107-20. doi: 10.1128/JCM.02107-20
31. Legros V, Denolly S, Vogt M, Boxon B, Siet E, Rigault J, et al. A Longitudinal Study of SARS-CoV-2 in Infected Patients Reveals a High Correlation Between Neutralizing Antibodies and COVID-19 Severity. *Cell Mol Immunol* (2021) 18(2):318–27. doi: 10.1038/s41423-020-00588-2
32. Foxe TADT. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* (2012) 307(23):2526–33. doi: 10.1001/jama.2012.5669
33. World Health Organization. COVID Therapeutic Trial Synopsis. COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. Geneva, Switzerland (2020). Available at: <https://www.who.int/publications/ititem/covid-19-therapeutic-trial-synopsis>
34. Häehli CL, Goldsmith JA, Schaub JM, DiVenere AM, Kuo HC, Javanmardi K, et al. Structure-Based Design of Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spikes. *Science* (2020) 369(6510):1501–5. doi: 10.1126/science.abb0826
35. Battles MB, Más V, Olmedillas E, Cano O, Vázquez M, Rodríguez L, et al. Structure and Immunogenicity of Pre-Fusion-Stabilized Human Metapneumovirus F Glycoprotein. *Nat Commun* (2017) 8(1):1528. doi: 10.1038/ncom1467-017-01708-9
36. Arroyo-Sánchez D, Cabeza-Maranante Q, Laguna-Goya R, Almiendo-Vázquez F, Carretero O, Gil-Estay FJ, et al. Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Vaccines in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol* (2022) 42(2):240–52. doi: 10.1007/s10875-021-01174-5
37. González-Rovira R, Giménez E, Latorre V, Pascual-Gómez C, Albert E, Buesa J, et al. SARS-CoV-2 Antibodies, Serum Inflammatory Biomarkers and Clinical Severity of Hospitalized COVID-19 Patients. *J Clin Virol* (2020) 131:104611. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104611
38. Martín-Vicente M, Almansa R, Martínez I, Tedim AP, Butamante E, Tamayo L, et al. Low Anti-SARS-CoV-2 S Antibody Levels Predict Increased Mortality and Dissemination of Viral Components in the Blood of Critical COVID-19 Patients. *J Intern Med* (2022) 291(2):232–40. doi: 10.1111/jim.13386
39. Chen X, Pan Z, Yue S, Yu F, Zhang J, Yang Y, et al. Disease Severity Dictates SARS-CoV-2-Specific Neutralizing Antibody Responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5(1):180. doi: 10.1038/s41392-020-00301-9
40. Rose R, Neumann F, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, Knibbholz A. Humoral Immune Response After Different SARS-CoV-2 Vaccination Regimens. *BMC Med* (2022) 20(1):31. doi: 10.1186/s12916-021-02231-x
41. Wang Z, Muehlebach F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gabler C, et al. Naturally Enhanced Neutralizing Breadth Against SARS-CoV-2 One Year After Infection. *Nature* (2021) 595(7867):426–31. doi: 10.1038/s41586-021-03696-9
42. Lao H, Jia T, Chen J, Zeng S, Qiu Z, Wu S, et al. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Front Immunol* (2021) 12:632814. doi: 10.3389/fimmu.2021.632814
43. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Rep Med* (2020) 1(3):100040. doi: 10.1016/j.celr.2020.100040
44. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THQ, Chromikova V, McMahon M, et al. A Serological Assay to Detect SARS-CoV-2 Seroreconversion in Humans. *Nat Med* (2020) 26(7):1033–6. doi: 10.1038/s41591-020-0913-5
45. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG Subclass Distribution of Antibodies to Bacterial and Viral Antigens. *Pediatr Infect Dis J* (1990) 9(8 Suppl):S16–34. doi: 10.1097/00006454-199008001-00004
46. Moncunil G, Mayor A, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Tortajada M, et al. SARS-CoV-2 Seroprevalence and Antibody Kinetics Among Health Care Workers in a Spanish Hospital After 3 Months of Follow-Up. *J Infect Dis* (2021) 223(1):62–71. doi: 10.1093/infdis/jiaa096
47. Premkumar I, Segovia-Chumbez B, Jadhav M, Martínez DR, Raut R, Markmann A, et al. The Receptor Binding Domain of the Viral Spike Protein Is an Immunodominant and Highly Specific Target of Antibodies in SARS-CoV-2 Patients. *Sci Immunol* (2020) 5(48):eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413
48. Houlihan CF, Beale R. The Complexities of SARS-CoV-2 Serology. *Lancet Infect Dis* (2020) 20(12):1350–1. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30699-X
49. Pang NY-L, Pang AS-R, Chow VT, Wang D-Y. Understanding Neutralising Antibodies Against SARS-CoV-2 and Their Implications in Clinical Practice. *Mil Med Res* (2021) 8(1):47. doi: 10.1186/s40779-021-00342-3
50. Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bliss S, et al. Correlates of Protection Against Symptomatic and Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Nat Med* (2021) 27(11):2032–40. doi: 10.1101/2021.06.21.21258528

Conflict of Interest: MJM and PFR are founders and stockholders of the biotechnology spin-off company Vaudyn, which develops vaccines for infections caused by MDR bacteria. Vaudyn had no role in the elaboration of this manuscript.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Tajado, Carretero, García-Ris, López-Siles, Cano, Vázquez, Más, Rodríguez-Goncer, Lalueza, López-Medrano, Juan, Fernández-Ruiz, Aguado, McConnell and Pérez-Romero. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

1. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020 [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb 20 [cited 2021 Dec 21];382(8):727–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978945/>
3. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb 20 [cited 2021 Dec 21];382(8):760–2. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejme2001126>
4. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *Elife* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Dec 21];9. Available from: </pmc/articles/PMC7224694/>
5. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2021 Dec 21];579(7798):270–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015507/>
6. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Mar 31 [cited 2021 Dec 21];117(13):7001–3. Available from: <https://www.pnas.org/content/117/13/7001>
7. Gandhi RT. The Multidimensional Challenge of Treating Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Remdesivir Is a Foot in the Door. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2021 Dec 21];73(11):e4175–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/73/11/e4175/5879440>
8. 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* [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2021 Dec 21];323(11):1061–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32031570/>
9. Coronaviridae - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae
10. Coronaviridae - Figures - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/223/coronaviridae-figures
11. van Egeren D, Novokhodko A, Stoddard M, Tran U, Zetter B, Rogers M, et al. Risk of rapid evolutionary escape from biomedical interventions targeting SARS-CoV-2 spike protein. *PLoS One* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Dec 21];16(4).

BIBLIOGRAFÍA

- Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33909660/>
12. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol* [Internet]. 2020 Apr 6 [cited 2021 Dec 21];30(7):1346-1351.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32197085/>
 13. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 21];1866(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/>
 14. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, co - Nucleotide - NCBI [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1798174254>
 15. Jungreis I, Sealton R, Kellis M. SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
 16. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nat* 2020 5837816 [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2021 Dec 21];583(7816):459–68. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2286-9>
 17. SARS-CoV-2 Proteins | Eurogentec [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: <https://www.eurogentec.com/en/sars-cov-2-proteins>
 18. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 21];9(1):221–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31987001/>
 19. Yoshimoto FK. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 21];39(3):198–216. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32447571/>
 20. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol* [Internet]. 2021 Jan 22 [cited 2021 Dec 21];433(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33245961/>
 21. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2021 Dec 21];181(2):271-280.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/>
 22. Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res*. 2020 Aug 1;51(6):482–91.
 23. Konno Y, Kimura I, Uriu K, Fukushi M, Irie T, Koyanagi Y, et al. SARS-CoV-2 ORF3b

BIBLIOGRAFÍA

- Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep*. 2020 Sep 22;32(12):108185.
24. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. [cited 2021 Dec 22]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
 25. Chagla Z, Hota S, Khan S, Mertz D. Re: It Is Time to Address Airborne Transmission of COVID-19. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2021 Dec 22];73(11):e3981–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32780799/>
 26. Hamner L, Dubbel P, Capron I, Ross A, Jordan A, Lee J, et al. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice — Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 May 15 [cited 2021 Dec 22];69(19):606–10. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6919e6.htm>
 27. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. <https://doi.org/10.7326/M20-5008> [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2021 Dec 22];174(1):69–79. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M20-5008>
 28. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. [cited 2021 Dec 22]. Available from: [https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-(covid-19))
 29. Goh XL, Low YF, Ng CH, Amin Z, Ng YPM. Incidence of SARS-CoV-2 vertical transmission: a meta-analysis. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 22];106(1):112–3. Available from: <https://fn.bmj.com/content/106/1/112>
 30. Ge Y, Martinez L, Sun S, Chen Z, Zhang F, Li F, et al. COVID-19 Transmission Dynamics Among Close Contacts of Index Patients With COVID-19: A Population-Based Cohort Study in Zhejiang Province, China. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2021 Dec 22];181(10):1343–50. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2783099>
 31. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 2020 265 [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2021 Dec 22];26(5):672–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5>
 32. Fontana LM, Villamagna AH, Sikka MK, McGregor JC. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Dec 22];42(6):659–68. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/understanding-viral-shedding-of-severe-acute-respiratory-coronavirus-virus-2-sarscov2-review-of-current->

- literature/994F79458DCB4ED8597F141550598B69
33. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 22];2(1):e13–22. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2666524720301725/fulltext>
 34. Tarhini H, Recoing A, Bridier-Nahmias A, Rahi M, Lambert C, Martres P, et al. Long-Term Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infectiousness Among Three Immunocompromised Patients: From Prolonged Viral Shedding to SARS-CoV-2 Superinfection. *J Infect Dis* [Internet]. 2021 May 20 [cited 2021 Dec 22];223(9):1522–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/223/9/1522/6131370>
 35. Kim M-C, Cui C, Shin K-R, Bae J-Y, Kweon O-J, Lee M-K, et al. Duration of Culturable SARS-CoV-2 in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2021 Dec 22];384(7):671–3. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2027040>
 36. Fogueira MD, Luczkowiak J, Lasala F, Pérez-Rivilla A, Delgado R. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Dec 22];27(6):886–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33631334/>
 37. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nat* 2020 5817809 [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Dec 22];581(7809):465–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>
 38. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Nov 15 [cited 2021 Dec 22];71(10):2663–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32442256/>
 39. Böhmer MM, Buchholz U, Corman VM, Hoch M, Katz K, Marosevic D V., et al. Investigation of a COVID-19 outbreak in Germany resulting from a single travel-associated primary case: a case series. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 22];20(8):920–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32422201/>
 40. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 May 28 [cited 2021 Dec 22];382(22):2081–90. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2008457>
 41. L L, D L, X L, X W, Q J, J Z, et al. Contact Settings and Risk for Transmission in 3410 Close Contacts of Patients With COVID-19 in Guangzhou, China : A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021

BIBLIOGRAFÍA

- Dec 22];173(11):888–94. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32790510/>
42. Sayampanathan AA, Heng CS, Pin PH, Pang J, Leong TY, Lee VJ. Infectivity of asymptomatic versus symptomatic COVID-19. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2021 Jan 9 [cited 2021 Dec 22];397(10269):93–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33347812/>
 43. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 Jan 4 [cited 2021 Dec 22];4(1):e2035057–e2035057. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2774707>
 44. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Dec 27];8(12):1233–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33075298/>
 45. Liotta EM, Batra A, Clark JR, Shlobin NA, Hoffman SC, Orban ZS, et al. Frequent neurologic manifestations and encephalopathy-associated morbidity in Covid-19 patients. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Dec 27];7(11):2221–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acn3.51210>
 46. Diaz-Salazar C, Sun JC. Coordinated Viral Control by Cytotoxic Lymphocytes Ensures Optimal Adaptive NK Cell Responses. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Sep 22 [cited 2022 Apr 12];32(12). Available from: <http://www.cell.com/article/S221112472031175X/fulltext>
 47. Bao C, Tao X, Cui W, Hao Y, Zheng S, Yi B, et al. Natural killer cells associated with SARS-CoV-2 viral RNA shedding, antibody response and mortality in COVID-19 patients. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Apr 12];10(1):1–4. Available from: <https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-021-00199-1>
 48. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Dec 22];371(6529). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abf4063>
 49. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell* [Internet]. 2021 Jan 7 [cited 2021 Dec 22];184(1):169–183.e17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33296701/>
 50. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020 209 [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2021 Dec 22];20(9):529–36. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0402-6>
 51. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the

- receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* 2020 176 [Internet]. 2020 Mar 19 [cited 2021 Dec 22];17(6):613–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-020-0400-4>
52. Hui KPY, Cheung MC, Perera RAPM, Ng KC, Bui CHT, Ho JCW, et al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 23];8(7):687–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32386571/>
53. Toor SM, Saleh R, Sasidharan Nair V, Taha RZ, Elkord E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 23];162(1):30–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32935333/>
54. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol* 2020 207 [Internet]. 2020 May 21 [cited 2021 Dec 23];20(7):389–91. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0343-0>
55. 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* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 23];5(49). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciimmunol.abd7114>
56. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 23];20(10):1135–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32526193/>
57. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020 May 1;11:827.
58. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Dec 23];34(2):327–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171193/>
59. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Dec 14 [cited 2021 Dec 23];9(6):7204–18. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/23208/text/>
60. Palomino DC arolin. T, Marti LC avalheir. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Dec 23];13(3):469–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466066/>
61. Wong JJM, Leong JY, Lee JH, Albani S, Yeo JG. Insights into the immuno-

BIBLIOGRAFÍA

- pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med* [Internet]. 2019 Oct [cited 2021 Dec 23];7(19):504–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31728357/>
62. F C, A K, G G. CoViD-19 Immunopathology and Immunotherapy. *Bioinformatics* [Internet]. 2020 Mar 31 [cited 2021 Dec 23];16(3):219–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32308263/>
63. Shrotri M, van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 23];16(1):e0245532. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0245532>
64. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, 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* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Dec 23];17(5):541–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32203186/>
65. Qu J, Wu C, Li X, Zhang G, Jiang Z, Li X, et al. Profile of Immunoglobulin G and IgM Antibodies Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2021 Dec 23];71(16):2255–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32337590/>
66. Valdez-Cruz NA, García-Hernández E, Espitia C, Cobos-Marín L, Altamirano C, Bando-Campos CG, et al. Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment. *Microb Cell Factories* 2021 201 [Internet]. 2021 Apr 22 [cited 2021 Dec 23];20(1):1–32. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-021-01576-5>
67. Zhou C, Bu G, Sun Y, Ren C, Qu M, Gao Y, et al. Evaluation of serum IgM and IgG antibodies in COVID-19 patients by enzyme linked immunosorbent assay. *J Med Virol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 23];93(5):2857–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.26741>
68. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, 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* [Internet]. 2020 Oct 16 [cited 2021 Dec 23];5(52). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciimmunol.abe0367>
69. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol* 2020 512 [Internet]. 2020 Oct 26 [cited 2021 Dec 23];5(12):1598–607. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-00813-8>
70. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 23];147(2):545-557.e9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33221383/>
71. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 23];9(1):386–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/22221751.2020.1729071>
 72. Van Elslande J, Gruwier L, Godderis L, Vermeersch P. Estimated Half-Life of SARS-CoV-2 Anti-Spike Antibodies More Than Double the Half-Life of Anti-nucleocapsid Antibodies in Healthcare Workers. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 16 [cited 2021 Dec 23];73(12):2366–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/73/12/2366/6162856>
 73. Luo H, Jia T, Chen J, Zeng S, Qiu Z, Wu S, et al. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2021 Mar 4;12:460.
 74. Yates JL, Ehrbar DJ, Hunt DT, Girardin RC, Dupuis AP, Payne AF, et al. Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. *Cell reports Med* [Internet]. 2021 Jul 20 [cited 2021 Dec 23];2(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34151306/>
 75. Grandjean L, Saso A, Torres Ortiz A, Lam T, Hatcher J, Thistlethwayte R, et al. Long-Term Persistence of Spike Antibody and Predictive Modeling of Antibody Dynamics Following Infection with SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Jul 4 [cited 2021 Dec 23]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34218284/>
 76. Dispinseri S, Secchi M, Pirillo MF, Tolazzi M, Borghi M, Brigatti C, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 May 11 [cited 2021 Dec 23];12(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22958-8>
 77. Van Elslande J, Gruwier L, Godderis L, Vermeersch P. Estimated Half-Life of SARS-CoV-2 Anti-Spike Antibodies More Than Double the Half-Life of Anti-nucleocapsid Antibodies in Healthcare Workers. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 16 [cited 2021 Dec 23];73(12):2366–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33693643/>
 78. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nat* 2021 5917851 [Internet]. 2021 Jan 18 [cited 2021 Dec 23];591(7851):639–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03207-w>
 79. L’Huillier AG, Meyer B, Andrey DO, Arm-Vernez I, Baggio S, Didierlaurent A, et al. Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection

BIBLIOGRAFÍA

- among hospital workers: a prospective longitudinal study. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 23];27(5):784.e1-784.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33482352/>
80. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* [Internet]. 2020 Dec 4 [cited 2021 Dec 23];370(6521):1227–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33115920/>
81. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nat* 2021 5957867 [Internet]. 2021 May 24 [cited 2021 Dec 23];595(7867):421–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03647-4>
82. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Dec 23];371(6529). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abf4063>
83. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Astudillo MG, Yang D, Miller TE, Feldman J, et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* [Internet]. 2021 Jan 21 [cited 2021 Dec 24];184(2):476-488.e11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33412089/>
84. Lynch KL, Whitman JD, Lacanienta NP, Beckerdite EW, Kastner SA, Shy BR, et al. Magnitude and Kinetics of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Responses and Their Relationship to Disease Severity. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Jan 15 [cited 2021 Dec 24];72(2):301–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33501951/>
85. Pang NYL, Pang ASR, Chow VT, Wang DY. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Mil Med Res* 2021 81 [Internet]. 2021 Aug 31 [cited 2021 Dec 24];8(1):1–17. Available from: <https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-021-00342-3>
86. Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, Kwan MYW, Chan W hung, Chiu SS, et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 Jan 4 [cited 2021 Dec 24];12(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20247-4>
87. Masiá M, Telenti G, Fernández M, García JA, Agulló V, Padilla S, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized With COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 24];8(2). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/8/2/ofab005/6064817>
88. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021 277 [Internet]. 2021 May 17 [cited 2021 Dec 24];27(7):1205–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01377-8>

BIBLIOGRAFÍA

89. Harvey RA, Rassen JA, Kabelac CA, Turenne W, Leonard S, Klesh R, et al. Association of SARS-CoV-2 Seropositive Antibody Test With Risk of Future Infection. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 24];181(5):672–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33625463/>
90. Batra M, Tian R, Zhang C, Clarence E, Sacher CS, Miranda JN, et al. Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes. *Sci Reports* 2021 111 [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2021 Dec 24];11(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-83108-0>
91. Chen W, Zhang J, Qin X, Wang W, Xu M, Wang LF, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 24];130. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33406577/>
92. Adams O, Andrée M, Rabl D, Ostermann PN, Schaal H, Lehnert E, et al. Humoral response to SARS-CoV-2 and seasonal coronaviruses in COVID-19 patients. *J Med Virol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 24]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.27427>
93. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nat* 2020 5847821 [Internet]. 2020 Jun 18 [cited 2021 Dec 24];584(7821):437–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2456-9>
94. Yang Y, Du L, Carver RJ, Yang D. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther* 2021 61 [Internet]. 2021 Feb 26 [cited 2021 Dec 24];6(1):1–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00523-5>
95. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* [Internet]. 2021 Jan 20 [cited 2021 Dec 24];13(577). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33288662/>
96. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nat* 2021 5917851 [Internet]. 2021 Jan 18 [cited 2021 Dec 24];591(7851):639–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03207-w>
97. Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, Selva KJ, Reynaldi A, Tan HX, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 Feb 19 [cited 2021 Dec 24];12(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21444-5>
98. Trinité B, Tarrés-Freixas F, Rodon J, Pradenas E, Urrea V, Marfil S, et al. SARS-CoV-2 infection elicits a rapid neutralizing antibody response that correlates with disease severity. *Sci Reports* 2021 111 [Internet]. 2021 Jan 28 [cited 2021 Dec 24];11(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-81862-9>
99. Bartsch YC, Fischinger S, Siddiqui SM, Chen Z, Yu J, Gebre M, et al. Discrete

BIBLIOGRAFÍA

- SARS-CoV-2 antibody titers track with functional humoral stability. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 Feb 15 [cited 2021 Dec 24];12(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21336-8>
100. Townsend JP, Hassler HB, Wang Z, Miura S, Singh J, Kumar S, et al. The durability of immunity against reinfection by SARS-CoV-2: a comparative evolutionary study. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Mar 21];2(12):e666–75. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2666524721002196/fulltext>
 101. Gozalbo-Rovira R, Gimenez E, Latorre V, Francés-Gómez C, Albert E, Buesa J, et al. SARS-CoV-2 antibodies, serum inflammatory biomarkers and clinical severity of hospitalized COVID-19 patients. *J Clin Virol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 24];131. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32882666/>
 102. Bauer G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021 May 1;106:61–4.
 103. Long QX, Jia YJ, Wang X, Deng HJ, Cao XX, Yuan J, et al. Immune memory in convalescent patients with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell Discov* 2021 71 [Internet]. 2021 Mar 25 [cited 2021 Dec 24];7(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41421-021-00250-9>
 104. Manzanares-Meza LD, Medina-Contreras O. SARS-CoV-2 and influenza: a comparative overview and treatment implications. *Bol Med Hosp Infant Mex* [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 25];77(5):262–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33064680/>
 105. Domingo E, García-Crespo C, Lobo-Vega R, Perales C. Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 1882 [Internet]. 2021 Sep 21 [cited 2021 Dec 25];13(9):1882. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/9/1882/htm>
 106. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2021 Dec 25];182(4):812–827.e19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32697968/>
 107. Zhou B, Thao TTN, Hoffmann D, Taddeo A, Ebert N, Labroussaa F, et al. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nat* 2021 5927852 [Internet]. 2021 Feb 26 [cited 2021 Dec 25];592(7852):122–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03361-1>
 108. Klumpp-Thomas C, Kalish H, Hicks J, Mehalko J, Drew M, Memoli MJ, et al. Effect of D614G Spike Variant on Immunoglobulin G, M, or A Spike Seroassay Performance. *J Infect Dis* [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2021 Dec 25];223(5):802–4. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/223/5/802/6013009>
 109. Ecdc. Suggested citation: European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike

BIBLIOGRAFÍA

- protein mutations observed in the United Kingdom. 2020 [cited 2021 Dec 25]; Available from: http://covid19-country-overviews.ecdc.europa.eu/#34_United_Kingdom
110. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant Variant of Concern 202012/01 Technical briefing 5. [cited 2021 Dec 25]; Available from: www.gov.uk/government/publications/nervtag-paper-on-covid-19-variant-of-concern-b117
 111. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nat* 2021 5937858 [Internet]. 2021 Mar 25 [cited 2021 Dec 25];593(7858):266–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03470-x>
 112. Challen R, Brooks-Pollock E, Read JM, Dyson L, Tsaneva-Atanasova K, Danon L. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *BMJ* [Internet]. 2021 Mar 10 [cited 2021 Dec 25];372. Available from: <https://www.bmj.com/content/372/bmj.n579>
 113. Davies NG, Jarvis CI, van Zandvoort K, Clifford S, Sun FY, Funk S, et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nat* 2021 5937858 [Internet]. 2021 Mar 15 [cited 2021 Dec 25];593(7858):270–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03426-1>
 114. Frampton D, Rampling T, Cross A, Bailey H, Heaney J, Byott M, et al. Genomic characteristics and clinical effect of the emergent SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage in London, UK: a whole-genome sequencing and hospital-based cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2021 Dec 25];21(9):1246–56. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309921001705/fulltext>
 115. Muik A, Wallisch AK, Sanger B, Swanson KA, Muhl J, Chen W, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science* [Internet]. 2021 Mar 12 [cited 2021 Dec 25];371(6534):1152–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33514629/>
 116. Pearson CA. Estimates of severity and transmissibility of novel South Africa SARS-CoV-2 variant 501Y.V2. [cited 2021 Dec 25];1. Available from: <https://cran.r-project.org/package=wpp2019>
 117. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nat* 2021 5927854 [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2021 Dec 25];592(7854):438–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03402-9>
 118. FACT SHEET FOR HEALTH CARE PROVIDERS EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) OF BAMLANIVIMAB AND ETESEVIMAB AUTHORIZED USE TREATMENT. 2021 [cited 2021 Dec 25]; Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/if-you-are-sick/quarantine.html>.
 119. Edara VV, Norwood C, Floyd K, Lai L, Davis-Gardner ME, Hudson WH, et al. Infection- and vaccine-induced antibody binding and neutralization of the

BIBLIOGRAFÍA

- B.1.351 SARS-CoV-2 variant. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 Apr 14 [cited 2021 Dec 25];29(4):516-521.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33798491/>
120. Johnson & Johnson COVID-19 Vaccine Authorized by U.S. FDA For Emergency Use | Johnson & Johnson [Internet]. [cited 2021 Dec 25]. Available from: <https://www.jnj.com/johnson-johnson-covid-19-vaccine-authorized-by-u-s-fda-for-emergency-usefirst-single-shot-vaccine-in-fight-against-global-pandemic>
121. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology - Virological [Internet]. [cited 2021 Dec 25]. Available from: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manauis-preliminary-findings/586>
122. Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Cerutti G, et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 May 12 [cited 2021 Dec 25];29(5):747-751.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33887205/>
123. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* [Internet]. 2021 May 21 [cited 2021 Dec 25];372(6544). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33853970/>
124. Dougherty K, Mannell M, Naqvi O, Matson D, Stone J. SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant COVID-19 Outbreak Associated with a Gymnastics Facility — Oklahoma, April–May 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Jul 16 [cited 2021 Dec 25];70(28):1004–7. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7028e2.htm>
125. Ong SWX, Chiew CJ, Ang LW, Mak T-M, Cui L, Toh MPHS, et al. Clinical and Virological Features of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants of Concern: A Retrospective Cohort Study Comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Aug 23 [cited 2021 Dec 25]; Available from: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciab721/6356459>
126. Sheikh A, McMenemy J, Taylor B, Robertson C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *Lancet* [Internet]. 2021 Jun 26 [cited 2021 Dec 25];397(10293):2461–2. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621013581/fulltext>
127. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Aug 12 [cited 2021 Dec 25];385(7):585–94. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2108891>
128. Implications of the emergence and spread of the SARS-CoV-2 variants of concern BA.4 and BA.5 for the EU/EEA [Internet]. [cited 2022 Jul 26]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/implications-emergence->

BIBLIOGRAFÍA

- spread-sars-cov-2-variants-concern-ba4-and-ba5
129. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2021 Dec 27];395(10223):507–13. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673620302117/fulltext>
 130. Takashita E, Yamayoshi S, Simon V, Bakel H van, Sordillo EM, Pekosz A, et al. Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Omicron BA.2.12.1, BA.4, and BA.5 Subvariants. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2207519> [Internet]. 2022 Jul 20 [cited 2022 Jul 26]; Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2207519>
 131. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant - United States, December 1-8, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Dec 17 [cited 2022 Jan 3];70(50):1731–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34914670/>
 132. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England.
 133. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [Internet]. [cited 2021 Dec 25]. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fvariants%2Fvariant-info.html
 134. Oran DP, Topol EJ. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic : A Systematic Review. *Ann Intern Med* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 26];174(5):655–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33481642/>
 135. Kasper MR, Geibe JR, Sears CL, Riegodedios AJ, Luse T, Von Thun AM, et al. An Outbreak of Covid-19 on an Aircraft Carrier. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Dec 17 [cited 2021 Dec 26];383(25):2417–26. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2019375>
 136. 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* [Internet]. 2020 Apr 7 [cited 2021 Dec 26];323(13):1239–42. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130>
 137. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El Burai Felix S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2021 Dec 26];69(24):759–65. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6924e2.htm>
 138. WHO R&D Blueprint novel Coronavirus COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. 2020;
 139. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics

BIBLIOGRAFÍA

- in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Mar 26 [cited 2021 Dec 26];382(13):1199–207. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2001316>
140. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2021 Dec 26];382(18):1708–20. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/nejmoa2002032>
141. Management of Patients with Confirmed 2019-nCoV | CDC [Internet]. [cited 2021 Dec 27]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>
142. Dawson P, Rabold EM, Laws RL, Connors EE, Gharpure R, Yin S, et al. Loss of Taste and Smell as Distinguishing Symptoms of Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 16 [cited 2021 Dec 26];72(4):682–5. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/72/4/682/5860440>
143. Zayet S, Kadiane-Oussou NJ, Lepiller Q, Zahra H, Royer PY, Toko L, et al. Clinical features of COVID-19 and influenza: a comparative study on Nord Franche-Comte cluster. *Microbes Infect* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 26];22(9):481–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32561409/>
144. Jansen L, Tegomoh B, Lange K, Showalter K, Figliomeni J, Abdalhamid B, et al. Investigation of a SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant Cluster — Nebraska, November–December 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Dec 31 [cited 2022 Jan 16];70(5152):1782–4. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm705152e3.htm>
145. Boscolo-Rizzo P, Borsetto D, Fabbris C, Spinato G, Frezza D, Menegaldo A, et al. Evolution of Altered Sense of Smell or Taste in Patients With Mildly Symptomatic COVID-19. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 26];146(8):729–32. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/fullarticle/2767781>
146. de Masson A, Bouaziz JD, Sulimovic L, Cassius C, Jachiet M, Ionescu MA, et al. Chilblains is a common cutaneous finding during the COVID-19 pandemic: A retrospective nationwide study from France. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 26];83(2):667–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32380219/>
147. Annweiler C, Sacco G, Salles N, Aquino JP, Gautier J, Berrut G, et al. National French Survey of Coronavirus Disease (COVID-19) Symptoms in People Aged 70 and Over. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 26];72(3):490–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32556328/>
148. Bandirali M, Sconfienza LM, Serra R, Brembilla R, Albano D, Pregliasco FE, et al. Chest Radiograph Findings in Asymptomatic and Minimally Symptomatic Quarantined Patients in Codogno, Italy during COVID-19 Pandemic. <https://doi.org/10.1148/radiol2020201102> [Internet]. 2020 Mar 27 [cited 2021 Dec 27];295(3). Available from:

BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2020201102>
149. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, et al. Chest CT findings in coronavirus disease 2019 (COVID-19): Relationship to duration of infection. *Radiology* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];295(3):685–91. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2020200463>
 150. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 27];296(2):E41–5. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2020200343>
 151. Altmayer S, Zanon M, Pacini GS, Watte G, Barros MC, Mohammed TL, et al. Comparison of the computed tomography findings in COVID-19 and other viral pneumonia in immunocompetent adults: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Dec 27];30(12):6485–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32594211/>
 152. Bao C, Liu X, Zhang H, Li Y, Liu J. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) CT Findings: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Am Coll Radiol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];17(6):701–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283052/>
 153. 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* [Internet]. 2020 Apr 7 [cited 2021 Dec 27];323(13):1239–42. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130>
 154. Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P, et al. Sensitivity of chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Dec 27];296(2):E115–7. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2020200432>
 155. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 27];26(10):1636–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839624/>
 156. Liao D, Zhou F, Luo L, Xu M, Wang H, Xia J, et al. Haematological characteristics and risk factors in the classification and prognosis evaluation of COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Dec 27];7(9):e671–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32659214/>
 157. Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, Schenck EJ, Chen R, Jabri A, et al. Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2021 Dec 27];382(24):2372–4. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2010419>
 158. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited

BIBLIOGRAFÍA

- 2021 Dec 27];382(18):1708–20. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/nejmoa2002032>
159. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2021 Dec 27];395(10223):497–506. Available from:
<http://www.thelancet.com/article/S0140673620301835/fulltext>
160. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2021 Dec 27];73(11):e4197–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603425/>
161. Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, Huang CH, Garamani N, Gombar S, et al. High Frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and Association With Severe Disease. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 May 4 [cited 2021 Dec 27];72(9):e291–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965474/>
162. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2021 Dec 27];383(16):1522–34. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2020283>
163. Van Der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, Van Den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA* [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2021 Dec 27];324(7):663–73. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768926>
164. Zhang Q, Liu Z, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Bigio B, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2021 Dec 27];370(6515). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32972995/>
165. 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* [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2021 Dec 27];323(11):1061–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2761044>
166. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2021 Dec 27];383(6):590–2. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2011400>
167. Solomon IH, Normandin E, Bhattacharyya S, Mukerji SS, Keller K, Ali AS, et al. Neuropathological Features of Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Sep 3 [cited 2021 Dec 27];383(10):989–92. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2019373>
168. Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, Ghosh S, Mukhopadhyay S. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2020 May 5 [cited 2021 Dec 27];153(6):725–33. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/153/6/725/5818922>

BIBLIOGRAFÍA

169. Tzotzos SJ, Fischer B, Fischer H, Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care* [Internet]. 2020 Aug 21 [cited 2021 Dec 27];24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825837/>
170. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];46(6):1089–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32367170/>
171. Bilaloglu S, Aphinyanaphongs Y, Jones S, Iturrate E, Hochman J, Berger JS. Thrombosis in Hospitalized Patients With COVID-19 in a New York City Health System. *JAMA* [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2021 Dec 27];324(8):799–801. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768715>
172. Chou SH-Y, Beghi E, Helbok R, Moro E, Sampson J, Altamirano V, et al. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19—A Report for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 May 3 [cited 2021 Dec 27];4(5):e2112131–e2112131. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2779759>
173. Restivo DA, Centonze D, Alesina A, Marchese-Ragona R. Myasthenia Gravis Associated With SARS-CoV-2 Infection. <https://doi.org/10.7326/L20-0845> [Internet]. 2020 Aug 10 [cited 2021 Dec 27];173(12):1027–8. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/L20-0845>
174. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, Ruiz L, Invernizzi P, Cuzzoni MG, et al. Guillain-Barré Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 25 [cited 2021 Dec 27];382(26):2574–6. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2009191>
175. Morris SB, Schwartz NG, Patel P, Abbo L, Beauchamps L, Balan S, et al. Case Series of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults Associated with SARS-CoV-2 Infection — United Kingdom and United States, March–August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Oct 9 [cited 2021 Dec 27];69(40):1450–6. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6940e1.htm>
176. Kubin CJ, McConville TH, Dietz D, Zucker J, May M, Nelson B, et al. Characterization of Bacterial and Fungal Infections in Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 and Factors Associated With Health Care-Associated Infections. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];8(6). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/8/6/ofab201/6266874>
177. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Dec 27];71(9):2459–68. Available from:

BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32358954/>
178. Bartoletti M, Pascale R, Cricca M, Rinaldi M, Maccaro A, Bussini L, et al. Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis Among Intubated Patients With COVID-19: A Prospective Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2021 Dec 27];73(11):e3606–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32719848/>
 179. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Colombo AL, Hoenigl M, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];21(6):e149–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33333012/>
 180. Patel A, Agarwal R, Rudramurthy SM, Shevkani M, Xess I, Sharma R, et al. Multicenter Epidemiologic Study of Coronavirus Disease-Associated Mucormycosis, India. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2021 Dec 27];27(9):2349–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34087089/>
 181. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El Burai Felix S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2021 Dec 27];69(24):759–65. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6924e2.htm>
 182. Bellan M, Patti G, Hayden E, Azzolina D, Pirisi M, Acquaviva A, et al. Fatality rate and predictors of mortality in an Italian cohort of hospitalized COVID-19 patients. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020 Nov 26 [cited 2021 Dec 27];10(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-77698-4>
 183. Estimating mortality from COVID-19: Scientific brief, 4 August 2020 [Internet]. [cited 2021 Dec 27]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Mortality-2020.1>
 184. Ioannidis JPA. Reconciling estimates of global spread and infection fatality rates of COVID-19: An overview of systematic evaluations. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 27];51(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33768536/>
 185. COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer [Internet]. [cited 2021 Dec 27]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
 186. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* [Internet]. 2020 May 26 [cited 2021 Dec 27];323(20):2052–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765184>
 187. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ* [Internet]. 2020 May 22 [cited 2021 Dec 27];369. Available from: <https://www.bmj.com/content/369/bmj.m1985>
188. Dennis JM, McGovern AP, Vollmer SJ, Mateen BA. Improving Survival of Critical Care Patients with Coronavirus Disease 2019 in England: A National Cohort Study, March to June 2020*. *Crit Care Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 27];209–14. Available from: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2021/02000/Improving_Survival_of_Critical_Care_Patients_With.5.aspx
189. Zhou C, Huang Z, Tan W, Li X, Yin W, Xiao Y, et al. Predictive factors of severe coronavirus disease 2019 in previously healthy young adults: A single-center, retrospective study. *Respir Res* [Internet]. 2020 Jun 22 [cited 2021 Dec 27];21(1):1–8. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-020-01412-1>
190. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 27];20(6):669–77. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309920302437/fulltext>
191. Coronavirus Age, Sex, Demographics (COVID-19) - Worldometer [Internet]. [cited 2021 Dec 27]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/coronavirus-age-sex-demographics/>
192. Kragholm K, Andersen MP, Gerds TA, Butt JH, Østergaard L, Polcwiartek C, et al. Association Between Male Sex and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-A Danish Nationwide, Register-based Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2021 Dec 27];73(11):e4025–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32634827/>
193. Nguyen NT, Chinn J, de Ferrante M, Kirby KA, Hohmann SF, Amin A. Male gender is a predictor of higher mortality in hospitalized adults with COVID-19. *PLoS One* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Dec 27];16(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34242273/>
194. Kompaniyets L, Pennington AF, Goodman AB, Rosenblum HG, Belay B, Ko JY, et al. Underlying Medical Conditions and Severe Illness Among 540,667 Adults Hospitalized With COVID-19, March 2020–March 2021. *Prev Chronic Dis*. 2021;18:1–13.
195. Bhaskaran K, Rentsch CT, MacKenna B, Schultze A, Mehrkar A, Bates CJ, et al. HIV infection and COVID-19 death: a population-based cohort analysis of UK primary care data and linked national death registrations within the OpenSAFELY platform. *Lancet HIV* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 27];8(1):e24–32. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2352301820303052/fulltext>

BIBLIOGRAFÍA

196. Huang J, Xie N, Hu X, Yan H, Ding J, Liu P, et al. Epidemiological, Virological and Serological Features of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Cases in People Living With Human Immunodeficiency Virus in Wuhan: A Population-based Cohort Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Oct 5 [cited 2021 Dec 27];73(7):e2086–94. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/73/7/e2086/5893115>
197. Collins LF, Moran CA, Oliver NT, Moanna A, Lahiri CD, Colasanti JA, et al. Clinical characteristics, comorbidities and outcomes among persons with HIV hospitalized with coronavirus disease 2019 in Atlanta, Georgia. *AIDS* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 27];34(12):1789–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32675581/>
198. Dandachi D, Geiger G, Montgomery MW, Karmen-Tuohy S, Golzy M, Antar AAR, et al. Characteristics, Comorbidities, and Outcomes in a Multicenter Registry of Patients With Human Immunodeficiency Virus and Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Oct 5 [cited 2021 Dec 27];73(7):e1964–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32905581/>
199. IDSA Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Molecular Diagnostic Testing [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-diagnostics/>
200. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
201. IDSA Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing [Internet]. [cited 2021 Dec 29]. Available from: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-serology/>
202. Genetic Variants of SARS-CoV-2 May Lead to False Negative Results with Molecular Tests for Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care Providers | FDA [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negative-results-molecular-tests-detection-sars-cov-2>
203. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>
204. Long DR, Gombar S, Hogan CA, Greninger AL, OReilly Shah V, Bryson-Cahn C, et al. Occurrence and Timing of Subsequent SARS-CoV-2 RT-PCR Positivity Among Initially Negative Patients. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci* [Internet]. 2020 May 8 [cited 2021 Dec 28]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32511542/>
205. Weissleder R, Lee H, Ko J, Pittet MJ. COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med* [Internet]. 2020 Jun 3 [cited 2021 Dec 28];12(546). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32493791/>

BIBLIOGRAFÍA

206. Nalla AK, Casto AM, Casto AM, Huang MLW, Perchetti GA, Sampoleo R, et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 28];58(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JCM.00557-20>
207. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2021 Mar 24 [cited 2021 Dec 28];2021(3). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD013705.pub2/full>
208. Furukawa NW, Furukawa NW, Brooks JT, Sobel J. Evidence Supporting Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 While Presymptomatic or Asymptomatic. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 28];26(7):E1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364890/>
209. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction–based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2021 Dec 28];173(4):262–8. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M20-1495>
210. IDSA and AMP joint statement on the use of SARS-CoV-2 PCR cycle threshold (Ct) values for clinical decision-making.
211. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 2020 265 [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2021 Dec 28];26(5):672–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5>
212. Clinical Questions about COVID-19: Questions and Answers | CDC [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/faq.html>
213. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant (202012/01): Technical briefing 2.
214. SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests | FDA [Internet]. [cited 2022 Jan 3]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests#omicron>
215. Harwood R, Allin B, Jones CE, Whittaker E, Ramnarayan P, Ramanan A V., et al. A national consensus management pathway for paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19 (PIMS-TS): results of a national Delphi process. *Lancet Child Adolesc Heal* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 28];5(2):133–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32956615/>
216. Investigative Criteria for Suspected Cases of SARS-CoV-2 Reinfection (ICR) | CDC

BIBLIOGRAFÍA

- [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/invest-criteria.html>
217. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. [cited 2021 Dec 29]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
218. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 | CDC [Internet]. [cited 2021 Dec 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
219. Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19) | CDC [Internet]. [cited 2021 Dec 29]. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fphp%2Ftesting%2Fexpanded-screening-testing.html
220. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2020 Jun 25 [cited 2021 Dec 29];2020(6). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD013652/full>
221. Wang F, Hou H, Luo Y, Tang G, Wu S, Huang M, et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight* [Internet]. 2020 May 21 [cited 2021 Dec 24];5(10). Available from: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.137799>
222. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020 266 [Internet]. 2020 Apr 29 [cited 2021 Dec 29];26(6):845–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0897-1>
223. Cheng MP, Yansouni CP, Basta NE, Desjardins M, Kanjilal S, Paquette K, et al. Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus 2. <https://doi.org/107326/M20-2854> [Internet]. 2020 Jun 4 [cited 2021 Dec 29];173(6):450–60. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M20-2854>
224. Lumley SF, O’Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2021 Dec 29];384(6):533–40. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2034545>
225. Self WH, Tenforde MW, Stubblefield WB, Feldstein LR, Steingrub JS, Shapiro NI, et al. Decline in SARS-CoV-2 Antibodies After Mild Infection Among Frontline Health Care Personnel in a Multistate Hospital Network — 12 States, April–August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Nov 27 [cited 2021 Dec 29];69(47):1762–6. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6947a2.htm>

BIBLIOGRAFÍA

226. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing | CDC [Internet]. [cited 2021 Dec 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
227. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nat Protoc* 2021 166 [Internet]. 2021 Apr 23 [cited 2021 Dec 30];16(6):3114–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-021-00536-y>
228. Wall EC, Wu M, Harvey R, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *Lancet* [Internet]. 2021 Jun 19 [cited 2021 Dec 30];397(10292):2331–3. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621012903/fulltext>
229. Neerukonda SN, Vassell R, Herrup R, Liu S, Wang T, Takeda K, et al. Establishment of a well-characterized SARS-CoV-2 lentiviral pseudovirus neutralization assay using 293T cells with stable expression of ACE2 and TMPRSS2. *PLoS One* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Dec 30];16(3):e0248348. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0248348>
230. Case JB, Rothlauf PW, Chen RE, Liu Z, Zhao H, Kim AS, et al. Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020 Sep 9 [cited 2021 Dec 30];28(3):475-485.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32735849/>
231. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MIC, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol* 2020 389 [Internet]. 2020 Jul 23 [cited 2021 Dec 30];38(9):1073–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0631-z>
232. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Jun 2 [cited 2022 Jan 18];172(11):726–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32282894/>
233. COVID-19 vaccine tracker and landscape [Internet]. [cited 2022 Jan 6]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
234. Dooling K. [cdc.gov/coronavirus](https://www.cdc.gov/coronavirus) Evidence to Recommendation Framework: An Additional Dose of mRNA COVID-19 Vaccine Following a Primary Series in Immunocompromised People. 2021 [cited 2022 Jan 6]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-vaccine-dose-certain-immunocompromised>

BIBLIOGRAFÍA

235. Anderson M, Stec M, Rewane A, Landay A, Cloherty G, Moy J. SARS-CoV-2 Antibody Responses in Infection-Naive or Previously Infected Individuals After 1 and 2 Doses of the BNT162b2 Vaccine. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2022 Jan 6];4(8):e2119741–e2119741. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2782762>
236. Reynolds CJ, Pade C, Gibbons JM, Butler DK, Otter AD, Menacho K, et al. Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science* [Internet]. 2021 Jun 25 [cited 2022 Jan 6];372(6549):1418–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33931567/>
237. Krammer F, Srivastava K, Alshammary H, Amoako AA, Awawda MH, Beach KF, et al. Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2022 Jan 6];384(14):1372–4. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2101667>
238. Interim Clinical Considerations for Use of COVID-19 Vaccines | CDC [Internet]. [cited 2022 Jan 6]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/clinical-considerations/covid-19-vaccines-us.html>
239. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Dec 17 [cited 2022 Jan 8];383(25):2439–50. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027906>
240. Hansen CH, Schelde AB, Moustsen-Helm IR, Emborg H-D, Krause TG, Mølbak K, et al. Vaccine effectiveness against SARS-CoV-2 infection with the Omicron or Delta variants following a two-dose or booster BNT162b2 or mRNA-1273 vaccination series: A Danish cohort study. *medRxiv* [Internet]. 2021 Dec 22 [cited 2022 Jan 8];2021.12.20.21267966. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.20.21267966v2>
241. Explanation About the Effectiveness of the Vaccine for Coronavirus in Israel | Ministry of Health [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: <https://www.gov.il/en/departments/news/06072021-04>
242. Ukhsa. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England.
243. Selected Adverse Events Reported after COVID-19 Vaccination | CDC [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/safety/adverse-events.html>
244. FACT SHEET FOR HEALTHCARE PROVIDERS ADMINISTERING VACCINE (VACCINATION PROVIDERS). [cited 2022 Jan 8]; Available from: www.modernatx.com/covid19vaccine-
245. Richards NE, Keshavarz B, Workman LJ, Nelson MR, Platts-Mills TAE, Wilson JM. Comparison of SARS-CoV-2 Antibody Response by Age Among Recipients of the BNT162b2 vs the mRNA-1273 Vaccine. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 Sep 1

BIBLIOGRAFÍA

- [cited 2022 Jan 8];4(9):e2124331–e2124331. Available from:
<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2783685>
246. Collier AY, Yu J, McMahan K, Liu J, Chandrashekar A, Maron JS, et al. Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Nov 18 [cited 2022 Jan 8];385(21):2010–2. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2115596>
247. Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, Ball SW, Naleway AL, Ong TC, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines in Ambulatory and Inpatient Care Settings. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Oct 7 [cited 2022 Jan 8];385(15):1355–71. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2110362>
248. Interim recommendations for use of the ChAdOx1-S [recombinant] vaccine against COVID-19 (AstraZeneca COVID-19 vaccine AZD1222 Vaxzevria™, SII COVISHIELD™) [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE_recommendation-AZD1222-2021.1
249. Wall EC, Wu M, Harvey R, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, et al. AZD1222-induced neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 Delta VOC. *Lancet* [Internet]. 2021 Jul 17 [cited 2022 Jan 8];398(10296):207–9. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621014628/fulltext>
250. Aggarwal A, Ospina Stella A, Walker G, Akerman A, Milogiannakis V, Brilot F, et al. SARS-CoV-2 Omicron: evasion of potent humoral responses and resistance to clinical immunotherapeutics relative to viral variants of concern.
251. Vaxzevria significantly boosted antibody levels against Omicron [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: <https://www.astrazeneca.com/content/astraz/media-centre/press-releases/2021/vaxzevria-significantly-boosted-antibody-levels-against-omicron.html>
252. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Aug 12 [cited 2022 Jan 8];385(7):585–94. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2108891>
253. COVID-19 vaccine safety update. 2021 [cited 2022 Jan 8]; Available from: www.ema.europa.eu
254. FACT SHEET FOR HEALTHCARE PROVIDERS ADMINISTERING VACCINE (VACCINATION PROVIDERS). [cited 2022 Jan 8]; Available from: www.janssencovid19vaccine.com.
255. Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, de Groot AM, et al. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 May 13 [cited 2022 Jan 8];384(19):1824–35. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2034201>
256. Self WH, Tenforde MW, Rhoads JP, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Comparative Effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) Vaccines in Preventing COVID-19 Hospitalizations Among Adults Without Immunocompromising Conditions — United States, March–August 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Sep 24 [cited 2022 Jan 8];70(38):1337–43. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7038e1.htm>
257. Gray MBBCH GE, Collie S, Garrett MBBS N, Goga A, Champion J, Zylstra M, et al. Vaccine effectiveness against hospital admission in South African health care workers who received a homologous booster of Ad26.COV2 during an Omicron COVID19 wave: Preliminary Results of the Sisonke 2 Study. *medRxiv* [Internet]. 2021 Dec 29 [cited 2022 Jan 8];2021.12.28.21268436. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.28.21268436v1>
258. Johnson & Johnson Announces Real-World Evidence and Phase 3 Data Confirming Strong and Long-Lasting Protection of Single-Shot COVID-19 Vaccine in the U.S. | Johnson & Johnson [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: <https://www.jnj.com/johnson-johnson-announces-real-world-evidence-and-phase-3-data-confirming-strong-and-long-lasting-protection-of-single-shot-covid-19-vaccine-in-the-u-s>
259. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* [Internet]. 2012 Jun 13 [cited 2022 Jan 23];307(23):2526–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797452/>
260. Hsieh CL, Goldsmith JA, Schaub JM, DiVenere AM, Kuo HC, Javanmardi K, et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Feb 5];369(6509):1501–5. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abd0826>
261. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med* 2020 267 [Internet]. 2020 May 12 [cited 2022 Feb 6];26(7):1033–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0913-5>
262. Wang Q, Anang S, Iketani S, Guo Y, Liu L, Katsamba PS, et al. Functional properties of the spike glycoprotein of the emerging SARS-CoV-2 variant B.1.1.529. *CellReports* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 10];39:110924. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110924>
263. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese otros M. ESTRUCTURAS Y DISTRIBUCIONES DE LA PROTEÍNA DE LA ESPIGA EN VIRIONES INTACTOS DE SARS-COV-2.
264. Battles MB, Más V, Olmedillas E, Cano O, Vázquez M, Rodríguez L, et al. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nat Commun* 2017 81 [Internet]. 2017 Nov 16 [cited 2022 Feb 5];8(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-01708-9>
265. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson

BIBLIOGRAFÍA

- WH, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Reports Med* [Internet]. 2020 Jun 23 [cited 2021 Dec 23];1(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32835303/>
266. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens - PubMed [Internet]. [cited 2023 Jan 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2216603/>
267. Chen X, Pan Z, Yue S, Yu F, Zhang J, Yang Y, et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 2020 51 [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2023 Jan 6];5(1):1–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00301-9>
268. Martin-Vicente M, Almansa R, Martínez I, Tedim AP, Bustamante E, Tamayo L, et al. Low anti-SARS-CoV-2 S antibody levels predict increased mortality and dissemination of viral components in the blood of critical COVID-19 patients. *J Intern Med* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jan 6];291(2):232–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34611927/>
269. Ho MS, Chen WJ, Chen HY, Lin SF, Wang WC, Di J, et al. Neutralizing Antibody Response and SARS Severity. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005 [cited 2023 Feb 26];11(11):1730. Available from: </pmc/articles/PMC3367364/>
270. Hung IFN, To KKW, Lee CK, Lin CK, Chan JFW, Tse H, et al. Effect of clinical and virological parameters on the level of neutralizing antibody against pandemic influenza A virus H1N1 2009. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Feb 26];51(3):274–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20575664/>
271. Buchy P, Vong S, Chu S, Garcia JM, Hien TT, Hien VM, et al. Kinetics of Neutralizing Antibodies in Patients Naturally Infected by H5N1 Virus. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2023 Feb 26];5(5):e10864. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010864>
272. Fu Y, Li Y, Guo E, He L, Liu J, Yang B, et al. Dynamics and Correlation Among Viral Positivity, Seroconversion, and Disease Severity in COVID-19. <https://doi.org/107326/M20-3337> [Internet]. 2020 Dec 8 [cited 2023 Mar 1];174(4):453–61. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M20-3337>
273. Feng X, Yin J, Zhang J, Hu Y, Ouyang Y, Qiao S, et al. Longitudinal Profiling of Antibody Response in Patients With COVID-19 in a Tertiary Care Hospital in Beijing, China. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Mar 15 [cited 2023 Jan 6];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33790892/>
274. Guthmiller JJ, Stovicek O, Wang J, Changrob S, Li L, Halfmann P, et al. SARS-CoV-2 Infection Severity Is Linked to Superior Humoral Immunity against the Spike. *MBio* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jan 6];12(1):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33468695/>
275. Ren L, Zhang L, Chang D, Wang J, Hu Y, Chen H, et al. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19. *Commun*

BIBLIOGRAFÍA

- Biol [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jan 6];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33311543/>
276. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2023 Jan 6];6(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190079/>
277. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Jan 6];13(7):399–409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28615731/>
278. Manothummetha K, Chuleerarux N, Sanguankeo A, Kates OS, Hirankarn N, Thongkam A, et al. Immunogenicity and Risk Factors Associated With Poor Humoral Immune Response of SARS-CoV-2 Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplant: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Netw open* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 8];5(4):E226822. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35412626/>
279. Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D, Schwartz IF, Ben-Yehoyada M, Shashar M, et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jan 8];21(8):2719–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33866672/>
280. Rabinowich L, Grupper A, Baruch R, Ben-Yehoyada M, Halperin T, Turner D, et al. Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J Hepatol* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jan 8];75(2):435–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892006/>
281. Dębska-Ślizień A, Ślizień Z, Muchlado M, Kubanek A, Piotrowska M, Dabrowska M, et al. Predictors of Humoral Response to mRNA COVID19 Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Longitudinal Study-The COViNEPH Project. *Vaccines* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Jan 8];9(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34696273/>
282. Furian L, Russo FP, Zaza G, Burra P, Hartzell S, Bizzaro D, et al. Differences in Humoral and Cellular Vaccine Responses to SARS-CoV-2 in Kidney and Liver Transplant Recipients. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Apr 14 [cited 2023 Jan 8];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35493446/>
283. Nazaruk P, Monticolo M, Jędrzejczak AM, Krata N, Moszczuk B, Sańko-Resmer J, et al. Unexpectedly High Efficacy of SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccine in Liver versus Kidney Transplant Recipients-Is It Related to Immunosuppression Only? *Vaccines* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jan 8];9(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34960200/>
284. Aguilar-Bretones M, Westerhuis BM, Raadsen MP, de Bruin E, Chandler FD, Okba NMA, et al. Seasonal coronavirus-specific B cells with limited SARS-CoV-2 cross-reactivity dominate the IgG response in severe COVID-19. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Jan 8];131(21). Available from:

BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34499051/>
285. Guo L, Wang Y, Kang L, Hu Y, Wang L, Zhong J, et al. Cross-reactive antibody against human coronavirus OC43 spike protein correlates with disease severity in COVID-19 patients: a retrospective study. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 8];10(1):664–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33734013/>
286. Hall VG, Ferreira VH, Ierullo M, Ku T, Marinelli T, Majchrzak-Kita B, et al. Humoral and cellular immune response and safety of two-dose SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jan 8];21(12):3980–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34347934/>
287. Hod T, Ben-David A, Olmer L, Levy I, Ghinea R, Mor E, et al. Humoral Response of Renal Transplant Recipients to the BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Using Both RBD IgG and Neutralizing Antibodies. *Transplantation* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Jan 8];105(11):E234–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34310101/>
288. Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science* [Internet]. 2022 Jan 7 [cited 2023 Jan 8];375(6576):43–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34812653/>
289. Science Brief: SARS-CoV-2 Infection-induced and Vaccine-induced Immunity | CDC [Internet]. [cited 2023 Jan 8]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/vaccine-induced-immunity.html>
290. Yu Y, Esposito D, Kang Z, Lu J, Remaley AT, De Giorgi V, et al. mRNA vaccine-induced antibodies more effective than natural immunity in neutralizing SARS-CoV-2 and its high affinity variants. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jan 8];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35173254/>