



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**ESTUDIO DE LA SITUACIÓN INFECTIVA E
INMUNOLÓGICA FRENTE A SARS-CoV-2 DE
LOS EMPLEADOS DEL HOSPITAL CENTRAL
DE LA DEFENSA GÓMEZ ULLA EN TIEMPOS
DE PANDEMIA**

**Tesis Doctoral presentada por
MARÍA SIMÓN SACRISTÁN**

2021



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**ESTUDIO DE LA SITUACIÓN INFECTIVA E
INMUNOLÓGICA FRENTE A SARS-CoV-2 DE
LOS EMPLEADOS DEL HOSPITAL CENTRAL
DE LA DEFENSA GÓMEZ ULLA EN TIEMPOS
DE PANDEMIA**

**Tesis Doctoral presentada por
MARÍA SIMÓN SACRISTÁN**

**Director:
Dr. Carlos Gutiérrez Ortega**

**Codirectora:
Dra. María Mateo Maestre**

Alcalá de Henares, 2021

DEDICATORIA

A todas las personas que han fallecido víctimas de la COVID-19 y a todas las víctimas que han sufrido estas pérdidas para que vayan sanando sus cicatrices emocionales.

A todo el personal sanitario que ha trabajado y sigue trabajando, de manera incondicional para paliar el impacto de la pandemia.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Carlos Gutiérrez por su entrega y paciencia y a la Dra. María Mateo Maestre, mi Tte Coronel porque apostó por este proyecto desde el principio, sin dudar, ni un segundo.

A mis compañeros del Servicio de Microbiología en especial a Ana por su ayuda en la estadística y a Maribel por sus aportaciones y opiniones técnicas.

A todos los técnicos de mi Servicio, en especial a Alicia porque sin su colaboración no hubiera sido posible llevar a cabo esta investigación.

A Miguel Ramos de Mateo por su ayuda en el formato de este trabajo.

A Catherine por su implicación en este proyecto.

Al Ministerio de Defensa por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al IMPDEF, al Servicio de Salud Laboral y al Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario Central de la Defensa Gómez Ulla, porque, sin su colaboración altruista, no habría sido posible la recogida de datos con tantísima profesionalidad.

A todos los trabajadores del hospital que de forma voluntaria han participado en este estudio.

A mis amigos, los cuales han estado a mi lado durante este periodo, animándome a culminar este trabajo.

A mis padres que siempre han estado ahí y siempre lo estarán.

Y en especial a ti, por tu apoyo incondicional.

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Abstract.....	7
III.	Introducción.....	13
1.	Antecedentes históricos	15
2.	Situación actual.....	22
3.	Fuente de infección y transmisión.....	25
3.1.	Fuente de infección.....	25
3.2.	Transmisión.....	27
3.2.1.	Transmisión humano-humano.....	27
a.	Transmisión respiratoria	27
b.	Transmisión por fómites (superficies contaminadas).....	29
c.	Transmisión madre-hijo	30
d.	Otras vías de transmisión.....	31
3.2.2.	Transmisión animal-animal/animal- humano.....	32
4.	Agente etiológico	32
4.1.	Características generales de los coronavirus.....	32
4.2.	Características del SARS-CoV-2	35
4.2.1.	Variantes del SARS-CoV-2	37
4.2.2.	Fisiopatología	40
5.	Información de la enfermedad	42
5.1.	Periodo de incubación	42
5.2.	Duración de la enfermedad	42
5.3.	Periodo infeccioso.....	43

5.4.	Sintomatología	45
5.5.	COVID-19 persistente	51
5.6.	Pacientes asintomáticos.....	52
5.7.	Reinfecciones	53
5.8.	Coinfecciones	54
6.	Diagnóstico microbiológico	55
6.1.	Detección de componentes del virus.....	56
6.1.1.	Técnicas basadas en la detección de ARN viral.....	56
a.	RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction)	56
b.	RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification).....	59
c.	CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats).....	60
d.	RPA (Amplificación con recombinasa polimerasa):.....	61
6.1.2.	Técnicas basadas en la detección de antígenos.....	63
6.2.	Detección de anticuerpos	64
6.2.1.	Inmunocromatografía de flujo lateral.....	67
6.2.2.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	68
6.2.3.	CLIA (Chemiluminiscent immunoassay)	69
6.2.4.	ECLIA (electrochemiluminiscent immunoassay)	69
7.	Tratamiento.....	71
8.	Prevención.....	77
8.1.	Medidas preventivas	78
8.1.1.	Prevención a nivel personal	78
8.1.2.	Prevención a nivel comunidad/social.....	81
8.2.	Vacunas	85
IV.	Justificación.....	97

V.	Hipótesis	103
VI.	Objetivos.....	107
1.	Objetivo principal.....	109
2.	Objetivos secundarios.....	109
VII.	Material y Métodos	111
1.	Diseño	113
2.	Población a estudio.....	113
3.	Período de estudio	114
4.	Selección de la muestra	114
5.	Tamaño muestral	114
5.1.	Estudio transversal.....	114
5.1.1.	Criterios de inclusión.....	114
5.1.2.	Criterios de exclusión.....	114
5.2.	Estudio prospectivo	115
5.2.1.	Criterios de inclusión.....	115
5.2.2.	Criterios de exclusión.....	115
5.3.	Estudio de cohortes	115
5.3.1.	Criterios de inclusión.....	115
5.3.2.	Criterios de exclusión.....	115
6.	Variables a estudio.....	116
6.1.	Variables.....	116
6.2.	Otras variables	117
7.	Material.....	117
8.	Método	124
8.1.	Planificación. Organización general del trabajo.....	124

8.1.1. Estudio transversal	124
8.1.2. Estudio Prospectivo	126
8.1.3. Estudio de cohortes.....	126
8.2. Procedimientos microbiológicos.....	127
8.2.1. Diagnóstico molecular	127
8.2.2. Diagnóstico serológico	133
a. Detección de anticuerpos IgG anti-nucleocápside.....	133
b. Detección de anticuerpos IgG anti-spike	134
8.3. Análisis estadístico	135
8.3.1. Estadística descriptiva	135
8.3.2. Estadística analítica	136
VIII. Resultados.....	137
1. Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico):.....	139
1.1. Descripción general.....	139
1.2. Resultados RT-PCR SARS-CoV-2	139
1.3. Resultados de la serología.....	140
2. Estudio prospectivo (evolución estado inmunológico en pacientes IgG positivos).....	144
2.1. Descripción general.....	144
2.2. Primer control (3 meses tras detección inicial).....	145
2.3. Segundo control (6 meses tras detección inicial).....	146
2.4. Tercer control (9 meses tras detección inicial)	147
3. Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico después de la vacunación)	151
3.1. Descripción general.....	151
3.2. Resultados en función de haber padecido o no la COVID-19	153

3.2.1.	Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike	153
3.2.2.	Niveles de anticuerpos IgG anti-spike	154
3.3.	Distribución de edad y sexo en sujetos con y sin infección previa	155
3.4.	Resultados en función del sexo.....	156
3.4.1.	Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike	156
3.4.2.	Niveles de anticuerpos IgG anti-spike.....	156
3.5.	Resultados en función del sexo y de haber padecido o no la enfermedad	157
3.5.1.	Sujetos con infección previa	157
a.	Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike	157
b.	Niveles de anticuerpos IgG anti-spike.....	158
3.5.2.	Sujetos sin infección previa.....	159
a.	Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike	159
b.	Niveles de anticuerpos IgG anti-spike.....	159
3.6.	Resultados en función de la edad	160
IX.	Discusión y Limitaciones	169
1.	Discusión	171
1.1.	Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico)	171
1.2.	Estudio prospectivo (evolución del estado inmunológico en pacientes IgG positivos)	179
1.3.	Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico tras la vacunación).....	188
2.	Limitaciones	197
2.1.	Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico)	197
2.2.	Estudio prospectivo (evolución del estado inmunológico en pacientes IgG positivos)	198
2.3.	Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico tras la vacunación).....	199

3.	Aplicaciones prácticas	201
X.	Conclusiones	203
XI.	Bibliografía	207
XII.	Anexos.....	243
	Anexo 1. Encuesta IMPDEF	245
	Anexo 2. Producción científica.....	247
	Anexo 3. Informe del comité ético de investigación.....	251

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las variantes de importancia en salud pública.....	39
Tabla 2. Vacunas aprobadas en Europa y EEUU	95
Tabla 3. Resultados en base a grupos de riesgo	142
Tabla 4. Características de pacientes positivos	143
Tabla 5. Resultados IgG positivos por sexo, síntomas y grupos de exposición.	149
Tabla 6. Concentración sérica de IgG anti-spike en AU/ml.....	162
Tabla 7. Porcentaje de disminución de Ac en sujetos con y sin infección previa	163
Tabla 8. Distribución de edad y sexo	163
Tabla 9. Porcentaje de disminución en función del sexo.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gripe española	19
Figura 2. Vacunación por grupos de edad	25
Figura 3. Transmisión del SARS-CoV-2.	29
Figura 4. Estructura genómica del SARS-CoV-2	37
Figura 5. Dinámica reducción carga viral: casos graves (rojo) y casos leves (verde)	44
Figura 6. Funcionamiento de RT-PCR.....	59
Figura 7. Funcionamiento test de antígenos tipo sándwich	64
Figura 8. Respuesta inmunológica frente al SARS-CoV-2.....	66
Figura 9. Funcionamiento test serológicos	67
Figura 10. Test rápido Anticuerpos (Wonfo®)	68
Figura 11. Detección del virus (cultivo y PCR), y Ac (serología)	71
Figura 12. Recomendaciones SEIMC para manejo clínico de pacientes	77
Figura 13. Nimbus Microlab Seegene. Servicio de Microbiología. HCDGU	121
Figura 14. MagCore HF16. Servicio de Microbiología. HCDGU.....	122
Figura 15. Analizador CFX 96 Real-time System. Servicio de Microbiología. HCDGU.....	122
Figura 16. Equipo Architect Servicio de Microbiología. HCDGU	123
Figura 17. Perfil térmico Allplex 2019-nCoV. Servicio de Microbiología. HCDGU	131
Figura 18. Perfil térmico qCOVID19. Servicio de Microbiología. HCDGU	131
Figura 19. Positivo (Allplex 2019-nCoV) Servicio de Microbiología. HCDGU	132
Figura 20. Negativo (Allplex 2019-nCoV) Servicio de Microbiología. HCDGU	132
Figura 21. Síntomas más frecuentes	143
Figura 22. Diagrama de flujo del estudio prospectivo	148
Figura 23. Evolución detección de anticuerpos a los 3, 6 y 9 meses	149
Figura 24. Prevalencia anticuerpos según edad en el primer control.	150
Figura 25. Prevalencia anticuerpos según edad en el segundo control	150
Figura 26. Prevalencia anticuerpos según edad en el tercer control	151
Figura 27. Diagrama de flujo de la muestra para el estudio de cohortes.....	161
Figura 28. Concentración sérica de IgG anti-S a lo largo del periodo de estudio	162
Figura 29. Representación gráfica del porcentaje de reducción de los niveles de Ac en función de infección previa.....	164
Figura 30. Representación de los títulos Ac (AU/ml) en ambos grupos (Se omiten los valores alejados y extremos para una mejor visualización de las cajas).	164

Figura 31. Representación de los títulos Ac (AU/ml) en ambos grupos.	165
Figura 32. Representación gráfica del porcentaje de reducción de los niveles de Ac en función de sexo.	165
Figura 33. Representación del porcentaje de reducción de los niveles de Ac a los 7 meses según sexo y en función de infección previa.	166
Figura 34. Representación de los títulos de Ac en función de la edad.	167

ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
SARS-CoV2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
COVID-19	Enfermedad por coronavirus
CoV	Coronavirus
HCoV	Coronavirus humano
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Grave
MERS-CoV	Síndrome Respiratorio de Oriente Próximo
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
NTD	Dominio N-terminal
CTD	Dominio C-terminal
RBD	Receptor Binding domain
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
Ct	Ciclo en el umbral
RDV	Remdesivir
AC	Anticuerpos
EMA	Agencia europea del medicamento
AEMPS	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
ISFAS	Instituto Social de las Fuerzas Armadas
SERMAS	Servicio Madrileño de salud
HCDGU	Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla
IMPDEF	Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa

ZO	Zona de Operaciones
CTFAS	Centro de Transfusiones de las Fuerzas Armadas
EPI	Equipo de protección individual
URL	Unidades relativas de luz
AU/ML	Unidades de anticuerpo por mililitro

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La enfermedad respiratoria causada por el nuevo coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) se asocia con una alta morbilidad y mortalidad. Los profesionales sanitarios representan una cohorte susceptible a la infección debido al contacto estrecho con los pacientes.

Los estudios de seroprevalencia pueden determinar la proporción de la población que ha sufrido una infección. Son precisos para toda la comunidad, pero también para grupos más pequeños, como la población expuesta y vulnerable en hogares de ancianos e instalaciones de atención médica. La evaluación de la prevalencia en el personal sanitario permite analizar el nivel de exposición entre dichos sujetos.

Aunque existen evidencias sustanciales sobre las respuestas inmunológicas contra el SARS-CoV-2, el tiempo de seroconversión y los niveles de anticuerpos adquiridos aún no están definidos y la correlación entre los niveles de anticuerpos, la protección contra la reinfección y la inmunidad protectora también sigue siendo desconocida.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la situación infectiva y la inmunidad adquirida frente al SARS-CoV-2 de los profesionales sanitarios del HCDGU durante los primeros meses de la pandemia, estudiar la evolución del estado inmunológico en aquellos empleados que hubieran desarrollado inmunidad tras haber padecido la infección y conocer la evolución de su estado inmunológico tras la vacunación.

MATERIAL Y METODOS

Para lograr los objetivos descritos anteriormente, se llevaron a cabo tres estudios consecutivos: en primer lugar un estudio observacional descriptivo transversal, en segundo lugar un estudio prospectivo longitudinal y por último un estudio de cohortes prospectivo. La recogida de datos transversales y longitudinales se realizó en el periodo comprendido entre el 24 abril de 2020 y el 15 de septiembre de 2021.

Para el primer estudio (transversal) se realizó RT-PCR y detección de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 (IgG anti-nucleocápside) a todo el personal que estaba prestando sus servicios en el HCDGU durante la pandemia. Una vez obtenidos y analizados los resultados del estudio transversal se reclutaron a trabajadores que presentaban inmunidad frente al SARS-CoV-2 y se llevó a cabo el segundo estudio (prospectivo longitudinal) mediante la detección cualitativa de anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) de forma trimestral durante un periodo 9 meses.

Por último, para el estudio de cohortes se incluyó a personal del HCDGU que había sufrido la infección por SARS-CoV-2 y personal *naïve* frente al SARS-CoV-2, ambos grupos previamente vacunados (pauta completa con dos dosis) con *Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2)*. Se realizó la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos post-vacunales (IgG anti-spike) a los 3, a los 5 y a los 7 meses post-vacunación.

RESULTADOS

En el estudio transversal se incluyeron 2754 trabajadores del HCDGU reclutados entre el 25 de abril 2020 y el 10 de junio de 2020. El 1,1% de los profesionales sanitarios tuvieron RT-PCR positiva en el momento del estudio. Se detectaron anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2 en 450 (16,3%).

La seroprevalencia fue mayor en aquellos sin formación específica frente al SARS-CoV-2 que en los que la habían recibido (18,6% vs 14,5% $p= 0,035$)

Para el estudio prospectivo se incluyeron 168 trabajadores del HCDGU que presentaban anticuerpos tipo IgG antinucleocápside, reclutados a partir del estudio transversal. La prevalencia de anticuerpos IgG antinucleocápside a lo largo del seguimiento fue disminuyendo durante los tres controles realizados (83,3%, 52,1% y 24,0% respectivamente; $p < 0,001$). Del total de sujetos que finalizaron el seguimiento (N=129) el 24,0% mantuvieron anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2, mientras que el 76,0% de los mismos habían negativizado tras 9 meses de seguimiento.

El aumento de la edad se asoció con una mayor durabilidad de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2.

Para el estudio de cohortes se incluyeron 122 trabajadores del HCDGU; 58 que habían sufrido la infección por SARS-CoV-2 y 64 sujetos *naïve* frente al SARS-CoV-2, ambos grupos previamente vacunados (pauta completa con dos dosis) con *Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2)*.

Todos los individuos incluidos en el estudio (N=122) presentaban niveles de anticuerpos IgG anti-Spike detectables y todos ellos mantuvieron niveles de los mismos por encima del punto de corte (>50AU/ml) hasta el final del seguimiento.

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG anti-S (AU/ml) a lo largo de los 7 meses de seguimiento tanto en el grupo con infección previa como en el grupo de sujetos sin infección previa se observó un descenso estadísticamente significativo ($p<0,001$).

La reducción global en los títulos de anticuerpos al finalizar el seguimiento en el grupo sin infección previa fue superior al observado en aquellos que habían padecido la infección, 85% vs 75,6%, respectivamente ($p<0,001$).

Los títulos de anticuerpos detectados en cada uno de los controles fueron más elevados en los sujetos con infección previa que en aquellos sin evidencia de infección ($p<0,001$). En nuestros resultados no encontramos asociación entre los títulos de anticuerpos detectados, ni en el porcentaje de disminución de los mismos con las variables sexo y edad.

CONCLUSIONES

Los datos de seroprevalencia del SARS-CoV-2 entre los profesionales sanitarios de nuestro hospital se encuentran dentro de los límites esperados (16,3%). El porcentaje de sujetos infectados en el momento del estudio fue de 1,1%.

La formación específica frente al SARS-CoV-2 reduce los contagios en los profesionales sanitarios.

Un alto porcentaje de los profesionales sanitarios no mantuvieron (inmunidad natural) niveles de anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) al finalizar el seguimiento de 9 meses. Casi la mitad de los trabajadores perdieron los anticuerpos a los 6 meses.

La inmunidad generada por la vacuna disminuye de forma significativa a lo largo del tiempo. Esta disminución es más pronunciada en los sujetos que no han padecido la COVID-19.

II.ABSTRACT

INTRODUCTION

The Respiratory disease caused by the new severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) is related to high morbidity and mortality. Healthcare workers (HCWs) are a cohort susceptible to infection due to close contact with patients.

Seroprevalence surveys can provide relevant information on the proportion of the population who has experienced an infection. They are accurate for the entire community, but also for smaller groups, such as the exposed and vulnerable population in nursing homes and healthcare facilities. The evaluation of the prevalence in HCWs allows us to analyze their level of exposure.

Although there are substantial evidences on immune responses against SARS-CoV-2, seroconversion time and acquired antibody levels are not yet defined and the correlation between antibody levels, protection against reinfection and protective immunity still remain unknown.

The aim of this study was to investigate, during the first months of the pandemic, the infective status and acquired immunity against SARS-CoV-2 on the HCWs in the Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (HCDGU). The study also aims to measure the evolution of the immune status in those employees who had developed immunity after being infected as well as the evolution of their immune status after vaccination.

MATERIAL AND METHODS

In order to achieve the objectives previously mentioned, three consecutive surveys were carried out. Firstly a descriptive cross-sectional observational study, secondly a prospective longitudinal study, and finally a prospective cohort study. Cross-sectional and longitudinal data collections were undertaken from April 24, 2020 up to September 15, 2021.

A real time PCR test (RT-PCR) and the detection of antibodies against SARS-CoV-2 (antinucleocapsid IgG) were performed for the first cross-sectional study to any member of the staff who was providing services at the HCDGU during the pandemic. Once the outcomes of the cross-sectional survey had been obtained and analyzed, workers with immunity against SARS-CoV-2 were recruited. The second survey (longitudinal prospective) was undertaken through the qualitative detection of antibodies (antinucleocapsid IgG) during nine months on a quarterly basis.

Finally, for the cohort study, HCWs from HCDGU who had suffered SARS-CoV-2 infection as well as the naïve personnel against SARS-CoV-2 were included, both groups previously vaccinated (a full two doses *regimen*) with Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2). Qualitative and quantitative detection of post-vaccination antibodies (anti-spike IgG) was performed at three, five and seven months post-vaccination.

RESULTS

The cross-sectional study included 2 754 HCDGU workers recruited from April 25, 2020 up to June 10, 2020. At the time of the survey 1.1 % of HCWs were tested RT-PCR positive. IgG-type antibodies against SARS-CoV-2 were detected in 450 (16, 3 %).

The seroprevalence was higher in those without specific training against SARS-CoV-2 than in those who had being trained (18, 6 % vs 14,5 % $p = 0,035$).

Regarding the prospective study, 168 HCDGU workers with antinucleocapsid IgG antibodies were included, recruited from the cross-sectional study. The prevalence of antinucleocapsid IgG antibodies throughout the follow-up decreased in the three controls performed (83, 3 %, 52,1 % and 24,0 % respectively, $p < 0,001$). Of the total number of participants who completed the follow-up ($n=129$), 24,0 % maintained IgG-type antibodies against

SARS-CoV-2, while 76,0 % of them became negative after a nine months follow-up.

Increasing age was associated with greater durability of anti-SARS-CoV-2 antibodies.

The cohort study included 122 HCWs from HCDGU; 58 had suffered SARS-CoV-2 infection and 64 were naïve personnel against SARS-CoV-2. Both groups were previously vaccinated (a full two doses *regimen*) with Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2).

All the participants included in the study (n=122) had detectable anti-Spike IgG antibody levels above the cut-off point (> 50 AU/mL); those levels were maintained until the end of the follow-up.

During the seven months follow-up, the analysis of the levels of anti-S IgG antibodies (AU/mL) showed a statistically significant decrease ($p < 0,001$) on either groups with and without prior infection.

The global reduction in antibody titers at the end of follow-up in the group without prior infection was higher than that observed in those who had suffered the infection, 85 % vs 75,6 %, respectively ($p < 0,001$).

The antibody titers detected in every controls were higher in subjects with prior infection than in those without evidence of infection ($p < 0,001$). In our results, we did not find a link between the antibody titers detected, nor in the percentage of their decrease with sex and age variables.

CONCLUSION

The SARS-CoV-2 seroprevalence data among HCWs from our hospital was as expected (16, 3%). The percentage of infected participants at the time of the survey was low (1,1%). Specific training against SARS-CoV-2 reduces infections in HCWs.

A high percentage of HCWs did not maintain (natural immunity) antibody levels (antinucleocapsid IgG) at the end of the nine months follow-up. Almost half of our workers lost their antibodies at 6 months time.

The immunity generated by the vaccine decreases significantly with time. The decrease is higher among subjects that have not been infected by COVID-19.

III. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos

La enfermedad es parte de la historia de la humanidad. En la actualidad estamos sufriendo la pandemia del coronavirus, pero desde que el ser humano empezó a organizarse en sociedad creando núcleos de personas que convivían juntos en un mismo territorio, las enfermedades infecciosas han ido adquiriendo un especial protagonismo¹. La aparición y propagación de las mismas se produjo con regularidad a lo largo de la historia, debido a la expansión de los intercambios entre comunidades, con el consiguiente aumento de las interacciones entre humanos y animales facilitando la transmisión de patógenos zoonóticos, la expansión de las ciudades, la extensión de los territorios comerciales, el aumento de los viajes y los efectos en los ecosistemas².

A medida que la población mundial fue creciendo, cuando una enfermedad se expandía y afectaba a varias zonas del mundo, convirtiéndose en una amenaza para la población, se empezaron a documentar las primeras pandemias. Estas pandemias en ocasiones consiguieron transformar a las sociedades en las que aparecieron y, probablemente, han influido en el curso de la historia. Durante siglos, la implementación de medidas de salud pública como el aislamiento, la cuarentena y el control de fronteras ayudaron a contener la propagación de estas enfermedades y a mantener la estructura de la sociedad.³

Las más relevantes se resumen a continuación:

1. Peste de Justiniano

La peste es causada por la bacteria *Yersinia pestis*, transmitida por pulgas que actúan como vector y su reservorio principal son los roedores.

La peste de Justiniano comenzó en Egipto y se propagó por todo el Imperio Romano de Oriente y sus vecinos. Entre los años 541 y 543, causó cerca de 100 millones de muertes en el Imperio y principalmente en Constantinopla (la actual Estambul)⁴. La capital perdió una cuarta parte de su población, y el propio emperador (Justiniano) estuvo a punto de morir. La estructura muy desarrollada

del Imperio Romano facilitó la dispersión de la enfermedad a lo largo de sus rutas comerciales y militares.

Sin embargo, no hay constancia de que afectara a las sociedades bárbaras, menos organizadas, fuera de límites de Roma. Las consecuencias económicas fueron desastrosas, ya que hubo momentos en que el número de fallecidos superaba el de vivos.

La alta mortalidad causada por la enfermedad podría haber contribuido al debilitamiento y, finalmente, al declive del Imperio Bizantino⁴. Era la primera epidemia de peste de la que se tiene constancia. Después de esta pandemia inicial, ocurrieron brotes intermitentes de peste cada 8 a 12 años durante dos siglos y luego desaparecieron por razones desconocidas.

2. Peste negra

La segunda pandemia de peste se originó en Asia central y comenzó a extenderse hacia el oeste a lo largo de las principales rutas comerciales. A su llegada al mar Mediterráneo, la enfermedad se propagó con rapidez, en especial por tráfico marítimo a Italia, Grecia y Francia y más tarde a todo el continente europeo por tierra⁵. Duró en Europa hasta principios del siglo XIX y provocó 200 millones de fallecidos.

La peste negra era ya una vieja conocida cuando se vivió el peor momento de esta enfermedad entre 1346 y 1353. Era famosa por sus antecedentes, sin embargo se desconocía por completo tanto sus causas como su tratamiento. Esto, junto con la gran velocidad de propagación, la convirtió en una de las mayores pandemias de la historia². Se estima que la península Ibérica habría perdido el 65% de la población y en la región italiana de la Toscana, entre el 50 y el 60%⁶.

La peste negra acabó con al 30% de la población europea y hubo sucesivas oleadas en diferentes ciudades como Milán (1630), Londres (1665-1666) y Marsella (1720-1722). Esto sugiere que *Yersinia pestis* puede haber persistido en reservorios de roedores y reaparecer en la población humana⁷.

La bacteria desapareció de Europa y esto podría estar relacionado con la extinción de reservorios de roedores locales⁸. En ese momento, como ya se ha mencionado, no existía un tratamiento eficaz contra la peste. Los guardias armados impusieron un cordón sanitario a lo largo de las rutas de tránsito y en los puntos de acceso a las ciudades. Se logró una separación permanente entre personas sanas e infectadas en los campamentos y luego en los hospitales de peste. Las ciudades portuarias estaban cerradas a los buques que llegaban de áreas infectadas por la peste. Los barcos con sospecha se pusieron en cuarentena, los pasajeros y la tripulación se aislaron. Dichas navegaciones se fumigaron y fueron retenidas durante 40 días. La peste negra diezmó la Europa medieval y tuvo un impacto significativo en su desarrollo socioeconómico, cultura, arte, religión y política⁹.

3. Viruela

La viruela se originó por el llamado *Variola virus*. Su afectación en los seres humanos es conocida desde hace al menos 10.000 años. Durante varios siglos, continuas epidemias devastaron a la población. El nombre de viruela, cuyo significado es “pústula pequeña”, hace referencia a las lesiones que aparecían en la piel y tejidos de los pacientes infectados. Era una enfermedad grave y muy contagiosa que exterminó la población mundial desde su aparición, llegando a tener una tasa de mortalidad del 30%.¹⁰

Después de afectar durante milenios al *viejo mundo*, debido a la conquista de América se extendió por el *nuevo mundo*. Los recién llegados habían cruzado el océano y, de esta manera, contagiado a las poblaciones nativas las cuales tenían defensas muy bajas frente a nuevas enfermedades. Durante el siglo XVIII, en Europa, tuvo un periodo de expansión dramático, infectando y desfigurando a millares de personas. La viruela es una de las enfermedades que, por fortuna, se ha conseguido erradicar mediante la inmunización¹⁰. Fue gracias a la lucha contra esta enfermedad cuando se descubrió la primera vacuna. La británica Lady Montagu, observó cómo en Turquía los que se pinchaban con agujas impregnadas en pus de viruela de las

vacas no contraían la enfermedad. Divulgó el procedimiento pero no consiguió el apoyo de la clase médica que siguió desconfiando del método, hasta que el científico Edward Jenner, casi cien años después, probó su eficacia y desarrolló finalmente la vacuna.

En 1977 se registró el último caso de contagio del virus, que desde entonces se considera extinguido².

4. Gripe española

La pandemia de la gripe española es una de las más graves de la historia. Fue producida por el virus de la gripe A/H1N1 que, parece ser, surgió por adaptación genética de un virus de influenza aviar existente a un nuevo huésped humano¹¹.

Aunque se conoce como gripe española, los primeros casos se documentaron en Estados Unidos. En marzo de 1918, durante los últimos meses de la Primera Guerra Mundial (1914-1919), un soldado acudió al botiquín de su centro de instrucción quejándose de fiebre¹² (Figura 1). Pocas horas después, cientos de reclutas enfermaron con clínica similar y a lo largo de las semanas siguientes cayeron enfermos muchos más. En abril de ese mismo año, este contingente llegó a Europa propagando así el virus por toda su extensión. Se denominó “gripe española” porque España se mantuvo neutral en la Gran Guerra y fue el único país donde la información sobre la pandemia circulaba con libertad, en contraste con el resto de países implicados en el conflicto armado que trataban de ocultar los datos². Esta cepa del virus de la gripe A/H1N1 se globalizó y extendió por todo el mundo gracias al masivo y rápido movimiento de militares que se repartían por los frentes europeos. Los sistemas de salud de todos los países se desbordaron y las funerarias no daban abasto. La pandemia de influenza de 1918-1919 provocó 500 millones de infectados y 50 de fallecidos¹³. Las gripes antes conocidas reportaban altas tasas de mortalidad en los muy jóvenes (<5 años) y los ancianos (> 65 años). Sin embargo, la pandemia

de 1918-1919 mostró una curva de mortalidad con altas tasas de letalidad también en los jóvenes sanos adultos de 20 a 40 años¹⁴.

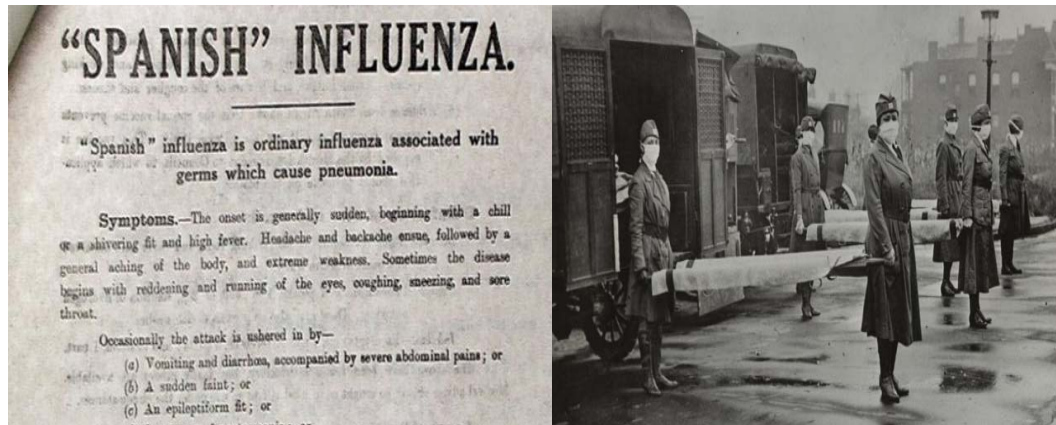


Figura 1. Gripe española

Fuente: www.nationalgeographic.com.es

5. Gripe asiática

La segunda pandemia de la gripe se registró por primera vez en la península de Yunán, China (1957-1959), fue causada por un nuevo subtipo de la gripe A /H2N2¹⁵, una variante que procedía del virus de 1918, debido a la adquisición y reordenamiento de 3 nuevos segmentos de genes aviares².

La transmisión sostenida del nuevo virus comenzó en diciembre de 1957 con oleadas recurrentes durante varios años. La mortalidad mundial de la pandemia de influenza de 1957-1959 se estimó en 1 a 2 millones de personas¹⁶. Afectó a un mayor número de niños en edad escolar hasta adultos jóvenes de hasta los 35 o 40 años de edad. Los adultos mayores fueron menos afectados, incluidos los de más de 60 años. Esta distribución inusual se atribuyó a la ausencia de anticuerpos protectores entre niños y adultos de mediana edad¹⁷. La neumonía bacteriana secundaria fue una causa relativamente menor de muertes en comparación con la gripe del 18, posiblemente como resultado del uso generalizado de antibióticos¹⁸.

En 1952, la Organización Mundial de la Salud (OMS) había realizado una red mundial de vigilancia del virus de la influenza que proporcionaba información

sobre la aparición y propagación de éste. Las medidas de contención (como el cierre de colegios y guarderías, la prohibición de reuniones públicas) fueron diferentes de un país a otro, pero solo se logró retrasar la aparición de la enfermedad unas semanas².

En aquel momento la vacunación contra la influenza no consiguió tener un impacto significativo en la pandemia, debido a una cobertura inadecuada¹⁹.

6. Gripe de Hong Kong

Tan solo diez años después de haber superado la última gran pandemia de gripe, apareció, de nuevo en Asia, la llamada gripe de Hong Kong. Una variación del virus de la gripe A (H3N2). El nuevo reordenamiento reemplazó al virus A / H2N2 que circulaba en la población humana desde 1957. Fue registrada en esta ciudad en 1968 y se expandió por todo el mundo con un patrón muy parecido al de la gripe asiática. Se estimó que la tasa de mortalidad mundial de la pandemia de 1968-1970 fue de 0,5 a 2 millones²⁰. La edad media al fallecer fue de 62 a 65 años. La pandemia de influenza de 1968-1970 fue más leve en todos los países y parecida a las epidemias estacionales graves. No se implementaron medidas de contención específicas durante esta pandemia².

7. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

De las pandemias más recientes conocidas por el ser humano y, a su vez, con mayor gravedad, destacamos la del Virus de Inmunodeficiencia Adquirida, el VIH. Dicho virus es causante del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), un conjunto de síntomas que se manifiestan cuando la infección ha llegado a una etapa clínica e inmunológicamente crítica²¹. Los primeros casos que se registraron y documentaron tuvieron lugar en 1981, concretamente se informaron cinco casos, dos de los cuales fueron mortales; era un cuadro clínico desconocido hasta ese momento. Desde entonces se fue extendiendo por todo el mundo, centrando gran parte de los esfuerzos de las organizaciones mundiales de la salud²¹. Su estudio y descubrimiento se llevó a cabo gracias al trabajo de dos equipos de investigadores, uno en el Instituto Pasteur de Paris (Francia) y el

otro en el Instituto de Virología Humana de la Universidad de Maryland en Baltimore (Estados Unidos).

Tras la caracterización del virus, se sugirieron distintas hipótesis sobre cuál podría haber sido su origen. Una de estas ubica el origen del virus en África ecuatorial. El virus de inmunodeficiencia simia habría mutado ocasionando un salto entre especies hasta llegar a los humanos en algún momento del siglo XX. Como se ha mencionado anteriormente, los primeros registros de la enfermedad corresponden a 1981, pero a pesar de ello ciertas investigaciones realizadas posteriormente muestran que algunos sujetos ya habían contraído la infección por lo menos en la década de 1950. En el año 1984, un estudio identificó a un asistente de vuelo de " Air Canadá " como el "paciente cero", la persona que llevó el virus de África ecuatorial a Occidente, donde se difundió con rapidez entre la comunidad homosexual²². Su contagio se produce por contacto con fluidos corporales (transmisión sanguínea, vertical, sexual). A pesar de que estas vías de transmisión lo hacen menos contagioso que otros virus como la gripe, el desconocimiento inicial permitió que se expandiera con mucha rapidez. Se calcula que el VIH ha podido causar alrededor de 25 millones de muertes en todo el mundo.

Para que una enfermedad se denomine pandemia debe propagarse por todo el mundo, extendiéndose a varios países de diferentes continentes y afectando a un gran número de personas. Es decir, este término no implica una gravedad mayor o menor de la enfermedad, sino una propagación rápida y mundial. Según la OMS, se produce una pandemia cuando aparece un nuevo virus que se propaga por todos los países y la mayor parte de la población no es inmune al mismo³.

2. Situación actual

La pandemia COVID-19 (enfermedad por Coronavirus), producida por un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2 (nuevo coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo), se ha transformado en poco tiempo en una amenaza para la humanidad, desencadenando la peor crisis sanitaria de este siglo. Más de 144 millones de personas han sido ya infectadas por el virus y más de 3 millones han muerto en todo el mundo como resultado de esta infección²³.

El 31 de diciembre de 2019, varios pacientes de Wuhan (República Popular China) desarrollaron neumonía e insuficiencia respiratoria que recordaban a la epidemia de SARS (síndrome respiratorio agudo severo) de 2003²⁴.

Fue entonces cuando la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (provincia de Hubei, China) informó sobre 27 casos de neumonía de etiología desconocida, con una exposición común a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos, incluyendo siete casos graves²⁵. El inicio de los síntomas del primer caso fue el 8 de diciembre de 2019. A principios de enero de 2020, concretamente el 7 de enero, se comunicó la identificación el agente causante de dicho brote, un betacoronavirus, un nuevo tipo de virus de la familia *Coronaviridae* que posteriormente se ha denominado SARS-CoV-2 y cuya secuencia genética fue compartida el 12 de enero²⁶. Fue aislado a partir de lavado broncoalveolar de dichos pacientes²⁷.

El cuadro clínico asociado a este virus se ha denominado COVID-19.

La infección por este coronavirus se extendió primero dentro de la República Popular de China y más tarde a varios países de Asia²⁸ antes de ser detectado en Italia e Irán.

En las primeras semanas de la pandemia casi todos los casos reportados en distintos países afectados se relacionaban con personas que habían viajado recientemente desde China, Irán o Italia, lo que demostró cómo los viajes

internacionales desde unos pocos países con una transmisión importante del SARS-CoV-2 podrían haber sembrado brotes en todo el mundo.

El día 11 de marzo de 2020 fue proclamada por la OMS pandemia a nivel mundial.

El primer caso en España fue reportado el día 31 de enero de 2020 y el primer fallecido se reportó el 13 de febrero del mismo año, cuando el total de casos confirmados en España era aún de 3. Ante el crecimiento exponencial de casos confirmados, el 14 de marzo de 2020 fue declarado el estado de alarma, con una cifra que ascendía a 6.332 casos, de los cuales 517 se habían recuperado, pero 193 habían fallecido²⁹.

La pandemia se ha dividido en varias olas a lo largo del tiempo, la primera comprendida entre los meses de enero a junio de 2020, la segunda de septiembre a diciembre de 2020, una tercera ola marcada por las reuniones navideñas comprendida de enero a marzo de 2021 y la cuarta ola todavía en curso que se inició a principios de abril de 2021, favorecida por las vacaciones de Semana Santa.

A fecha 13 de mayo de 2021 se han detectado 158.651.638 casos a nivel global y el número de fallecidos asciende a 3.299.764. A la cabeza en número de casos confirmados y número de fallecidos están los siguientes países: EEUU, India y Brasil.

En Europa se han notificado 51.709.930 casos confirmados en esta misma fecha (13 de mayo 2021) y los países europeos más afectados son Francia, Rusia y Turquía³⁰.

En España, el número de casos confirmados asciende a 3.592.751 con un total de 79.205 fallecidos³⁰ a 13 de mayo de 2021. Las comunidades autónomas con mayor número de casos son: Madrid, Cataluña y Andalucía.

A finales del pasado año comenzaron las campañas masivas de vacunación en varios países, incluido España. Las vacunas empleadas en nuestro

país son las siguientes: vacuna de Pfizer (dos dosis), Moderna (dos dosis), AstraZeneca (dos dosis) y Janssen (una dosis). A 13 de mayo de 2021 se han administrado un total de 20.623.815 dosis, el número de personas con una sola dosis administrada es de 14.318.348 (30,2% de la población) y con la pauta completa 6.502.978 personas que supone un 13,7% de la población (Figura 2)³¹.

Los coronavirus (CoV) constituyen una familia de virus que producen infección en los seres humanos y ciertos animales, incluyendo mamíferos como camellos, gatos y murciélagos y aves. Pueden transmitirse de los animales a los humanos, por ello está considerada enfermedad zoonótica³². Dentro de la familia de coronavirus no todos afectan a los humanos; los que si lo hacen (HCoV) producen habitualmente cuadros clínicos similares a un resfriado común con patrón estacional en invierno, pero en otras ocasiones pueden ser altamente patógenos y causar cuadros más graves como los producidos por los virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS) y del Síndrome Respiratorio de Oriente Próximo (MERS-CoV)³³. El virus del SARS ocasionó en 2003 cerca de 8.000 casos confirmados en 28 países, con una letalidad del 10% y desde entonces no se ha vuelto a notificar ningún otro caso³⁴, sin embargo del MERS-CoV se han notificado más de 2.500 casos desde 2012 (la mayoría se han detectado en Arabia Saudí), con una letalidad de 34%.

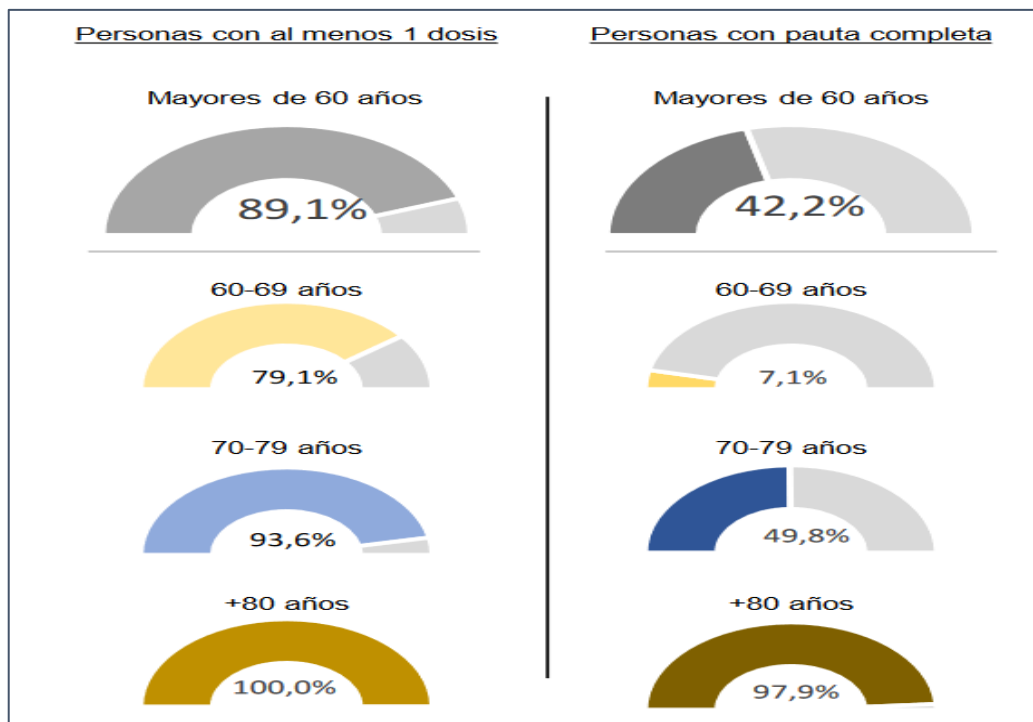


Figura 2. Vacunación por grupos de edad

Fuente: www.mscbs.gob.es

3. Fuente de infección y transmisión

3.1. Fuente de infección

El estudio y análisis de las secuencias genómicas demuestran que, al igual que en otros brotes de coronavirus, la infección se produce a través de un salto de hospedador del microorganismo desde otra especie de origen animal al humano. En este momento se desconoce con exactitud cuál es el reservorio natural, ya que no ha sido posible detectar ningún animal vinculado con el momento y el lugar de origen de la pandemia³⁵, pero existen evidencias científicas que apuntan a que el reservorio del SARS-CoV-2 son los murciélagos y que de éstos saltó a un hospedador intermediario. En el sureste de China, hace unos años, se aisló en un murciélago un virus cercano al SARS-CoV-2 denominado Bat CoV RATG13³⁶, por ello la hipótesis más aceptada sobre el

origen del SARS-CoV-2 es que un virus de murciélago haya podido evolucionar hacia el SARS-CoV-2. Recientemente se ha detectado un coronavirus muy relacionado en pangolines, lo que sugiere que estos podrían actuar de hospedadores intermediarios³⁷.

Ecología del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se encuentra en mayores concentraciones en las vías respiratorias altas al inicio de la enfermedad, posteriormente aumenta en las vías respiratorias inferiores^{38, 39, 40}.

También se ha detectado en niveles bajos en otros órganos como corazón, cerebro, riñón, hígado o sangre⁴¹. En el exterior del cuerpo humano este virus es más estable en condiciones de baja temperatura y baja humedad, mientras que las temperaturas elevadas y la mayor humedad disminuyen su vida media⁴².

Se ha podido demostrar que se puede detectar en forma de aerosol y permanece viable hasta 3 horas en el aire; en materiales como el cartón puede perdurar hasta 24 horas y en plástico o acero inoxidable dos o tres días⁴³.

Al igual que se observó con el virus MERS, donde muchas superficies en contacto con el paciente fueron contaminadas por el virus⁴⁴, el ARN viral del SARS-CoV-2 se ha encontrado en las zonas ocupadas por los pacientes afectados (zona sucia) más que en otros lugares del hospital, además se ha documentado contaminación de los baños (taza del WC, lavabo y manillares de la puerta) y de los ventiladores de aire⁴⁵.

3.2. Transmisión

3.2.1. *Transmisión humano-humano*

La transmisión humano-humano se estableció en las primeras semanas de la pandemia, cuando se demostró que el virus se propagaba por medio de gotas al toser o estornudar. Gracias a la evidencia científica acumulada se consideran varias rutas de transmisión, siendo la principal mediante inhalación de aerosoles y gotas respiratorias emitidas por los enfermos. También se puede producir la transmisión a través del contacto con objetos o superficies contaminadas (fómites). La transmisión madre-hijo es posible, pero poco frecuente. Otras rutas de transmisión como la fecal-oral, sexual y sanguínea no han sido documentadas. A continuación se resumen todas ellas.

a. *Transmisión respiratoria*

El tracto respiratorio superior es el primer lugar de replicación viral, con la subsiguiente infección descendente³⁹. El escenario ideal de transmisión para el SARS-CoV-2 es un lugar cerrado y ruidoso en el cual la gente debe vocear para comunicarse. Hablar y gritar en voz alta emite un flujo de gotas o aerosoles cargados de viriones. Los aerosoles permanecen en el aire durante minutos y son capaces de infectar a las personas a distancia (Figura 3).

El SARS-CoV-2 se transmite a través de gotitas de más de 5-10 micras de diámetro, comúnmente denominadas gotitas respiratorias, y a través de partículas más pequeñas, <5 micras de diámetro, que se denominan aerosoles.

Ahora se acepta que no hay evidencia real de que los patógenos del SARS-CoV-2 deban transportarse solo en grandes gotitas⁴⁶.

Al comienzo de la pandemia, la transmisión por aerosol del SARS-CoV-2, en general, no fue aceptada; sin embargo, en unos meses, se hizo evidente que

en algunos grupos, por ejemplo en coros^{47, 48}, centros comerciales⁴⁹ o restaurantes se explicaba mejor por la transmisión por aerosoles⁵⁰.

Dependiendo de su tamaño, los aerosoles de 15 micras a 100 micras llegan al tracto respiratorio superior, los aerosoles de 5 a 15 micras pueden llegar a la tráquea y los bronquios principales y los aerosoles menores o iguales a 5 micras tienen la capacidad de llegar hasta los alveolos.

Los aerosoles producidos al respirar o hablar son, en más del 80%, muy pequeños (<2,5 micras), proceden de los pulmones y en promedio se generan unos 500 por litro de aire exhalado. La tos produce 3.000 partículas y los estornudos 40.000, en su mayoría pequeñas (1-10 micras) que proceden del tracto respiratorio superior⁵¹.

Las condiciones para demostrar la transmisión de SARS-CoV-2 mediante aerosoles son las siguientes⁵² : dichos aerosoles generados deben contener microorganismos viables, estos microorganismos deben estar en cantidad suficiente y demostrar su capacidad para generar infección y, por último, que los tejidos diana de estos microorganismos sean accesibles⁵³.

A la vista de las pruebas encontradas^{54, 55} se puede establecer que:

- Los aerosoles generados contienen virus viables.
- Los virus contenidos en aerosoles tienen la capacidad de producir infección, en especial, en determinadas circunstancias: en las proximidades del caso índice durante mucho tiempo y en espacios cerrados y mal ventilados. En estas condiciones, pueden coexistir varios mecanismos de transmisión.
- Los tejidos diana son accesibles para aerosoles de cualquier tamaño con puertos de entrada en cualquier parte del tracto respiratorio.



Figura 3. Transmisión del SARS-CoV-2.

Fuente: www.covidreference.com

b. Transmisión por fómites (superficies contaminadas)

Al comienzo de la pandemia de SARS-CoV-2, no estaba claro en qué medida la transmisión a través de fómites era epidemiológicamente relevante. Un fómite es cualquier objeto inanimado que, contaminado o expuesto a agentes infecciosos como un virus, puede transferir una enfermedad a otra persona.

En estudios experimentales con altos inóculos (10^7 copias de ARN viral) de SARS-CoV-2 (mucho más grande que lo que contiene una gota de secreción respiratoria después de toser o estornudar), se pudo identificar virus viable en superficies de cobre, cartón, acero inoxidable y plástico a las 4, 24, 48 y 72 horas, respectivamente, a 21-23 °C y con 40% de humedad relativa⁴³. En condiciones reales, en entornos donde hay pacientes infectados, el virus SARS-CoV-2 se ha encontrado repetidamente en superficies inanimadas del entorno de los

pacientes (camas, baños, picaportes...) tanto en entornos hospitalarios como en los hogares de los pacientes⁵⁶, aunque el cultivo no ha sido posible⁵⁷. Tras los habituales procesos de desinfección, el material genético del virus se detecta en pocas ocasiones, incluso en las Unidades de Cuidados Intensivos y en las pocas ocasiones en las que se ha detectado no se ha podido cultivar, lo que, en principio, apunta a una ausencia de viabilidad⁵⁸. Estas observaciones parecen indicar que con los métodos de limpieza y desinfección recomendados, la transmisión por fómites sería muy rara⁵⁹.

Las personas que entran en contacto con superficies potencialmente contaminadas también entran en contacto con personas enfermas en un contexto de alta transmisión comunitaria, lo que dificulta la demostración de transmisión exclusiva a través de este mecanismo.

c. Transmisión madre-hijo

La transmisión vertical ocurre raramente; en aquellos casos en los que ha sucedido se considera que se debe al contacto estrecho entre madre e hijo tras el nacimiento.

En algunos casos en los que el recién nacido presentó síntomas de la COVID-19 se detectó ARN del SARS-CoV-2 en la placenta, así como en células fetales mononucleares; lo que demuestra la transmisión vertical del virus⁶⁰. En otros estudios se ha detectado en la placenta la expresión, aunque en cantidades mínimas, de los receptores ACE2 (Enzima convertidora de angiotensina 2). En otras infecciones de transmisión vertical (Zika o el citomegalovirus) sus receptores se expresan fuertemente en la placenta. Todo lo anterior sugiere que, aunque la vía de transmisión vertical es posible, la transmisión ocurriría, principalmente, después del nacimiento, debido al contacto del bebé con las secreciones respiratorias de la madre⁶¹. En cuanto a la transmisión a través de la leche materna, solo se ha podido detectar ARN en la leche, pero sin viabilidad del virus y, en los casos detectados, no se ha podido descartar la transmisión por contacto⁶².

d. Otras vías de transmisión

Heces y orina

Actualmente no hay evidencia de transmisión fecal-oral SARS-CoV-2 relevante. Aunque existe una alta concentración de receptores ACE2 en el intestino delgado⁶³, y se ha informado de la presencia prolongada de ARN viral del SARS-CoV-2 en muestras fecales²⁷, el virus vivo se ha detectado rara vez^{63 27}. Las manifestaciones clínicas gastrointestinales, aunque presentes, no son demasiado frecuentes^{24, 27}, lo que indicaría que esta vía de transmisión, de existir, tendría un menor impacto en la evolución de la epidemia.

Transmisión sexual

Se desconoce si es posible la transmisión puramente sexual. El SARS-CoV-2 no parece estar presente en el semen. Los estudios publicados hasta hoy mostraron ARN viral, pero no virus infeccioso en el semen⁶⁴ y ARN viral en el fluido vaginal en solo una ocasión⁶⁵. En un pequeño estudio de Orleans, no hubo transmisión entre parejas discordantes (cinco parejas) que continuaron teniendo relaciones sexuales mientras una de las parejas estaba en el período de contagio⁶⁶.

Sangre y hemoderivados

El riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 a través de la sangre o los productos sanguíneos se considera muy bajo.

Después del cribado de 2.430 donaciones en tiempo real (1.656 plaquetas y 774 sangre total), se encontraron muestras de plasma positivas para ARN viral de 4 donantes asintomáticos⁶⁷, pero no hubo evidencia de replicación del virus. No hay hasta el momento ningún caso confirmado de transmisión por sangre.

3.2.2. *Transmisión animal-animal/animal- humano*

Hay ciertos animales como los hurones, los visones y los felinos que son susceptibles a la infección y pueden llegar a desarrollar la enfermedad con afectación respiratoria y/ o gastrointestinal. Los perros también pueden desarrollar la enfermedad pero en menor medida.

Tras el inicio de la pandemia, en la ciudad de Wuhan se analizaron 102 gatos que habían estado en contacto con pacientes infectados, y el 14% tenían anticuerpos frente al SARS-CoV-2⁶⁸.

En la ciudad de Hong-Kong se detectó ARN del virus en dos perros y en Bélgica en un gato; en ambos casos animales de compañía que vivían con un enfermo de COVID-19⁶⁸. Así mismo se han ido detectando brotes en granjas de visones en distintos países. En una granja de Holanda, se pudo demostrar que varios trabajadores contrajeron la infección, debido a transmisión desde visones enfermos⁶⁸.

A pesar de lo descrito, se considera que hay muy pocos casos de posible transmisión desde los animales a los humanos, por lo cual este tipo de transmisión no tiene una gran contribución en la pandemia, cuyo punto fuerte es, claramente, la transmisión entre humanos.

4. Agente etiológico

4.1. Características generales de los coronavirus

Según la taxonomía actual, los coronavirus se clasifican como miembros del orden *Nidovirales*. La familia *Coronaviridae* se divide en dos subfamilias: *Coronavirinae* y *Torovirinae*. Originalmente, *Coronaviridae* se componía de tres géneros: Grupo 1, 2 y 3, derivado de la secuenciación del ARN y las relaciones serológicas de los miembros⁶⁹. La clasificación ha sido revisada recientemente de

acuerdo con la relación genética y filogenética. Ahora se dividen en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*.

Los *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* infectan solo a mamíferos y, normalmente, son responsables de infecciones respiratorias en humanos y gastroenteritis en animales, mientras que *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* son de origen aviar. El género *Betacoronavirus* se divide a su vez en cuatro subgéneros: *Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus* y *Norbecovirus*. Los miembros de la familia *Coronaviridae* infectan a múltiples especies, incluidos los humanos, otros mamíferos y aves, que producen un amplio espectro de enfermedades.

Hasta la aparición del SARS-CoV-2, se habían descrito seis coronavirus en humanos (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1) responsables de un número significativo de infecciones leves del tracto respiratorio superior en adultos inmunocompetentes, pero que pueden causar afecciones más graves en niños y ancianos⁷⁰. El SARS-CoV y MERS-CoV, ambos patógenos emergentes, son responsables de infecciones respiratorias graves con gran repercusión internacional debido a su morbilidad y mortalidad.

El coronavirus SARS-CoV-2 supone el séptimo coronavirus aislado y caracterizado capaz de provocar infecciones en humanos.

Los coronavirus son virus esféricos, miden de 80-120nm de diámetro y presentan un grado moderado de pleomorfismo. Están envueltos y contienen ARN monocatenario (ssRNA) de polaridad positiva entre 26 y 32 kilobases de longitud. El SARS-CoV-2 se compone de cuatro proteínas estructurales principales: proteína de la espícula (S), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E) que forman la envoltura viral, y la proteína de nucleocápside (N) que está dentro del virión asociada al ARN viral, el resto de proteínas están asociadas a la envuelta viral⁷¹.

Proteína S (espícula)

La glicoproteína S (espícula del inglés spike) es la determinante del tropismo del virus, ya que contiene el dominio de unión al receptor celular. Además es la proteína que tiene la actividad de fusión de la membrana viral con la célula y así permite la liberación del genoma viral dentro de esta⁷².

Cada proteína S se ensambla en un trímero que sobresale aproximadamente 20 nm de la envoltura viral. Son estas protuberancias las que le dan la apariencia característica de una corona solar cuando se observa con un microscopio electrónico lo que le da el nombre a la familia *Coronaviridae*. Cada monómero S consta de un ectodominio N-terminal (extracelular), un dominio transmembrana (anclado en la envoltura viral), y un C-terminal (intracelular). El ectodominio S es escindido por proteasas de la célula huésped dividiéndolo en dos subunidades de poliproteínas funcionales S1 y S2.

La subunidad S1 es responsable de la unión al receptor de la célula huésped, mientras que la subunidad S2 facilita la fusión de membranas virales y celulares⁷³. La subunidad S1 se divide a su vez en un dominio N-terminal (NTD) y dominio C-terminal (CTD). Cualquiera de estas dos regiones puede contener un dominio de unión al receptor (RBD) responsable de la unión celular.

En el SARS-CoV-2, el S1 CTD, se ha identificado como la región clave que contiene el RBD. La subunidad S2 forma parte de la maquinaria de fusión: péptido de fusión (FP), un sitio proteolítico adicional (S2'), un dominio transmembrana (TM), dos repeticiones de secuencias de heptapéptidos (HR1 y HR2) y un dominio citoplásmico. La entrada del virus en células susceptibles es un proceso complejo que requiere la interacción de la glicoproteína S con los receptores de la célula huésped, procesamiento proteolítico y reordenamiento estructural culminando en la fusión y entrada viral⁷⁴.

Proteína M (membrana)

La glicoproteína de membrana (M) es la más abundante de todas las proteínas estructurales. Son moléculas de dímero glicosilado incrustadas dentro de la envoltura viral y pueden adoptar una forma compacta o alargada. La forma

corta es responsable de la estructura esférica que se consigue doblando la membrana. La forma alargada juega un papel primordial en el ensamblaje viral, promoviendo la instalación de picos a través de la interacción con la ribonucleocápside. Además de su función estructural, las proteínas M también influyen en el tropismo por los órganos e inducen la liberación de interferón^{69,74}.

Proteína E (envoltura)

La proteína de la envoltura (E) es la más pequeña de todas las proteínas. Durante la replicación, la proteína E se produce en abundancia, sin embargo, solo una pequeña porción se incorpora a la membrana viral. Se compone de varios dímeros con un dominio N-terminal (NTD), un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio C-terminal (CTD). Interviene en el ensamblaje viral a través de la interacción del CTD con la curvatura de la membrana inductora de proteína M. En segundo lugar, el dominio transmembrana participa en la replicación viral a través de la formación de poros⁷⁴. La proteína E tiene un papel esencial en la producción y maduración viral.

Proteína N (nucleocápside)

La proteína N forma una estructura helicoidalmente simétrica que mide 9- 13 nm de diámetro con un canal central de 3-4 nm y está unida al ARN viral. Grupos de fosforilo ubicados en la proteína N tienen una función reguladora que mejora la afinidad por el ARN viral⁶⁹. Ambos (la proteína N y el ARN viral) forman el núcleo de ribonucleoproteína que se une a la proteína M, estabilizando el genoma. La función principal de la proteína N es estabilizar el ARN viral, sin embargo, también ayuda en la entrada de la célula huésped⁷⁴.

4.2. Características del SARS-CoV-2

En los estudios de análisis filogenético realizados hasta ahora, se observa una alta homología con virus del género *Betacoronavirus* encontrados en

murciélagos (88%). Sin embargo la secuencia presenta menos coincidencias genéticas con el SARS (79%) y el MERS (50%).

Esta diferencia con el SARS-CoV fue suficiente como para clasificar a este patógeno designado como SARS-CoV-2 como un nuevo linaje del subgénero *Sarbecovirus* dentro del género *Betacoronavirus*. Una diferencia es que la proteína S del nuevo coronavirus es más larga que sus homólogos de murciélago, pero también más larga que las proteínas S del SARS-CoV y MERS-CoV.

El SARS-CoV entra en la célula usando la ACE2 como receptor y la proteasa celular TMPRSS2⁷⁵. Aunque la estructura de la glicoproteína de la envoltura del SARS-CoV-2 es ligeramente diferente de la del SARS-CoV, se ha demostrado *in vitro* que el ACE2 sigue siendo un receptor válido para el SARS-CoV-2⁷⁶. Además, dos estudios por microscopía crioelectrónica han determinado la estructura de la proteína S unida a la proteína ACE2. Se han determinado las estructuras tridimensionales de dos proteínas víricas: la ARN polimerasa viral⁷⁷, y la proteasa viral principal (denominada Mpro o 3CLpro)⁷⁷.

La secuencia de referencia del SARS-CoV-2 está constituida por 29.903 nucleótidos y sus genes están ordenados de forma similar a otros CoV. El gen ORF1ab codifica una poliproteína dividida en proteínas no estructurales (PLpro, 3CLpro, RdRp, Hel). Hay una serie de genes que codifican proteínas estructurales: proteína de pico (S), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E) y la proteína de nucleocápside (N). De todos los mencionados el gen S es el más largo con 3.822 nucleótidos (Figura 4).

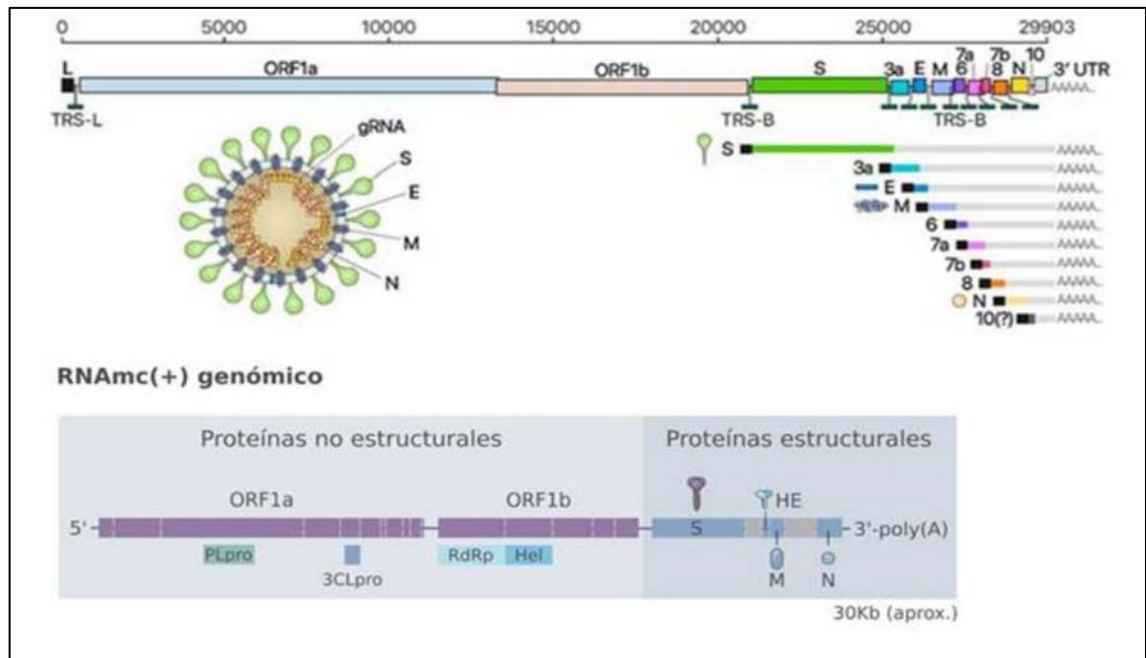


Figura 4. Estructura genómica del SARS-CoV-2

Fuente: *Nature Reviews* (www.nature.com)

4.2.1. Variantes del SARS-CoV-2

A lo largo de la evolución de la pandemia, la secuencia del SARS-CoV-2 ha ido sufriendo cambios debido a la aparición de diferentes mutaciones y dando lugar a nuevas variantes (Tabla 1).

Las nuevas variantes que se conocen hasta la fecha, con impacto para la salud pública, se describen a continuación:

-B.1.1.7 (variante Alfa): conocida popularmente como la variante británica se detectó por primera vez en Reino Unido en diciembre del 2020, poco después se demostró que la nueva variante estaba creciendo a un gran ritmo en relación con otros linajes circulantes. Actualmente circula de forma mayoritaria en España y toda Europa. Contiene una acumulación inusual de mutaciones en la proteína S (delección 69-70, delección 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H). Se considera que esta variante puede ser más transmisible y que esté asociada a mayor riesgo de hospitalización y muerte⁷⁸. El periodo de

incubación, duración de la enfermedad, distribución por sexo y edad son similares a las variantes previamente circulantes.

-B.1351 (variante Beta): conocida como la variante sudafricana fue detectada a finales de diciembre de 2020 en Sudáfrica; se ha extendido por todo el país. Se han encontrado casos puntuales en Europa. Estructuralmente presenta 8 nuevas mutaciones en la proteína S (L18F, D80A, D215G, Δ 242-244, R246I, K417N, E484K). Está asociada a mayor transmisibilidad y al escape de la inmunidad⁷⁹, pero no se ha relacionado con aumento de la gravedad de los pacientes.

-P.1 (variante Gamma): se detectó en Brasil en enero de 2021. Poco a poco se ha ido extendiendo por el continente americano. La nueva variante aislada tiene 12 mutaciones en la proteína S, que incluye N501Y y E484K.

Esta variante se asocia también a una mayor transmisibilidad y al escape de la inmunidad⁸⁰.

-B.1.617.2 (Variante delta): se detectó en marzo de 2021. Es la variante mayoritaria en la India y Reino Unido. Se ha ido extendiendo por el continente europeo. Esta nueva variante tiene 2 mutaciones nuevas en la proteína S (L452R, P618R). Es más transmisible que la variante británica (alfa) y probablemente con mayor incremento en la hospitalización. Presenta mayor escape a la inmunidad vacunal.

En resumen, las mutaciones que presentan las nuevas variantes pueden tener las siguientes consecuencias:

Incremento de la transmisibilidad (aumenta el número de casos y presión asistencial); incremento tiempo de hospitalización y mortalidad; escape a la respuesta de la inmunidad (adquirida tras infección natural o generada por algunas vacunas); disminución en la sensibilidad de los métodos diagnósticos y disminución a la respuesta al tratamiento.

Tabla 1. Características de las variantes de importancia en salud pública

VARIANTE	MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN/ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
B.1.1.7 ALFA	N501Y, del 69-70,144, P681H, A540D, T716I, D1118H.	Reino Unido, Irlanda, Israel y rápida progresión a países europeos.	Aumento de transmisibilidad y letalidad. Ligera reducción de efectividad vacunal.
B.1.351 BETA	E484K,N501Y,K417N, L18F,A701V,del ORF1b	Sudáfrica, Zambia, Botswana y casos en numerosos países europeos. Transmisión comunitaria en algunas regiones de Francia y Austria.	Probable aumento de transmisibilidad. No aumento de letalidad. Reducción de efectividad vacunal entre moderada y alta.
P.1 GAMMA	N501Y,E484K, K417T, del ORF1b	Región de Manaus (Brasil).Casos esporádicos y brotes en otros países. Elevada prevalencia en la región de Umbría, Italia.	Transmisibilidad y escape a la respuesta inmune en estudio. Reducción de títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de vacunados.
B.1.617.2 DELTA	L452R, P618R	Mayoritaria en India y en Reino Unido. Expansión en países europeos incluido España.	Elevada transmisibilidad. Probable aumento de la gravedad. Reducción de la efectividad vacunal. Posible incremento en la gravedad.

Fuente: elaboración propia

4.2.2. *Fisiopatología*

El SARS-CoV-2 ingresa en la célula utilizando como receptor la enzima ACE2, una exopeptidasa de membrana presente en el riñón, pulmones y corazón⁸¹. Su función es la transformación de la angiotensina I en angiotensina 1-9 y de la angiotensina II en angiotensina 1-7. Estos productos finales tienen efectos vasodilatadores, antiinflamatorios, antifibrosis y benefician la natriuresis; en consecuencia, reducen la presión arterial contrarrestando la acción de la angiotensina II. La ACE2 se ha relacionado con la protección contra la hipertensión, la arteriosclerosis y otros procesos vasculares y pulmonares.

En los casos graves de la enfermedad los niveles de angiotensina II están muy elevados. Esta alteración se ha correlacionado con la carga viral del SARS-CoV-2 y el daño pulmonar. Dicho desequilibrio en el sistema renina-angiotensina-aldosterona está relacionado con la inhibición de la ACE2 por el virus ⁸².

El sistema inmunológico innato se activa por la infección por SARS-CoV-2, generando una respuesta excesiva que podría estar relacionada con una mayor lesión pulmonar y peor evolución clínica. Cuando la respuesta inmune no es capaz de controlar eficazmente el virus, como en las personas mayores con un sistema inmunológico debilitado, el virus se propaga de manera más eficiente, causando daño al tejido pulmonar, que activaría los macrófagos y granulocitos y conduciría a la liberación masiva de citocinas proinflamatorias⁸³. Esta hiperactivación resulta insuficiente para controlar la infección y conduce a una depleción linfocitaria asociada a un mayor daño tisular, que es observable en pacientes graves que presentan linfopenia e hiperferritinemia⁸⁴. Se ha denominado síndrome de liberación de citoquinas, que estaría asociado al síndrome de insuficiencia respiratoria aguda o Síndrome de Distrés Respiratorio (SDR) del Adulto que se ha descrito como la principal causa de mortalidad por la COVID-19.

Cuando hay una activación excesiva del sistema inmunológico innato causa tormentas de citoquinas, esto desencadena un daño en el sistema

microvascular y una activación en el sistema de coagulación e inhibición de la fibrinólisis. La coagulación intravascular diseminada conduce a trastornos generalizados de la microcirculación que contribuyen a la insuficiencia multiorgánica⁸⁵. Se ha observado que los niveles de antitrombina son más bajos y los niveles de dímero D y fibrinógeno son más altos que en la población general. Además, la progresión de la gravedad de la enfermedad está relacionada con un aumento gradual del dímero D. Estos hallazgos apoyan la teoría del desarrollo de una coagulopatía de consumo en las infecciones por SARS-CoV-2, y que, cuando ocurren, el pronóstico empeora.

El mecanismo no está establecido por completo, pero hay varias causas que explican este fenómeno. La Interleuquina 6 ejerce un papel importante en la red de mediadores inflamatorios y puede causar trastornos de la coagulación a través de diversas vías, como la estimulación hepática para la síntesis de trombotocina y fibrinógeno, aumento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, expresión de los factores tisulares de los monocitos y la activación del sistema de coagulación extrínseco. La trombotina que se genera puede inducir al endotelio vascular a producir más Interleuquina 6 y otras citoquinas. Las tormentas de citoquinas y los trastornos de la coagulación se retroalimentan^{85, 86}.

Existe además alteración de las plaquetas por varias vías: daño indirecto mediante invasión de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea o daño directo mediante la activación del complemento. Por último, la inflamación producida en el pulmón junto con la hipoxia de los casos con neumonía, causa la agregación plaquetaria y la trombosis, con un aumento de consumo de las plaquetas. Todos estos son factores necesarios para obtener como resultado el estado de hipercoagulabilidad que se observa en este síndrome⁸⁷.

5. Información de la enfermedad

5.1. Periodo de incubación

El período transcurrido entre la exposición inicial y el desarrollo de la enfermedad se denomina periodo de incubación. En el caso de la COVID-19 se ha estimado que dicho periodo oscila entre 1 a 14 días, en la mayoría de los casos el período de incubación es de 5 días. El 97,5% de los casos sintomáticos se desarrollan en 11,5 días tras la exposición⁸⁸.

El período de incubación de entre 4-6 días es similar al de otros coronavirus (SARS o MERS). Es importante tener en cuenta que el período de latencia (tiempo transcurrido desde la exposición hasta que el individuo se convierte en contagioso) puede ser más corto. Aproximadamente el 44% de todas las infecciones secundarias son causadas por estos pacientes presintomáticos⁸⁹.

5.2. Duración de la enfermedad

Cuando la enfermedad ha sido leve el tiempo medio desde el inicio de los síntomas hasta la recuperación es de, aproximadamente, 2 semanas; sin embargo, cuando la enfermedad se ha considerado grave o crítica, el tiempo se puede alargar hasta 6 semanas. La instauración de síntomas graves como hipoxemia tarda, aproximadamente, 1 semana y de 2-8 semanas hasta el *exitus*⁹⁰.

A pesar de lo descrito, en los últimos meses de la pandemia, se han reportado multitud de casos en los que los síntomas perduran en el tiempo y son recurrentes; a esta nueva entidad se la denomina COVID-19 persistente⁹⁰.

5.3. Periodo infectivo

El momento en el cual un caso confirmado puede transmitir la infección a otras personas viene definido por el tiempo en el que se demuestra la viabilidad del virus mediante cultivo celular a partir de muestras clínicas; sin embargo, es una técnica que puede tener una sensibilidad relativamente baja⁹⁰. Las técnicas moleculares han sido ampliamente utilizadas a lo largo de la pandemia con cierta controversia, debido a su capacidad para detectar ARN viral durante periodos muy prolongados que no siempre pueden estar relacionados con virus con capacidad infectiva, lo que plantea numerosas dudas a la hora de tomar medidas de salud pública. La cantidad de ARN viral (carga viral) tiene cierta correlación con la positividad de los cultivos virales y podría agregar información al resultado cualitativo de la RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para determinar la infectividad de los virus que se eliminan. Cuando se realizan estudios epidemiológicos, éstos permiten conocer el momento en el que una determinada exposición generó un caso secundario, ofreciendo más luz sobre el período infectivo.

Mediante la técnica de RT-PCR, se observa que los infectados presentan en su mayoría una carga viral elevada (10^5 - 10^8 copias/muestra) antes del comienzo de los síntomas y en los primeros días tras el inicio de la enfermedad clínica.

En pacientes que tienen un curso leve de infección, el pico de carga viral en muestras nasofaríngeas y orofaríngeas ocurre durante los primeros 5-6 días después del inicio de los síntomas y prácticamente desaparece el día 10. Aunque en algunos pacientes se detecta pasados estos 10 días, la carga viral es del orden de 100-1.000 veces menor, lo que sugiere que la capacidad de transmisión está disminuyendo progresivamente⁹¹. Además, se ha podido demostrar la ausencia de virus infectivo (sin crecimiento en cultivo) con cargas virales por debajo de 10^5 copias de ARN por muestra nasofaríngea. Esto parece indicar que en personas con síntomas leves, más allá de la primera semana después del inicio de los

síntomas, la probabilidad de transmitir la infección a otros sería muy baja, incluso cuando el virus aún es detectable por PCR⁹².

En personas con un curso clínico más severo, la carga viral es hasta 60 veces mayor que en aquellos con un curso más leve, y la carga viral elevada puede durar más⁹³. La presencia de positividad en la prueba de PCR u otra técnica de detección de ácidos nucleicos no implica necesariamente infectividad. Así, en una serie descrita de 77 parejas de casos índice y secundario, el tiempo medio hasta obtener la PCR negativa fue de 21 días, que excedió el período máximo de transmisibilidad observado de dos semanas⁹⁴. La detección de ARN viral en heces es más tardía que la detección en nasofaringe o esputo y es más prolongada: en una serie de 33 pacientes hospitalizados se detectó durante más de 5 semanas; en otra revisión sistemática de 26 estudios, los tiempos de detección en heces después de haberse negativizado la RT-PCR en muestras respiratorias fueron de 1 y 33 días⁹⁵.

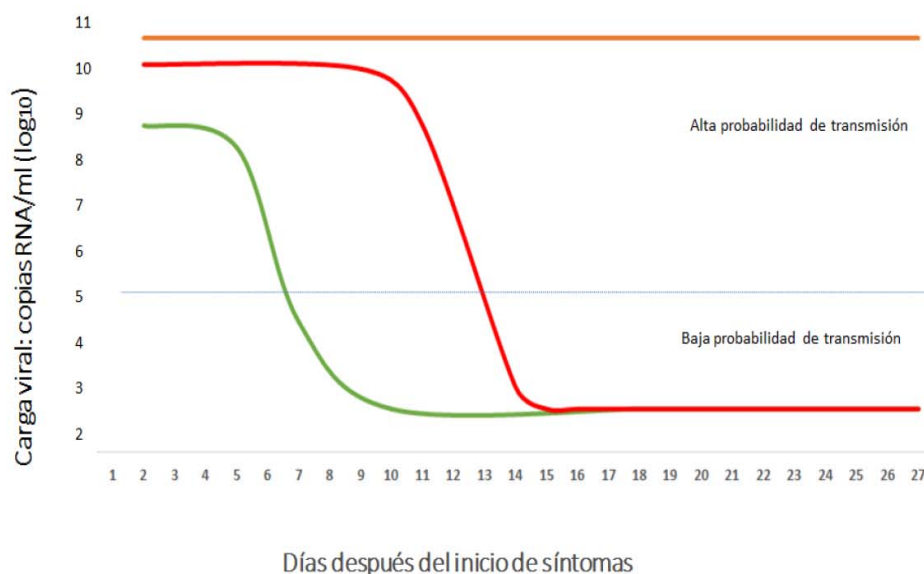


Figura 5. Dinámica reducción carga viral: casos graves (rojo) y casos leves (verde)

Fuente: Ministerio de Sanidad

5.4. Sintomatología

Se han descrito una gran cantidad de síntomas a lo largo de la pandemia, lo que indica que es una enfermedad compleja. Muchos síntomas son inespecíficos, por lo que el diagnóstico diferencial abarca una amplia gama de infecciones, enfermedades respiratorias y de otro tipo.

Sin embargo, se pueden distinguir diferentes grupos en este síndrome. El grupo de síntomas más comunes afectan al sistema respiratorio: tos, esputo, dificultad para respirar y fiebre. Otros grupos son síntomas musculoesqueléticos (mialgia, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza y fatiga), síntomas entéricos (dolor abdominal, vómitos y diarrea) y, con menos frecuencia, un grupo mucocutáneo⁹⁵.

Síntomas respiratorios

Los síntomas respiratorios están presentes en la mayoría de los casos. En los primeros estudios de China ²⁷, la fiebre fue el síntoma más común, con una media máxima de 38,3°C; solo unos pocos tenían temperatura de más de 39°C. La ausencia de fiebre parece ser algo más frecuente que en SARS o MERS. El segundo síntoma más común fue la tos, que ocurre en aproximadamente dos tercios de todos los pacientes. En varias series publicadas entre los casos graves de COVID-19^{24,27}, la duración media de la fiebre fue de 12,0 días (8-13 días) y la tos persistió durante 19 días. Según una revisión sistémica, incluidos 148 artículos que comprenden 24.410 adultos con la enfermedad confirmada de 9 países distintos⁹⁶, los síntomas más prevalentes fueron fiebre (78%), tos (57%) y fatiga (31%). La fiebre y la tos no distinguen entre casos leves y graves ni tampoco predicen el curso de la enfermedad⁹⁷, a diferencia de la dificultad para respirar, que ha sido identificada predictor de gravedad.

Durante los últimos meses, muchos datos de cohortes de países fuera de China han sido publicados. Sin embargo, casi todos los datos se refieren a pacientes que ingresaron en los hospitales, lo que indica un sesgo de selección hacia los más graves y sintomáticos:

- Entre 20.133 pacientes que fueron admitidos en distintos hospitales en el Reino Unido, los síntomas más comunes fueron tos (69%), fiebre (72%) y dificultad para respirar (71%)⁹⁸.

- Entre 5.700 pacientes que fueron admitidos en hospitales en Nueva York solo el 30,7% tuvo fiebre mayor de 38°C. Una frecuencia respiratoria de más de 24 respiraciones por minuto al ingreso se encontró en el 17,3%⁹⁷.

- Entre los primeros 1.000 pacientes que se presentaron en el New York Presbyterian / Universidad de Columbia⁹⁹, los síntomas fueron tos (73%), fiebre (73%) y disnea (63%).

Síntomas musculoesqueléticos

El grupo de síntomas musculoesqueléticos comprende mialgia, dolor articular, dolor de cabeza y fatiga, y, frecuentemente, ocurren en un 15- 40% de los pacientes^{98,99,24}, aunque dichos síntomas no aportan nada sobre la gravedad del cuadro clínico. Sin embargo, a menudo se pasan por alto en la práctica clínica y el dolor de cabeza merece una atención especial. Según una revisión¹⁰⁰, el dolor de cabeza se observa en el 11-34% de pacientes hospitalizados, ocurriendo en 6-10% como primer síntoma. Las características significativas son cefalea bilateral moderada-intensa con pulsaciones o con presión en la región temporoparietal, frontal o periorbital. Las características más llamativas son el inicio de repentino a gradual y la mala respuesta a los analgésicos comunes. Los posibles mecanismos fisiopatológicos incluyen activación de las terminaciones nerviosas periféricas del trigémino por el SARS-CoV-2 directamente o a través de la vasculopatía y / o aumento de las citoquinas proinflamatorias circulantes y la hipoxia.

Síntomas gastrointestinales

De forma experimental se ha demostrado que el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 pueden infectar enterocitos. La replicación activa se ha observado tanto en el intestino de los murciélagos como en el de los humanos²⁷. En algunos sujetos se definió la calprotectina fecal como un biomarcador fecal que permite la detección de inflamación intestinal en enfermedades intestinales y colitis infecciosa proporcionando evidencia de que la infección por SARS-CoV-2 instiga una respuesta de inflamación en el intestino¹⁰¹. Estos hallazgos explican por qué los síntomas gastrointestinales se observan en un subconjunto de pacientes y por qué el ARN viral se puede detectar en hisopos rectales, incluso después de que las pruebas nasofaríngeas hayan resultado negativas.

En los primeros estudios chinos, los síntomas gastrointestinales rara vez se encontraron. En un metaanálisis de 60 estudios preliminares que incluyeron 4.243 pacientes, la prevalencia de síntomas gastrointestinales fue del 18%; la prevalencia fue menor en los estudios realizados en China que en otros países. Entre los primeros 393 pacientes que fueron admitidos en dos hospitales de la ciudad de Nueva York, la diarrea (24%) las náuseas y los vómitos (19%) fueron relativamente frecuentes¹⁰². Entre 18.605 pacientes admitidos en hospitales del Reino Unido, el 29% de todos los pacientes se quejaron de síntomas entéricos al ingreso⁹⁸. No siempre la COVID-19 es una enfermedad crítica. La alta expresión de los receptores ACE2 a lo largo del revestimiento epitelial del intestino que actúan como receptores de células huésped para el SARS-CoV-2 podría explicar esto¹⁰³.

Síntomas otorrinolaringológicos

Aunque los síntomas del tracto respiratorio superior, como rinorrea, congestión nasal, los estornudos y el dolor de garganta son relativamente inusuales, la anosmia y la ageusia son signos importantes de la enfermedad¹⁰⁴.

Curiosamente, estos síntomas otorrinolaringológicos aparecen más en Europa que en Asia. Uno de los estudios más grandes en Europa encontró que el 87% de los pacientes notificaron pérdida del olfato, mientras que el 56% reportaron disfunción del gusto. La mayoría de los pacientes tenían pérdida del olfato después de otros síntomas generales¹⁰⁵. La duración media de la disfunción olfativa fue de 8,4 días. Las mujeres parecen estar más afectadas que los hombres. La anosmia puede no estar relacionada con la obstrucción o inflamación. Se debe señalar que solo dos tercios de los pacientes que notificaron síntomas olfativos y que se sometieron a pruebas olfativas objetivas tuvieron resultados anormales.

Los análisis histológicos *post-mortem* del epitelio olfatorio en dos pacientes COVID- 19 mostraron infiltrados leucocitarios prominentes en la lámina propia y atrofia focal de la mucosa. Sin embargo, no está claro si la neuropatía inflamatoria observada es resultado de un daño viral directo o está mediada por daño en las células no neuronales de soporte¹⁰⁶. Hay evidencia de que las células que mantienen la integridad del olfato expresan ACE2 y TMPRSS2. Estas células representan una potencial entrada para el SARS-CoV-2 en un sistema sensorial neuronal que está en conexión directa con el cerebro¹⁰⁷.

Síntomas cardiológicos

Existe una creciente evidencia de los efectos directos e indirectos del SARS-CoV-2 en el corazón, especialmente en pacientes con enfermedades cardíacas preexistentes¹⁰⁸. El SARS-CoV-2 tiene el potencial de infectar cardiomiocitos, pericitos y fibroblastos a través de la vía ACE2 que conduce a una lesión miocárdica directa¹⁰⁹. Los exámenes realizados *post mortem* sugieren que la localización más probable de SARS-CoV-2 no está en los cardiomiocitos, sino en las células intersticiales o macrófagos que invaden el tejido miocárdico. Una segunda hipótesis para explicar la lesión miocárdica se centra en el exceso de citocinas y / o mecanismos mediados por anticuerpos. También se ha

demostrado que el receptor ACE2 se expresa ampliamente en las células endoteliales y que es posible la infección directa por SARS-CoV-2 de la célula endotelial, lo que lleva a una inflamación¹¹⁰.

Trombosis, embolia

Las anomalías de la coagulación ocurren con frecuencia en asociación con la COVID-19, complicando el manejo clínico. Numerosos estudios han informado sobre un número alto de tromboembolismo venoso (TEV), especialmente en aquellos con cuadros severos. La coagulopatía inicial se presenta con elevación del dímero D y de los productos de degradación de fibrina / fibrinógeno, mientras que las anomalías en el tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina, y los recuentos de plaquetas son relativamente poco comunes. Otras manifestaciones son infarto cerebral, isquemia cardíaca, muerte súbita, embolismos; también se observa una mayor incidencia de sangrados¹¹¹.

Según una revisión sistemática de 23 estudios, entre 7.178 pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI), la incidencia de embolia pulmonar o trombosis pulmonar fue del 14,7% y 23,4%, respectivamente¹¹².

Síntomas neurológicos

Se ha demostrado que la propensión a la neuroinvasión es una característica común de coronavirus humanos. La neuroinvasión viral puede lograrse mediante varias rutas, incluida la transferencia trans-sináptica a través de neuronas infectadas, entrada a través del nervio olfatorio, la infección del endotelio vascular o la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica¹¹³. Es posible que haya complicaciones neurológicas tardías en pacientes aparentemente recuperados. Los síntomas neurológicos más comunes durante el transcurso de la enfermedad son: mareo, alteración de conciencia,

accidente cerebrovascular, ataxia, epilepsia y neuralgia. También hay descritos casos de síndrome de Guillain-Barré¹¹⁴.

Síntomas dermatológicos

Numerosos estudios han informado sobre manifestaciones cutáneas observadas en contexto de la COVID-19. El fenómeno más destacado, el denominado "COVID dedos de los pies", son lesiones similares a los sabañones que ocurren principalmente en partes acras. Estas lesiones pueden ser dolorosas o pruriginosas (a veces asintomáticas) y puede representar el único síntoma o una manifestación tardía de la infección por SARS-CoV-2. Es de destacar que en la mayoría de los pacientes con "dedos de los pies COVID", la enfermedad es leve. Se especula que las lesiones son causadas por inflamación en las paredes de los vasos sanguíneos, o por pequeños micro-coágulos en la sangre. También pueden aparecer otras lesiones como máculo-pápulas dispersas por todo el cuerpo, lesiones urticariformes en tronco y erupciones vesiculosas¹¹⁵.

Síntomas oftalmológicos

Las manifestaciones oculares también son frecuentes. En una serie de casos de China, el 32%, tenían manifestaciones oculares compatibles con conjuntivitis, incluida hiperemia conjuntival, quemosis, epífora o aumento de secreciones¹¹⁶.

La retina también puede verse afectada con lesiones hiperreflectantes a nivel de las células ganglionares y capas plexiformes internas.

En otra serie publicada de 534 casos, los síntomas oftalmológicos más comunes asociados a estos enfermos fueron: ojo seco (20,9%), visión borrosa (12,7%), sensación de cuerpo extraño (11,8%), y congestión conjuntival (4,7%)¹¹⁷.

5.5. COVID-19 persistente

El término "COVID-19 Persistente" se está utilizando en personas que describen un amplio abanico de síntomas que se prolongan o persisten semanas e incluso meses después de una infección por SARS-CoV-2, independientemente de la gravedad del episodio. Los síntomas son el agotamiento y fatiga, pero también disnea de esfuerzo, dolor de cabeza y artralgia, palpitaciones, trastornos de concentración y síntomas depresivos en individuos sanos. Afecta a un gran número de personas y está teniendo un importante impacto sanitario.

Falta una definición realmente aceptada para este síndrome; se han utilizado otros términos como "prolongado", "crónico", "sintomático continuo", "Post" o "post-aguda COVID-19" pero todos ellos están incompletos.

Expertos británicos recomiendan utilizar el término "síndrome pos-COVID" a partir de las 12 semanas posteriores a la infección. Pero como no existe evidencia de ningún cambio fisiológico particular (que predigan cronicidad) a las 12 semanas, hay otros expertos que defienden que sería preferible utilizar el término COVID-19 prolongado para los síntomas de cualquier duración más allá de cuatro semanas. Algunos autores sugieren dividir las manifestaciones post-agudas en tres categorías: síntomas residuales que persisten después de la recuperación de una infección aguda; disfunción orgánica que persiste después de la recuperación inicial; y nuevos síndromes que se desarrollan después de una infección inicialmente asintomática o leve¹¹⁸.

Otros expertos han identificado, al menos, cuatro o más entidades distintas, incluidas un síndrome post-cuidados intensivos, un síndrome de fatiga post-viral, daño orgánico permanente y "síndrome COVID-19 a largo plazo"¹¹⁹. Hasta la fecha, ningún concepto ha ganado una amplia aceptación.

En un estudio de 145 pacientes en Alemania y Austria (75% hospitalizados, 22% en UCI), 41% presentaba síntomas persistentes (36% disnea) 100 días después del inicio de la infección¹²⁰.

En el Reino Unido se estimó que uno de cada cinco pacientes con COVID-19 presenta síntomas pasadas 5 semanas de la primoinfección y en uno de cada diez los síntomas persisten más allá de las 12 semanas¹²¹.

En España los datos recogidos de una encuesta dirigida al colectivo de pacientes con COVID persistente (persistencia de síntomas mínimo 12 semanas) revelaron los siguientes datos:

Del total de 1.834 participantes, el tiempo medio de persistencia de síntomas fue de 6,2 meses. Se notificaron numerosos tipos de síntomas, entre los que destacaron cansancio y malestar general en más del 95%; dolor de cabeza, bajo estado de ánimo y dolores musculares en más del 80% y disnea, dolores en articulaciones, en el pecho y en la espalda y falta de concentración en más del 75%. El 70% no era capaz de atender sus obligaciones diarias y un 30% refería dificultades para el aseo personal¹²². Estos datos encajan con los obtenidos de encuestas realizadas en otros lugares, en un estudio se recogieron datos de 3.791 pacientes de 55 países donde se describieron los síntomas más frecuentes a los 6 meses y fueron los siguientes: cansancio (78%), enfermedad exacerbada por el esfuerzo físico o mental (72%) y deterioro cognitivo (55%)¹²².

En ambas encuestas, se puede concluir que COVID-19 persistente afecta a un gran número de personas y está teniendo un importante impacto sanitario¹²².

5.6. Pacientes asintomáticos

Comprender y conocer la frecuencia de los pacientes asintomáticos y el curso temporal de dicha transmisión asintomática es crucial para evaluar la dinámica de la enfermedad y, a la vez, es complejo.

En una revisión sistemática en la que se analizaron 79 estudios, el 20% de los pacientes en los que se había detectado infección por SARS-CoV-2 permanecieron asintomáticos durante el seguimiento¹²³. En otros siete estudios

de poblaciones definidas que se sometieron a pruebas de detección de SARS-CoV-2 y luego al seguimiento, el 31% permaneció asintomático.

Los mejores datos disponibles provienen de 3.600 personas a bordo del crucero Diamond Princess que se convirtieron en actores involuntarios en un "experimento controlado" en el que los pasajeros y la tripulación formaron una cohorte homogénea¹²². Debido a condiciones higiénicas insuficientes, más de 700 personas se infectaron mientras el barco estaba en cuarentena en el puerto de Yokohama, Japón. Después de las pruebas sistemáticas, 328 (51,7%) de los primeros 634 casos confirmados eran asintomáticos. Considerando los períodos de incubación entre 5,5 y 9,5 días, los autores calcularon que la verdadera proporción de asintomáticos era de un 17,9%¹²⁴.

Parece ser que los casos asintomáticos son más frecuentes en niños. Es importante destacar que tanto en niños como en adultos asintomáticos se ha encontrado un elevado número de estos casos que presentan alteraciones radiológicas a nivel pulmonar¹²⁵. No es así con los marcadores de inflamación que están al mismo nivel que las personas no infectadas.

5.7. Reinfecciones

La inmunidad protectora contra el coronavirus estacional no es eterna¹²⁶. Hay varios informes de pacientes infectados con SARS-CoV-2 que volvieron a tener nuevamente una RT-PCR positiva después de haber negativizado¹²⁷. Estos informes han ido ganando mucho interés, porque esto podría indicar reactivaciones o reinfecciones. Sin embargo, después del estudio más detallado de estos informes, en muchos casos, no se encontró evidencia de reactivaciones o reinfecciones, y existían otras razones mucho más probables, como problemas metodológicos en la realización de la PCR que siempre se deben considerar; los resultados pueden fluctuar considerablemente¹²⁷, debido a alteraciones en la toma de muestra o almacenamiento de la misma. Incluso si todo se hace

correctamente, se puede esperar que una PCR fluctúe entre positivo y negativo en momentos en que los valores son bajos y la carga viral cae al final de una infección³⁹.

Uno de los estudios iniciales encontró un total de 25 (14,5%) de 172 pacientes con datos de alta que tuvieron una prueba positiva después de dos resultados de RT-PCR negativos¹²⁸. El tiempo medio entre el último negativo y el primer positivo fue de 7,3 días. El corto período de tiempo entre ambos resultados hizo que no se consideraran estos casos como reinfecciones.

Sin embargo, en los últimos meses se han notificado varios casos de reinfecciones verdaderas (comprobados virológicamente: cepas filogenéticamente distintas).

Los primeros cuatro casos de posibles reinfecciones sintomáticas bien documentadas se publicaron en verano de 2020 y a finales de este mismo año ya se habían confirmado más de 30 casos¹²⁹. A nivel global había más de 2.000 posibles casos descritos de reinfecciones¹³⁰. El intervalo entre el primer y segundo episodio de infección en los casos confirmados fue de media 80 días¹²².

En la mayor parte de los casos, la segunda vez que se produjo la infección cursó de forma más leve. Sin embargo, hubo al menos seis casos en los que el segundo episodio fue más severo. Podría ser debido a la adquisición de una cepa más patógena, o tal vez a un mayor inóculo. Hasta ahora, se trata de informes de casos anecdóticos¹³¹.

5.8. Coinfecciones

La circulación de otros patógenos respiratorios conviviendo con el SARS-CoV-2 es lo habitual, como el virus de la influenza que sigue diferentes patrones estacionales.

Uno de los objetivos durante la pandemia ha sido detectar posibles microorganismos que pueden coinfectar a los pacientes, con el fin de saber si la coinfección condiciona un peor pronóstico del paciente y poder asegurar un tratamiento adecuado¹²².

Existen muchas series publicadas en relación con la coinfección de SARS-CoV-2 y otros microorganismos respiratorios¹³². Los resultados de prevalencia y de tipo de infección son muy variados. En general se observa una mayor prevalencia de coinfecciones en pacientes ingresados en UCI que en aquellos que están en planta de hospitalización. Sin embargo los resultados pueden estar sesgados puesto que muchas de las infecciones que se describen son de adquisición nosocomial.

En dos de los metaanálisis publicados predominan bacterias atípicas, lo que hace pensar en que dichas coinfecciones provienen de la comunidad^{133, 132}.

La pregunta acerca del pronóstico no queda contestada por ninguno de los autores de las series publicadas.

Además, se debe poner en relación la estacionalidad y el efecto de las medidas preventivas con los hallazgos de la coinfección del SARS-CoV-2 con otros virus, que a nivel mundial se ha visto una reducción de la incidencia de la gripe estacional entre otros¹³⁴.

6. Diagnóstico microbiológico

La identificación y el aislamiento precoz de las personas infectadas son fundamentales para poder tratarlos adecuadamente y evitar la propagación del virus. Además de las características clínicas y radiológicas que presentan estos pacientes y que en muchas ocasiones son inespecíficas, el diagnóstico microbiológico de SARS-CoV-2, ha sido un punto clave para la confirmación de nuevos casos¹³⁵. La rápida propagación y capacidad de transmisión del SARS-CoV-2 ha demostrado que es importante contar con pruebas diagnósticas fiables

y específicas que puedan identificar a los pacientes infectados por el virus, así como a aquellos que pueden haber estado expuestos al mismo, que es crucial para conocer el estado inmunológico de un individuo o de la población en general. Por otro lado, los resultados de las pruebas diagnósticas son indicadores valiosos para conocer las tasas de contagio locales y nacionales, brindando datos objetivos que son decisivos para que las autoridades tomen decisiones y realicen las intervenciones oportunas.

Existen dos grandes tipos de métodos para detectar el virus: aquellos que detectan componentes del virus en una muestra del paciente (antígenos o ácido nucleico) y los que determinan la respuesta serológica del paciente (producción de anticuerpos).

6.1. Detección de componentes del virus

6.1.1. *Técnicas basadas en la detección de ARN viral*

Se pueden realizar en cualquier muestra respiratoria; dependiendo del origen de esta (nasofaringe, saliva, lavado broncoalveolar), la cantidad del virus será diferente y también su significado clínico.

El procesamiento de este tipo de técnicas requiere personal cualificado y equipos caros que sólo existen en hospitales y centros de investigación. Son sistemas muy sensibles, pudiendo detectar cantidades muy bajas de ARN del virus.

a. RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction)

Las técnicas moleculares (RT-PCR) han sido las más empleadas, considerándose el “gold standard” en el diagnóstico microbiológico¹³⁶.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para amplificar secuencias de ADN, replica (amplifica) un segmento pequeño y

definido de ADN miles de veces facilitando así su detección. Consta de dos fases: extracción y amplificación de los ácidos nucleicos¹³⁶.

Puesto que el SARS-CoV-2 es un virus de ARN es necesario mediante la transcripción inversa (RT) convertir el ARN en ADN, ya que sólo este último se puede copiar o amplificar mediante PCR (Figura 6). En primer lugar, la muestra se trata con diversas soluciones químicas que eliminan sustancias como proteínas y grasas y que solo extraen el ARN presente en la muestra. Una vez extraído, la RT-PCR comienza con la conversión del ARN genómico viral en ADN mediante la enzima transcriptasa inversa (RT).

Esta reacción se basa en pequeños cebadores de secuencias de ADN diseñados para reconocer específicamente secuencias complementarias en el genoma del ARN viral y la transcriptasa inversa para generar una copia corta de ADN complementario (ADNc) del ARN viral¹³⁷.

En la RT-PCR en tiempo real, la amplificación del ADN se controla a medida que avanza la reacción de PCR. Esto se hace utilizando sondas de ADN con secuencias específicas marcadas con moléculas fluorescentes y una molécula de desactivación. A continuación, un sistema automatizado repite el proceso de amplificación durante aproximadamente 40 ciclos hasta que se puede detectar el ADNc viral¹³⁸.

Cada ciclo, generalmente, consta de 2-3 pasos a diferentes temperaturas. Las temperaturas utilizadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de una amplia variedad de parámetros, incluido el tipo de enzima utilizada, la concentración de iones divalentes y los dNTP (desoxirribonucleótidos-trifosfato) utilizados para polimerizar el nuevo ADN, la temperatura de los cebadores, así como la longitud del ADN a amplificar. La RT-PCR en tiempo real permite obtener resultados casi de inmediato mientras el proceso aún está en curso, mientras que la RT-PCR convencional solo proporciona resultados al final del proceso.

Hasta la fecha, la mayoría de las pruebas utilizan tecnología RT-PCR en tiempo real seleccionando diferentes regiones genómicas del SARS-CoV-2,

incluidas las regiones ORF1ab, la de la nucleocápside (N), la proteína de la espícula (S), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) o genes de proteínas de la envoltura (E). Todo el proceso se puede realizar en 1 o 2 etapas, dependiendo de los reactivos y kits utilizados. Estas pruebas tardan en realizarse de 1 a 4 horas y se pueden analizar simultáneamente un elevado número de muestras. La carga viral se estima en base al número de ciclos de replicación (Ct, ciclo en el umbral) necesarios para poder detectar una señal fluorescente, no es una medida de carga viral únicamente es una aproximación. Los valores bajos de Ct se atribuyen a una carga viral más alta^{137,138}. En general, un valor de Ct inferior a 40 se informa clínicamente como resultado positivo.

Hay al menos dos precauciones al interpretar los resultados de la PCR. En primer lugar, la PCR no diferencia por sí misma la etapa de la enfermedad en la que puede estar el paciente, a menos que se relacione con los datos clínicos y con la respuesta de los anticuerpos. En segundo lugar, una PCR positiva no implica necesariamente que dicha persona pueda infectar a otra, ya que simplemente podría reflejar la existencia de restos no infecciosos (fragmentos del genoma viral)^{135,137,136}.

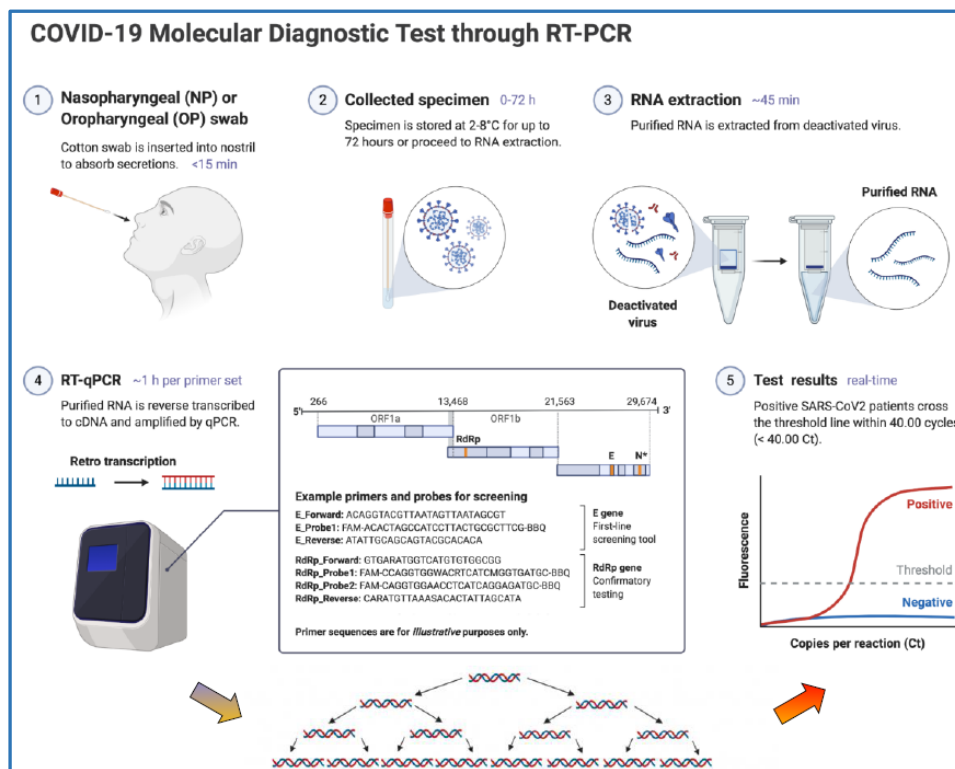


Figura 6. Funcionamiento de RT-PCR

Fuente: <https://covidtestingproject.org/faq.html>

b. RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)

Consiste en una amplificación rápida del material genómico viral junto con una lectura basada en color o luz, y que, a diferencia de la RT-PCR, se puede realizar a temperatura constante. Utiliza dos enzimas, así como un conjunto de cuatro a seis cebadores cortos diseñados para reconocer diferentes fragmentos del genoma viral. Estos fragmentos no solo ayudan a comenzar a copiar, como en la RT-PCR, sino que también permiten que las cadenas de ADN recién copiadas formen estructuras en bucle que se pueden amplificar mucho más rápidamente que en la PCR estándar¹³⁸. La amplificación del ADN determina que se acidifique el medio, lo que permite detectar la presencia del virus al incorporar un cromóforo sensible al pH. Debido a su simplicidad, esta técnica se ha implementado en dispositivos PoC (Point-of-Care, realización en el lugar de

recolección de muestras). Sin embargo, es menos preciso y se pueden procesar pocas muestras al mismo tiempo¹³⁹.

c. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

Se basa en la acción de segmentación y direccionamiento altamente específica para localizar y cortar una parte concreta de la secuencia de ARN del SARS-CoV-2. La escisión da lugar a una señal visual que indica la presencia del virus.

Ésta técnica puede ser más rápida que la PCR, cuando se combinan con LAMP, y no requieren el equipo especializado que requiere la PCR. El sistema tiene 2 componentes principales: la secuencia CRISPR, que está diseñada para incluir ARNs guía que coinciden con partes del genoma viral, y la enzima Cas, que corta el ARN donde coincide la secuencia CRISPR. Estos sistemas se descubrieron por primera vez en bacterias, como una especie de respuesta inmune bacteriana a las infecciones virales. Diferentes enzimas Cas (Cas 9, Cas 13, etc.) escinden diferentes tipos de ácidos nucleicos. El uso de CRISPR requiere el uso de un Cas que pueda reconocer y escindir ARN (en lugar de ADN)¹⁴⁰.

La prueba proporciona resultados en menos de 40 minutos y se ha implementado en formato de test rápido (ensayo de flujo lateral) para su uso con extractos de ARN obtenidos de hisopos nasofaríngeos. En un estudio piloto, los autores informan una sensibilidad clínica del 95% para pacientes positivos y del 100% para pacientes negativos¹⁴⁰.

Para utilizar diagnósticos basados en CRISPR, es necesario diseñar ARNs guía, complementarios al ARN viral (estos dirigen la enzima Cas al gen viral, donde puede escindir el ARN y a su vez activar dicha enzima) y utilizar sondas fluorescentes o colorimétricas. Si la sonda permanece intacta, este "extintor" evitará la detección; pero si la sonda ha sido escindida por la enzima Cas, entonces se puede detectar la señal. Las sondas fluorescentes y el ARN guía se mezclan con la muestra del paciente. La sonda solo se escindirá si el ARN guía se

une al ARN viral. Una vez que la enzima Cas ha reconocido el ARN viral, también puede escindir la sonda emitiendo fluorescencia o color¹⁴⁰.

d. RPA (Amplificación con recombinasa polimerasa):

Se detectan secuencias de ADN gracias a coincidencias precisas de una enzima llamada recombinasa que puede separar cadenas de ADN y luego amplificar genes virales específicos¹³⁸. Se requiere el RT para convertir el ARN en ADN. Al igual que RT-LAMP, este método también es isotérmico, lo que significa que solo se necesita una temperatura para llevar a cabo la reacción. Dicha reacción provoca una amplificación exponencial del ADN de forma rápida y sencilla. No necesita muchos reactivos. La enzima divide las dos cadenas de ADN y luego es estabilizada mediante proteínas especiales. Los cebadores están diseñados para oponerse en el mismo tramo de ADN, de modo que cada vez que se completa la extensión, hay 2 copias de ADN resultantes. Esto contribuye a una rápida amplificación. La unión constante de los cebadores y la apertura por recombinasa también contribuyen a una amplificación rápida y exponencial. Este método de amplificación es rápido, muy sensible y requiere muy poco ADN como material de partida. Sin embargo, los cebadores deben diseñarse cuidadosamente y controlar la temperatura para que las enzimas puedan ensamblar y desensamblar correctamente el ADN^{138,141}

Los factores que pueden influir en la fiabilidad de las técnicas moleculares se describen a continuación:

Genes de ARN detectados: los más utilizados son los genes que codifican las proteínas E, S, N, RdRp y ORF1ab. De forma individual las sensibilidades pueden variar. Por ello, la mayoría de los diferentes kits de PCR incorporan la detección de 2 o más secuencias incrementando así su sensibilidad y especificidad.

Momento de la toma de muestra: el nivel máximo de detección de ARN viral es durante la primera semana después del inicio de síntomas. En algunos casos se puede llegar a detectar 2 días antes de la aparición de la clínica.

La positividad empieza a disminuir en la semana 3 y posteriormente se vuelve indetectable. Sin embargo, se ha observado en algunos casos, sobre todo en aquellos pacientes graves, que la PCR puede permanecer positiva más allá de 3 semanas después del inicio de la enfermedad; esto no significa necesariamente la presencia de virus viables¹⁴² lo cual solamente se podría confirmar mediante cultivo celular.

Tipo de muestra: en función de la clínica se debe hacer una toma de muestra adecuada; en casos de neumonía es más probable la positividad de la PCR en muestras de vías respiratorias bajas (lavado broncoalveolar) y es posible que el resultado en muestra nasofaríngea sea negativo. En un estudio realizado en Pekín con diferentes tipos de muestras procedentes de pacientes hospitalizados se observó que las muestras de lavado broncoalveolar eran las que tenían un número más elevado de resultados positivos (93%), seguidos del esputo (72%), exudado nasofaríngeo (63%) y frotis orofaríngeo(32%)¹⁴³.

Ventajas de la detección del RNA viral

- Detección temprana de la infección
- Elevada especificidad y sensibilidad
- Posible automatización que permite estudiar muchos pacientes simultáneamente

Limitaciones de la detección del RNA viral

- Requiere equipos que, habitualmente, sólo están disponibles en hospitales y centros de investigación; su coste y complejidad ha impedido su uso de forma masiva al inicio de la crisis sanitaria.

- Debe realizarse por personal cualificado
- El tiempo en obtener los resultados es largo (varias horas)

6.1.2. *Técnicas basadas en la detección de antígenos*

Las pruebas de detección de antígenos (Ag) se basan en la detección de proteínas virales específicas de SARS-CoV-2 en la muestra, como la proteína N y las subunidades S1 ó S2 de la proteína de la espícula¹⁴⁴.

Las pruebas de antígeno se basan generalmente en formatos de inmunoensayo con una configuración sándwich (Figura 7). En general, para este tipo de prueba se utilizan dos anticuerpos que reconocen el mismo antígeno, pero han sido producidos en diferentes especies animales. Uno de ellos, llamado anticuerpo de captura, se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido, mientras que el otro anticuerpo de detección es el que se utiliza para mostrar el reconocimiento molecular, ya sea directamente, o utilizando un biorreactivo secundario, como podría ser un anticuerpo secundario (anti-IgG), marcado con moléculas fluorescentes o nanopartículas con propiedades ópticas.

La selección de las proteínas diana que reconocerán estos anticuerpos, así como la estrategia utilizada para producir los anticuerpos es clave, ya que tiene un impacto directo en la sensibilidad y especificidad analítica de la técnica. Es necesario tener en cuenta criterios de inmunogenicidad y homología estructural con otros virus con los que estas proteínas diana pueden compartir secuencias, debido a su cercanía filogenética¹⁴⁵.

Ventajas de los test de antígenos

- Sencillos de realizar, no requieren personal especializado
- Económicos
- Tiempo de respuesta se reduce a 15-20 minutos

Limitaciones de los test de antígenos

- Complicado procesar muchas muestras a la vez
- La sensibilidad es inferior a las técnicas moleculares; la carga viral debe ser elevada para poder detectar la infección.

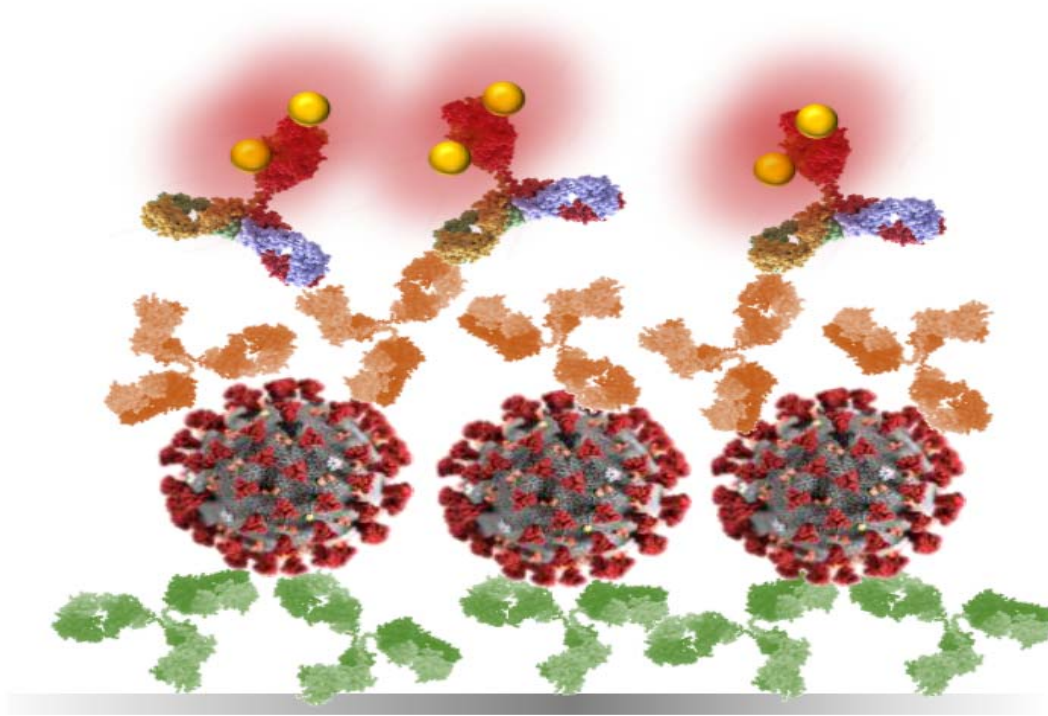


Figura 7. Funcionamiento test de antígenos tipo sándwich

Fuente: www.csis.es

6.2. Detección de anticuerpos

Los métodos de detección de anticuerpos o pruebas serológicas de la COVID-19 detectan tres tipos de anticuerpos frente a SARS-Cov2: IgM, IgG e IgA. La dinámica y evolución de la respuesta inmunológica no se comprende completamente. Las células inmunes del hospedador producen inmunoglobulinas tipo IgM durante las primeras etapas de la infección, aproximadamente después de 7 días¹⁴⁶. Los anticuerpos IgG son los más abundantes en sangre y aparecen de forma más tardía, en la última fase de la infección y desempeñan un papel importante en el establecimiento de la

memoria inmunitaria a largo plazo. Además, la inmunoglobulina tipo IgA presente, predominantemente, en el tejido mucoso, también puede desempeñar un papel fundamental en la respuesta inmune y la progresión de la enfermedad (Figura 8).

Los test para la detección de anticuerpos se basan en el uso de proteínas del virus, las cuáles se crean mediante técnicas recombinantes y mediante inmunoensayos *in vitro* y pueden determinar si un suero tiene anticuerpos (Figura 9).

La proteína viral seleccionada se inmoviliza en un soporte y la unión de los anticuerpos a la proteína se visualiza mediante marcadores de tipo óptico.

En estos métodos es clave la proteína seleccionada, puesto que la homología con otros coronavirus es muy elevada¹⁴⁶.

A raíz de la alta respuesta inmunológica que producen las proteínas S y N en pacientes infectados, éstas se han utilizado de forma rutinaria para desarrollar pruebas serológicas. Sin embargo, en función de cómo se hayan desarrollado los test, su alta homología con las proteínas S y N de otros coronavirus podría conducir a un alto porcentaje de reactividad cruzada con anticuerpos producidos frente a otros coronavirus y, por tanto, conducir a errores en el diagnóstico derivados de falsos positivos¹⁴⁷.

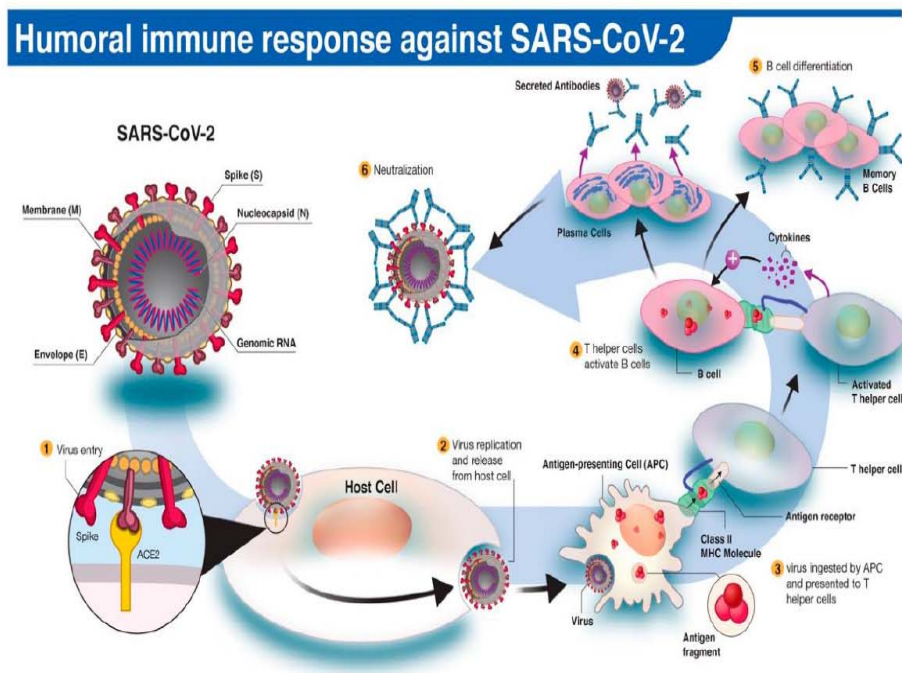


Figura 8. Respuesta inmunológica frente al SARS-CoV-2

Fuente: www.csic.es

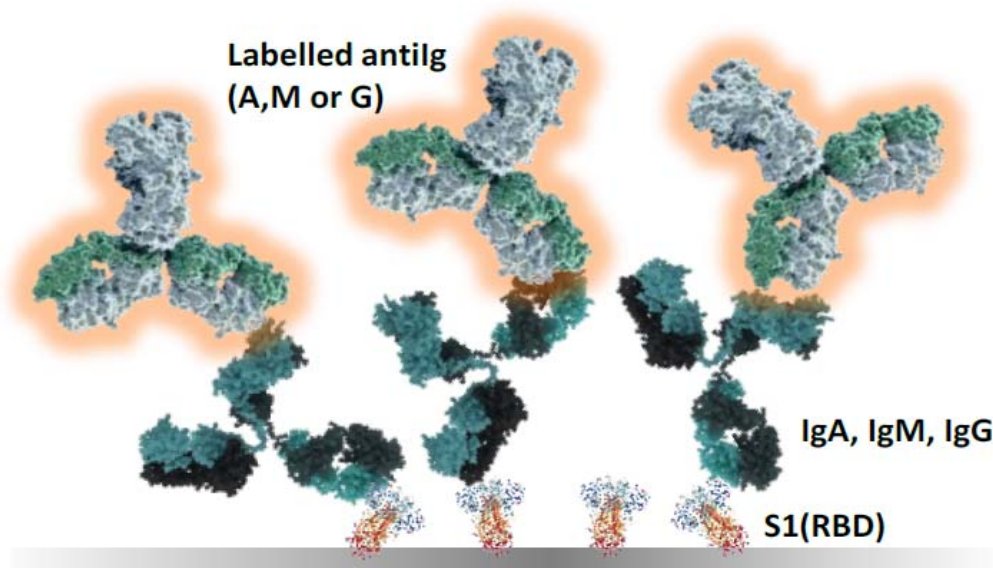


Figura 9. Funcionamiento test serológicos

Fuente: www.csis.es

6.2.1. Inmunocromatografía de flujo lateral

Son pruebas muy sencillas de realizar e interpretar que se pueden utilizar en el punto de atención (PoC, point-of-care). Los resultados se obtienen en pocos (15-20) minutos¹⁴⁸.

Habitualmente, se basan en tiras de nitrocelulosa u otro material similar sobre el que se han inmovilizado proteínas víricas. Una pequeña cantidad de sangre (2-3 gotas) es suficiente para detectar la presencia de los anticuerpos del paciente (IgG, IgM o IgA). La muestra migra por capilaridad a través de la membrana, pasando por una zona donde se han inmovilizado antígenos (proteínas S o N), frecuentemente, marcados con oro coloidal¹⁴⁹. Si hay anticuerpos en la muestra, éstos se unirán a las proteínas virales y continuarán migrando hasta llegar a la zona de detección, donde se inmovilizan los

anticuerpos secundarios (generalmente anti-IgM y anti-IgG), los cuales capturan los complejos IgG-antígeno e IgM-antígeno, lo que provoca la aparición de líneas coloreadas, debido a las nanopartículas de oro utilizadas para marcar las proteínas virales. Además, la prueba incorpora anti-IgG, también marcados con oro coloidal, que se utilizan como control, haciendo que siempre aparezca una línea (Línea de control) al final de la membrana que indica que la prueba ha funcionado correctamente¹⁵⁰.

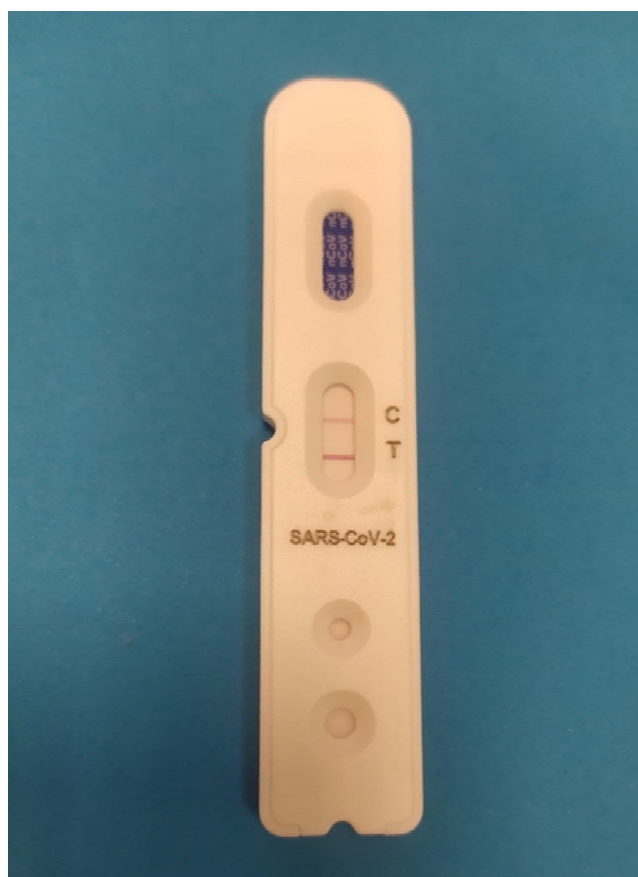


Figura 10. Test rápido Anticuerpos (Wonfo®)

Fuente: elaboración propia

6.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Es uno de los métodos serológicos más utilizados en el que la detección de anticuerpos se realiza en laboratorios y por personal especializado que detecta con precisión el tipo y/o la cantidad de anticuerpos generados por el paciente.

Se realiza en microplacas de 96 pocillos en cuya superficie se ha inmovilizado el antígeno viral y a la que se unirán los correspondientes anticuerpos del paciente. (IgG, IgM, IgA)¹⁵⁰. El tipo de muestra que se utiliza es plasma o suero. El complejo antígeno-anticuerpo unido se detecta usando un segundo anticuerpo marcado con enzima, que en presencia de un sustrato apropiado termina generando una señal colorimétrica o fluorescente.

Se analizan muchas muestras simultáneamente de forma automatizada, aunque su procesamiento no es tan inmediato, se ha demostrado elevada sensibilidad y especificidad¹⁴⁸.

6.2.3. CLIA (*Chemiluminiscent immunoassay*)

El fundamento de la técnica es semejante al del ELISA, pero la señal se genera por una sonda química capaz de emitir luz. También se puede realizar en microplacas de 96 pocillos y los resultados se obtienen en aproximadamente 2-3 horas. El correspondiente ensayo realizado sobre microesferas recibe el nombre de CMIA (Chemiluminiscent microparticle immunoassay)¹⁵¹.

6.2.4. ECLIA (*electrochemiluminiscent immunoassay*)

La señal quimioluminiscente es producida como consecuencia de una reacción electroquímica.

Los anticuerpos se encuentran marcados por sustancias capaces de generar quimioluminiscencia. Este fenómeno es consecuencia de la aplicación de pulsos eléctricos en un determinado entorno químico. Tal es el caso del conocido Sulfo-TAG, un complejo de rutenio que se oxida por el electrodo en presencia de tripropilamina, la cual participa en su reducción, lo que provoca la generación de luz. Este tipo de ensayos tienen elevada sensibilidad, con bajo ruido de fondo. Son fáciles de usar e implementar en diferentes configuraciones¹⁵⁰.

Ventajas de los test serológicos

- Sencillos de realizar, rápida respuesta.
- Gran capacidad de procesamiento de muestras
- La mayor parte de los hospitales disponen de analizadores automatizados
- Económicos
- Se puede usar en suero o plasma y sangre periférica (punción capilar)
- Complementa a los estudios de RT-PCR cuando éstos son negativos en los pacientes con alta sospecha clínica o en aquellos pacientes en que ya no existe carga viral apreciable en las muestras de vías respiratorias superiores y resulta un riesgo obtener muestras de tracto respiratorio inferior.
- Permiten conocer el estado inmunológico del individuo gracias a la detección de los anticuerpos de tipo IgG.

Limitaciones de los test serológicos

- La respuesta IgM e IgG incierta y variable en el curso de la enfermedad; esto implica que un resultado negativo de IgM y de IgG no excluya que el paciente esté infectado por SARS-CoV-2.
- Generalmente, el pico de la producción de inmunoglobulinas IgM es de 4 días después del inicio de los síntomas, hasta 10-14 días; esto limita su aplicabilidad en el diagnóstico de fase aguda.
- Dificultad para posicionar su determinación como técnica cribado frente a RT-PCR o detección de antígeno.
- Dependiendo del tipo de técnica utilizada, un resultado positivo puede también ser debido a una infección por otro coronavirus, no exclusivamente por el SARS-CoV-2.

Lo ideal para un buen diagnóstico de SARS-CoV-2 sería combinar PCR y estudio de la respuesta serológica.

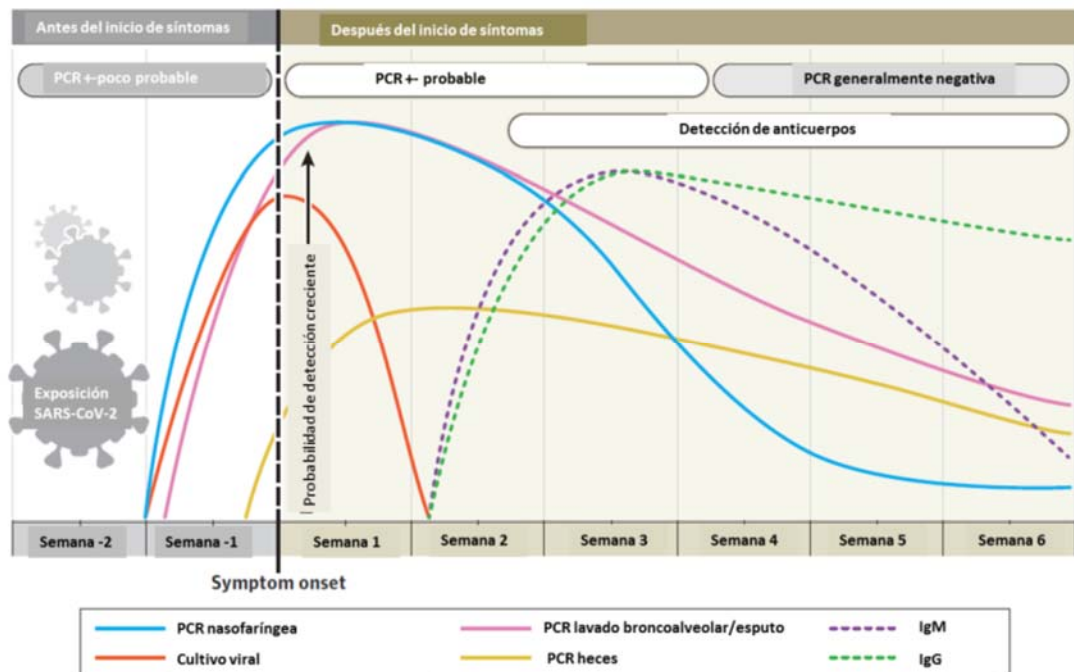


Figura 11. Detección del virus (cultivo y PCR), y Ac (serología)

Fuente: Sethuraman (143)

7. Tratamiento

El descubrimiento y la implementación de nuevas terapias frente a la COVID-19 están suponiendo una carrera a contrarreloj para afrontar esta situación de emergencia. Al inicio de la pandemia, la información de la que se partía era escasa. Solo se disponía de las recomendaciones que venían de China y un número limitado de publicaciones indicando la actividad de unas pocas moléculas frente al coronavirus. A medida que pasaban los meses se han estudiado varias opciones de tratamiento experimental en numerosos ensayos clínicos, pero a día de hoy sigue sin existir un tratamiento específico disponible. Prácticamente, todos los fármacos utilizados ya existían para otras patologías. Cabe destacar que el tratamiento debe ser individualizado en función de la condición del paciente y debe garantizar el soporte vital en caso de complicaciones. El primer paso es aislar al paciente, además se debe asegurar

una adecuada hidratación, se administra paracetamol como antitérmico, antibióticos en caso de sospecha de infecciones bacterianas secundarias, analgésicos para controlar posible dolor y, en casos graves con disnea, hipoxia o síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), uso de oxígeno o ventilación mecánica.

En España, el Ministerio de Sanidad actualiza continuamente el documento técnico elaborado para informar sobre el manejo y tratamiento de los pacientes con infección por SARS-CoV-2. Además, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) renueva regularmente los fármacos disponibles sujetos a condiciones especiales para su uso en la infección por SARS-CoV-2 y así complementar los protocolos elaborados por el Ministerio de Sanidad¹⁵². Asimismo, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha publicado recomendaciones sobre el manejo y tratamiento de los pacientes (Figura 12).

La mayoría de la evidencia disponible deriva de estudios observacionales y, en ocasiones, surgen datos contradictorios; pero, a pesar de ello, la investigación llevada a cabo en todo el planeta ha conseguido algunos resultados considerados sólidos procedentes de ensayos clínicos bien diseñados y muy amplios¹⁵³.

Cloroquina e hidroxiclороquina

Son agentes antiinflamatorios aprobados para ciertas enfermedades autoinmunes y para la malaria. Han sido los más empleados a nivel internacional durante las etapas de mayor incidencia de la pandemia.

Algunos países almacenaron grandes cantidades de estos fármacos, lo que supuso una escasez de estos medicamentos para aquellos pacientes que los necesitaban para indicaciones clínicas aprobadas. Solo unos meses después, surgieron numerosas publicaciones en contra de cualquier uso tanto de hidroxiclороquina como de cloroquina¹⁵⁴.

En un primer momento, su uso se apoyó en estudios *in vitro*, los cuales sugerían que dichos fármacos podían inhibir la infección por SARS-CoV-2 a concentraciones bajas, actuando mediante el aumento del pH endosomal (requerido para la fusión del virus con la célula) o interfiriendo con la glicosilación del receptor celular del virus (ACE-2).

Pero, realmente, lo que dio lugar a un uso amplio de estos agentes fueron estudios publicados de Marsella, dirigidos por Raoult, en un momento de gran necesidad de buenas noticias^{155,154}.

Más adelante, se publicaron diversos resultados clínicos desfavorables para cloroquina e hidroxiclороquina, además se demostró posible riesgo de arritmias graves por prolongación del intervalo QT en su combinación con azitromicina. Su beneficio clínico ha sido descartado tras la divulgación de los resultados del estudio RECOVERY¹⁵⁶.

De igual modo, a mediados de junio de 2020, la OMS también anunció la interrupción del tratamiento con hidroxiclороquina en su ensayo SOLIDARITY¹⁵⁷ y la FDA estadounidense revocó la autorización de emergencia que había concedido en mayo 2020 para el uso de la hidroxiclороquina y la cloroquina.

Lopinavir/ritonavir

Una diana farmacológica prometedoras es la proteasa principal viral Mpro que juega un papel clave en la replicación y transcripción viral. Algunos inhibidores de proteasa (IP) del VIH se han estudiado en pacientes con COVID-19.

Se cree que lopinavir inhibe la proteasa similar a la 3 quimotripsina de los coronavirus.

Para alcanzar los niveles plasmáticos adecuados, debe reforzarse con otro IP del VIH llamado ritonavir.

La asociación de estos dos inhibidores de la proteasa del VIH se utilizó ampliamente los primeros meses de la pandemia a pesar de la falta de pruebas. Sin embargo, varios estudios clínicos empezaron a sembrar dudas sobre su eficacia¹⁵⁸, hasta que los resultados del estudio RECOVERY¹⁵⁹ también han permitido descartar definitivamente cualquier eficacia de la combinación de lopinavir y ritonavir en pacientes graves.

Un amplio número de pacientes en el grupo experimental fueron aleatorizados a recibir la combinación de antirretrovirales, y sus resultados clínicos fueron comparados con los controles asignados al tratamiento estándar. No se observó ninguna diferencia en la mortalidad a los 28 días entre ambos grupos. Tampoco se halló ninguna mejoría en términos del riesgo de empeoramiento de la patología o en la duración de la estancia hospitalaria.

Corticosteroides

Es más probable que los medicamentos antivirales eviten que los casos leves de se conviertan en severos, pero es necesario fármacos adyuvantes en pacientes que desarrollan enfermedad grave. Las infecciones por SARS-CoV-2 pueden inducir respuestas inmunitarias excesivas y aberrantes, asociadas con daños pulmonares graves¹⁶⁰. Al igual que ocurría con el SARS y el MERS, algunos pacientes con la COVID-19 desarrollan SDRA. Los corticosteroides son, hasta ahora, los únicos fármacos que proporcionan un beneficio de supervivencia en pacientes graves.

El valor terapéutico de los corticoesteroides se ha demostrado en numerosos estudios:

el más importante y ya mencionado anteriormente, el ensayo Recovery, que compara una gran variedad de tratamientos y concluye que en pacientes hospitalizados que reciben dexametasona oral o intravenosa, durante un máximo de 10 días, disminuye la mortalidad en los 28 días siguientes¹⁶¹.

En otro ensayo realizado en diferentes países, 384 pacientes fueron aleatorizados a dosis fija (n= 137), dosis dependiente del shock (n = 146) y sin (n = 101) hidrocortisona. El tratamiento con un curso de dosis fija de 7 días o una dosificación de hidrocortisona dependiente de shock, en comparación con la no hidrocortisona, dio lugar a una probabilidad de superioridad del 93% y 80%, respectivamente, con respecto a las probabilidades de mejora clínica del paciente¹⁶².

Un metaanálisis de la OMS que reunió datos de siete ensayos clínicos, que evaluaron la eficacia de los corticosteroides en 1.703 pacientes en estado crítico, encontró que los *odds ratios* para la asociación con la mortalidad fueron 0,64 (IC del 95%: 0,50-0,82; $p < 0,001$) para la dexametasona en comparación con el grupo placebo, 0,69 (IC del 95%, 0,43-1,12; $p=0,13$) para hidrocortisona y 0,91 para metilprednisolona (IC del 95%, 0,29-2,87; $p=0,87$). No se observó un aumento de efectos adversos derivados del uso de estos medicamentos¹⁶³.

Actualmente, la OMS sugiere no utilizar corticosteroides en el tratamiento de pacientes con enfermedad leve. Sin embargo, recomienda corticosteroides sistémicos para el tratamiento de pacientes graves y/o críticos. A pesar de esto, advierte que el umbral de saturación de oxígeno del 90% para definir la COVID-19 grave debía interpretarse con cautela cuando se utiliza para determinar qué pacientes deben recibir corticoesteroides sistémicos.

Remdesivir

Remdesivir (RDV) es un análogo de nucleótidos y el profármaco de un nucleósido de adenosina C que se incorpora a las cadenas de ARN viral hijas, lo que da lugar a una interrupción prematura de la síntesis de ARN. Recibió una "autorización de uso de emergencia" de la FDA en mayo de 2020 y una autorización de "comercialización condicional" de la EMA en julio del mismo año¹⁶⁴.

Los experimentos *in vitro* han demostrado que el Remdesivir tiene una amplia actividad anti-CoV inhibiendo la RdRp en cultivos de células epiteliales de las vías respiratorias. Este fármaco es muy similar a Tenofovir utilizado en la terapia del VIH. Remdesivir fue desarrollado originalmente para el tratamiento del virus del Ébola, pero, posteriormente, se descartó su uso a raíz de los resultados decepcionantes obtenidos en un gran ensayo clínico aleatorizado¹⁶⁵.

Los modelos animales sugieren que una infusión de 10 mg / kg de Remdesivir una vez al día puede ser suficiente para el tratamiento. En humanos, en los estudios de Fase III se ha utilizado la dosis inicial de 200 mg el día 1, seguida de 100 mg durante otros 4-9 días, este fármaco ha demostrado beneficios en el tratamiento de pacientes COVID-19 y no se han descrito problemas de seguridad¹⁶⁴.

Se han publicado recientemente ideas nuevas sobre el uso de RDV como terapia de inhalación. La instilación local o aerosol en la primera fase de la infección, junto con gárgaras orales antisépticas-antivirales y colirio de povidona yodada para la conjuntiva atacarían al virus directamente a través de los receptores a los que se une, disminuyendo significativamente la replicación viral y el riesgo de enfermedad¹⁶⁶.

GRAVEDAD	CRITERIOS	INGRESO/SEGUIMIENTO	TRATAMIENTO SOPORTE	TRATAMIENTO ESPECÍFICO	COMENTARIOS
ASINTOMÁTICO o PRESINTOMÁTICO	Ausencia de síntomas.	Ambulatorio/Domiciliario pacientes alto riesgo^{1,2}: Vigilancia telefónica activa diaria. Resto de pacientes: auto-vigilancia de síntomas de riesgo (disnea).	Aislamiento según recomendaciones vigentes de Salud Pública.	No	Recomendación en contra del uso de dexametasona.
LEVE	Síntomas respiratorios y (todos): · No disnea · Frecuencia respiratoria < 22 · SatO ₂ basal ≥ 94%	Ambulatorio/Domiciliario pacientes alto riesgo^{1,2}: Vigilancia telefónica activa diaria. Resto de pacientes: auto-vigilancia de síntomas de riesgo (disnea).	Aislamiento según recomendaciones vigentes de Salud Pública. Tratamiento sintomático (preferentemente paracetamol).	No	Recomendación en contra del uso de dexametasona.
MODERADA o GRAVE	Síntomas respiratorios y (cualquiera): · Disnea · FR >22 rpm · SatO ₂ basal < 94% · Pacientes leves de alto riesgo ³ sin posibilidad de vigilancia telefónica activa diaria.	Ingreso Hospitalario: · SatO ₂ /24h inicialmente, después según situación clínica. · RX tórax. · Analítica: Hemograma y bioquímica, Ferritina, D-dímero, Proteína C reactiva, Procalcitonina. · Valorar: · Muestras microbiológicas para investigar infección bacteriana. · Troponina. · IL6 basal y en caso de cambio clínico. · Scores pronósticos ⁴ . · TC de tórax para estadiaje de gravedad y descartar TEP en su caso.	Tratamiento sintomático (preferentemente paracetamol). Oxigenoterapia si precisa ⁵ . Profilaxis tromboembólica⁶. Considerar tratamiento antibiótico si coinfección o sobreinfección bacteriana basado en sospecha clínica y en resultados de estudios microbiológicos ⁵ .	Dexametasona⁶ Tocilizumab⁷ + Dexametasona Remdesivir⁸	Recomendada si se necesita O ₂ de bajo flujo para mantener SatO ₂ > 94%. Ha demostrado impacto moderado en disminución de mortalidad. Recomendado: 1) Añadir tocilizumab si fallo clínico de la dexametasona. 2) Inicio simultáneo en pacientes con saturación de oxígeno <92% (basal o con O ₂ de bajo flujo) y PCR >75 mg/dL. Ha demostrado impacto en reducción de la mortalidad. Recomendado si se necesita O ₂ de bajo flujo para mantener SatO ₂ > 94%. No disminuye mortalidad. En un ensayo clínico doble ciego disminuyó tiempo hasta la recuperación. Solo en pacientes con duración de síntomas de hasta 10 días.
CRÍTICA	Necesidad de oxigenoterapia de alto flujo o ventilación mecánica (invasiva o no invasiva) o ECMO.	Ingreso en UCRE o UCI		Tocilizumab + Dexametasona Remdesivir	Ha demostrado impacto en disminución de la mortalidad. No iniciar Remdesivir. Continuar Remdesivir si se ha iniciado antes de la progresión a situación crítica.

Figura 12. Recomendaciones SEIMC para manejo clínico de pacientes

 Fuente: www.seimc.org

8. Prevención

La prevención a través de medidas de salud pública sigue siendo el pilar principal del control de la infección por SARS-CoV-2 y la mitigación del impacto de la pandemia. Existen medidas preventivas efectivas para el control de las infecciones respiratorias, que se han puesto en práctica desde hace mucho tiempo. Sin embargo, la incertidumbre sobre el papel de las diferentes rutas de transmisión del SARS-CoV-2 complica la selección de las medidas más eficientes de salud pública a implementar. Las estrategias preventivas básicas incluyen: la identificación y el aislamiento de casos infecciosos y cuarentena para casos sospechosos y contactos cercanos; cambios en los comportamientos individuales, incluido el distanciamiento físico y social, el uso de mascarillas faciales e higiene de manos; medidas de salud pública como restricciones de viaje, prohibiciones de reuniones masivas y cierres locales o nacionales cuando

las otras medidas resulten ineficaces para detener la propagación del virus. Por tanto, las medidas preventivas pueden aplicarse a nivel personal, comunitario o social.

8.1. Medidas preventivas

8.1.1. *Prevención a nivel personal*

Buena higiene respiratoria

Se refiere a las medidas destinadas a contener secreciones y reducir su propagación en el medio ambiente o a otras personas¹⁶⁷. Estas incluyen: cubrirse la boca y la nariz con un pañuelo de papel y deshacerse de él, inmediatamente, tras su uso al toser o estornudar, o bien cubrirse con el codo o con la ropa para evitar la dispersión del virus. Además, se debe intentar evitar tocarse ojos, nariz y boca con las manos.

Higiene de manos:

El papel de los fómites en la transmisión del SARS-CoV-2 sigue sin estar claro, pero no puede ser excluido. Aunque los objetos pueden contaminarse fácilmente con gotitas y contaminan las manos, es extremadamente difícil probar tal transmisión. En cualquier caso, se sabe que lavarse las manos con frecuencia interrumpe la transmisión de enfermedades respiratorias, ya que las personas habitualmente hacen contacto de dedo a nariz o de dedo a ojo¹⁶⁸. Se recomienda realizar el lavado de manos durante 30 segundos con jabón común cuando hay contacto con un objeto inicialmente infectado y con regularidad siempre que sea posible. Si no hay agua y jabón disponibles se recomiendan soluciones de gel hidroalcohólico. Se ha demostrado que estas soluciones inactivan eficazmente el virus SARS-CoV-2 en 30 segundos¹⁶⁹. La higiene de manos tiene la ventaja adicional de prevenir otras muchas infecciones respiratorias y de contacto.

Mascarillas faciales:

El uso de mascarillas para reducir el riesgo de infección es una práctica médica ya establecida. Por tanto, es sorprendente que haya creado tal debate en el contexto de la pandemia. La recomendación inicial de la OMS y otras autoridades sanitarias de que las mascarillas solo debían ser utilizadas por trabajadores sanitarios y por los pacientes sintomáticos dieron lugar a controversias entre los expertos y confusión generalizada entre el público. Este consejo era contradictorio con las imágenes de personas que, habitualmente, llevaban mascarillas en la mayoría de países de Asia que lograron contener la pandemia¹⁷⁰.

Las mascarillas pueden prevenir la transmisión de dos formas:

1. Cuando las usan personas sanas reducen la exposición de la boca y la nariz a partículas virales presentes en el aire o en manos contaminadas.

2. Cuando son usadas por una persona infectada, realizan un control de la fuente, reduciendo la cantidad de virus dispersos en el ambiente al toser, estornudar o hablar.

Las mascarillas más utilizadas actualmente son:

- Mascarillas FFP2 (Filtering facepiece): diseñadas para bloquear el 95% de partículas más pequeñas. Reducen la exposición del usuario a partículas, incluidos aerosoles y gotas grandes. También reducen la exposición del paciente a las partículas emitidas por el portador (a menos que estén equipadas con una válvula unidireccional para facilitar la respiración)^{170,171}.

- Las mascarillas quirúrgicas: solo filtran eficazmente partículas grandes. Reducen solo marginalmente la exposición del usuario a gotitas y aerosoles. Sin embargo, limitan considerablemente la emisión de saliva o gotitas por parte del usuario, lo que reduce el riesgo de infección a otra gente¹⁷¹.

- Las mascarillas de tela: detienen las gotas que se liberan cuando el usuario habla, estornuda o tose. Según lo recomendado por la OMS, deben incluir multicapas de tela. Cuando las mascarillas quirúrgicas o N95 no están

disponibles, las de tela pueden reducir el riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 en lugares públicos^{170,171}.

Distanciamiento físico/social y evitar las condiciones de hacinamiento

El distanciamiento físico significa mantener una distancia segura de los demás. El término es, a menudo, confundido con el distanciamiento social, generalmente impuesto durante los encierros, que significa reducir los contactos sociales tanto como sea posible, quedarse en casa y mantenerse alejado de los demás para evitar la propagación de COVID- 19.

Se ha demostrado inequívocamente que el distanciamiento social contribuye a reducir la propagación del SARS-CoV-2.

En Wuhan y Shanghai, se redujeron los contactos diarios 7 u 8 veces durante el período de distanciamiento social y la mayoría de las interacciones se limitaron al hogar^{172,173}. El distanciamiento social puede ser una elección individual, pero generalmente es impuesto por las autoridades sanitarias. Con el reinicio de las actividades económicas y sociales, el distanciamiento físico en lugares públicos es un comportamiento fundamental en la vida cotidiana y una medida esencial para reducir la propagación de SARS-CoV-2. Mantener una distancia segura de los demás parece sencillo, pero definir lo que se puede considerar una "distancia segura" es bastante complejo. En un metaanálisis publicado¹⁷⁴, los autores estimaron que el riesgo de infectarse con el SARS-CoV-2 se reduce al 13% para los que están a 1 m y se reducen aún más a solo un 3% más allá de esa distancia. Con base a esta evidencia, la OMS y el ECDC recomiendan una distancia interpersonal de 1 m, aunque otras agencias y países sugieren 1,5 m (Australia, Italia, Alemania), 1,8 m (EE. UU. CDC) o incluso 2 metros (Canadá, China, Reino Unido)¹⁷⁵. Algunos autores sugieren que incluso 2 metros podrían no ser suficientes y que el hecho de ser "seguro" dependería de múltiples factores relacionados tanto con el individuo como con el medio ambiente; éstos podrían incluir la carga viral infecciosa, la duración de la exposición, el número de personas presentes, entornos interiores frente a los

exteriores o el nivel ventilación¹⁷⁶. En situaciones donde el distanciamiento físico es imposible de evitar (trenes, autobuses, metros) el uso de mascarillas suele ser obligatorio.

Descontaminación de superficies

Como ya hemos mencionado en apartado anterior, el SARS-CoV-2 puede sobrevivir algunas horas sobre las superficies, por lo que es de suma importancia la limpieza y desinfección frecuente de distintas superficies (barandillas, mesas, teclados, manillares) que pueden ser un medio de transmisión para el virus tanto en centros de trabajo como en los domicilios. Según la Sociedad Española de Sanidad Ambiental tanto la lejía doméstica diluida en agua al 0,5% como el etanol diluido al 60-70% son eficaces para la inactivación del virus y son los productos utilizados en el ámbito del hogar y centros de trabajo¹⁷⁷.

8.1.2. Prevención a nivel comunidad/social

El aislamiento y la cuarentena

Son medidas esenciales para reducir la propagación. A menos que un paciente esté hospitalizado, la cuarentena y el aislamiento, generalmente, se realizan en el hogar o en instalaciones dedicadas a ello como hoteles o infraestructuras de aislamiento grupal¹⁷⁸. Dada la incertidumbre sobre la infectividad de la persona sospechosa, las medidas preventivas son similares tanto para el aislamiento de casos confirmados como para la cuarentena de contactos. Básicamente, debe quedarse en casa o en las instalaciones y evitar contactos no esenciales con otras personas, incluidos los miembros del hogar, durante un período determinado para evitar la propagación de la infección.

La larga incubación y la alta infectividad presintomática de la COVID-19 ponen en riesgo a los miembros de la familia¹⁷⁹. La tasa de infección encontrada para familiares varía entre el 11% y el 32%¹⁸⁰. Estas diferencias probablemente

se deban a las diferentes medidas implementadas en el interior de las viviendas familiares. Lo ideal es que las personas aisladas tengan un dormitorio y baño separado y no deben tener ningún contacto con el resto de la familia, en particular con aquellos en riesgo de contraer enfermedad grave.

A día de hoy, se sigue debatiendo el período de aislamiento y tiempo de cuarentena requeridos para considerar que los casos confirmados o sospechosos ya no sean infecciosos. Inicialmente, el requisito para levantar el aislamiento de un caso confirmado consistía en la recuperación clínica y tener dos resultados negativos de RT-PCR consecutivos con un intervalo mínimo de 24 horas entre ellos¹⁸¹.

Este último criterio supuso un problema para los países con recursos limitados; además, algunos pacientes pueden seguir teniendo resultados de PCR positivos durante semanas o meses después del cese de los síntomas, lo que lleva a periodos de aislamientos prolongados y probablemente innecesarios.

Los últimos criterios actualizados de la OMS para el período de aislamiento y cuarentena se basan en datos que muestran lo poco habitual que es la presencia de virus viables pasados 9 días tras el inicio de síntomas¹⁸². Las recomendaciones son las siguientes:

- En pacientes sintomáticos, deben estar al menos 3 días sin síntomas y cumplir 10 días después del inicio de los síntomas.
- Los casos asintomáticos deben cumplir 10 días de aislamiento después de la prueba positiva para SARS-CoV-2.

Sin embargo, varios países (por ejemplo, Italia) continúan aplicando los anteriores criterios que incluyen una prueba de RT-PCR negativa, que puede dar lugar a que se mantenga al individuo aislado mucho más tiempo.

El período de cuarentena recomendado para contactos y viajeros no ha cambiado y sigue siendo 14 días, aunque varios países lo han reducido a 10 días (Suiza o España).

Rastreo de contactos

El rastreo de contactos puede ser eficaz para reducir el riesgo de propagación del virus¹⁸³, pero es un ejercicio complejo y requiere muchos recursos. Es más útil cuando se aplica al principio del brote, antes de que se exista transmisión comunitaria. Una vez que los casos se disparan, la identificación y el seguimiento de todos los contactos utilizando solo los recursos de salud pública es muy complicado y son necesarias medidas adicionales como las citadas anteriormente (distanciamiento físico, uso de mascarillas y los cierres localizados)¹⁸⁴.

Se han ido desarrollando distintas estrategias y aplicaciones de rastreo. Muchos países han aprovechado los teléfonos móviles para diseñar y dirigir medidas para evitar y/o contener la propagación del virus. Difusión de mensajes de información, uso de una aplicación del móvil para detectar si el teléfono se ha acercado durante un período de tiempo determinado a otro teléfono de una persona a la que se le haya diagnosticado el SARS-CoV-2 y que, por lo tanto, sea potencialmente infeccioso. Se envía un mensaje de advertencia en el que se pedirá al propietario que busque asistencia médica y que se someta a prueba.

Desafortunadamente, la inmensa mayoría de las aplicaciones de rastreo no han funcionado como se esperaba. El éxito de éstas se mide por el número de contactos detectados, que hasta ahora han sido relativamente pocos, hay que tener en cuenta que para que funcionen estas aplicaciones, la ciudadanía debe descargarse estas aplicaciones, y cuantos más lo hagan mejor se detecta.

Prohibición de las reuniones masivas

La mayoría de los países han implementado prohibiciones a nivel nacional de reuniones masivas como eventos deportivos y culturales, conciertos, celebraciones religiosas, mítines y manifestaciones políticas, etc¹⁸⁵. Se han cancelado varios importantes eventos internacionales. (Juegos Olímpicos de Tokio, la Eurocopa, la Fórmula 1, Eurovisión, eventos de Semana Santa,

peregrinación a La Meca, y muchos otros). Algunos de estos se han ido reanudando, pero sin público o con aforo limitado.

Es incierto bajo qué condiciones los eventos que requieren la presencia de un gran número de personas en lugares cerrados (discotecas, bar, etc.) se pueden reanudar sin riesgo de que se produzca un acontecimiento superdifusor. La reapertura limitada de estos locales durante el verano de 2020 y 2021 se asoció con un aumento de la propagación del virus observado en toda Europa.

Prohibición de viajes y cierre de fronteras

Desde hace mucho tiempo se reconoce que los viajes por tierra, mar y aire pueden ser eficientes y rutas rápidas para la propagación internacional de un virus pandémico¹⁸⁶. Las condiciones para restringir los movimientos de personas y bienes entre países, en caso de una emergencia de salud pública, se han descrito en el Reglamento Sanitario Internacional de la OMS, adoptado por todos los estados miembros de la citada organización, en 2005¹⁸⁷. Durante toda la pandemia casi todos los países han implantado medidas que restringen el movimiento de la población, como el control de la entrada al territorio, el control de desplazamientos dentro del país, cierre parcial o total de fronteras y la cancelación de vuelos internacionales. Sin embargo, las amplias restricciones de viajes y los numerosos cierres de fronteras no han impedido que el virus llegue a todos los países del planeta¹⁸⁸.

Uno de los motivos por los cuáles las prohibiciones de viaje no han sido del todo eficaces es que es complicado evitar que todo el mundo entre en un país. Muchas personas pueden estar exentas a estas restricciones y viajar por acuerdos internacionales o nacionales. (Diplomáticos, personal sanitario, tripulaciones de aviones). Otras pueden cruzar las fronteras de forma no oficial.

Las prohibiciones de viaje generalizadas y los cierres de fronteras pueden reducir el riesgo de propagación de un virus pandémico pero, al igual que los bloqueos generalizados, son herramientas poco contundentes. Afectan a un gran número de personas no infectadas, causan un impacto sustancial en la economía

y en el comercio, y puede traducirse en una falsa y peligrosa sensación de seguridad en la población y las autoridades. El cribado regular y la cuarentena de todos los viajeros siguen siendo las formas más eficaces de evitar la transmisión local de un virus por casos importados¹⁸⁸.

8.2. Vacunas

Desde el punto de vista de la elaboración de tácticas de defensa frente a infecciones originadas por virus emergentes como el SARS-CoV-2, dependemos del conocimiento minucioso de la interacción del patógeno con las células del huésped y de la regulación que éste ejerce sobre la maquinaria celular para favorecer la propagación de la progenie viral. Este proceso se lleva a cabo, principalmente, mediante la interacción específica de proteínas virales con proteínas celulares secuestrando su función. Por otro lado, el estudio de la respuesta inmune como mecanismo de defensa es primordial para el diseño de estrategias de prevención y tratamiento de la COVID-19¹⁸⁹.

La comprensión de la inmunidad adaptativa al SARS-CoV-2 es importante para el desarrollo de la vacuna, la interpretación de la patogénesis de la enfermedad y la calibración de las medidas de control de la pandemia. Actualmente, existe un conocimiento todavía limitado de la respuesta inmune del huésped al SARS-CoV-2¹⁹⁰. A partir de los datos registrados sobre coronavirus anteriores, se pueden hacer predicciones sobre cómo el sistema inmunitario puede lidiar con este virus y cómo el virus puede evadir tales respuestas del huésped. Los tres componentes fundamentales del sistema inmunológico adaptativo son las células B (que generan los anticuerpos), las células T CD4 + y las células T CD8 +¹⁹⁰.

En general, por los conocimientos que hoy tenemos parece que la inmunidad al SARS-CoV-2 puede ser duradera pero no óptima¹⁸⁹. Los anticuerpos son solo una parte fácilmente medible de la inmunidad. Son la parte humoral,

que neutralizan a las partículas virales circulantes, pero quien los produce, los linfocitos B, y, a largo plazo, los linfocitos B de memoria (que son como las unidades de élite ya entrenadas, pero no muy numerosas), son de más larga duración, se reactivan y producen nuevos anticuerpos ante una nueva exposición¹⁹¹. Asimismo, cada vez hay más evidencias en esta enfermedad de la importancia de la inmunidad celular, los linfocitos T, que se ocupan de destruir las células infectadas y complementan a la inmunidad humoral, también con su correspondiente versión de linfocitos T de memoria de más larga duración¹⁸⁹. Esta es la inmunidad inducida por la infección natural, pero, sin duda, las vacunas ejercen la misma función de manera más eficaz. Las vacunas bien diseñadas pueden actuar activando a todos los buenos componentes de la inmunidad efectora o adaptativa, y sin interferir con una buena activación inflamatoria e innata inicial¹⁹¹.

Tipos de vacuna

Todas las vacunas están construidas sobre el mismo principio subyacente: exponen nuestro sistema inmunológico a piezas clave de la maquinaria del patógeno objetivo (denominados "antígenos"), protegiéndonos posteriormente al enfrentarnos con verdadero virus. Se trata, por tanto, de desarrollar una preparación destinada a generar inmunidad frente a la enfermedad, estimulando la producción de anticuerpos, bien a través de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos. El método más habitual para administrar las vacunas es la inyección intramuscular, aunque algunas se administran con un vaporizador nasal u oral¹⁸⁹.

El esfuerzo para el desarrollo de la vacuna en respuesta a la pandemia no tiene precedentes en términos de premura y recursos¹⁹². Una característica sorprendente de este desarrollo es la diversidad de plataformas tecnológicas que se están evaluando:

- **Vacunas de ARNm:** consisten en moléculas denominadas "ARN mensajero" que codifican las partes del patógeno objetivo que son reconocidas por nuestro sistema inmunológico (antígenos). Se utiliza un liposoma para su administración al huésped¹⁹² en cuyas células las moléculas de ARN se convierten en antígenos que son detectados por las células inmunes.

- **Vacunas de ADN:** utiliza plásmidos de ADN para expresar antígenos del patógeno en las células huésped. Como en las vacunas de ARN, los antígenos son posteriormente detectados por células del sistema inmune¹⁹³.

- **Vacunas basadas en vectores virales:** Consisten en virus inofensivos que han sido modificados para que contengan antígenos del patógeno objetivo. Los virus modificados actúan como sistemas de entrega que muestran los antígenos a células inmunes. Esta estrategia puede mejorar la inmunogenicidad sin un adyuvante y promueve una respuesta robusta de las células T citotóxicas para eliminar las células infectadas por virus¹⁹⁴.

- **Vacunas atenuadas vivas:** Se utiliza una versión viva del virus, pero debilitada o modificada, con virulencia reducida (por ejemplo, una proteína mutada). Esta estrategia puede inducir una respuesta inmune rápida y fuerte, pero está contraindicado en inmunodeprimidos¹⁹⁵.

- **Vacunas recombinantes basadas en proteínas:** Utiliza antígenos, es decir, proteínas del agente infeccioso (por ejemplo, proteína S) para provocar una respuesta inmune en el huésped. De uso general en combinación con un adyuvante para mejorar la inmunogenicidad¹⁹⁶.

Vacunas aprobadas en Europa y EE. UU (Tabla 2)

- La vacuna *Pfizer/BioNTech. Comirnaty (BNT162b2)*

BNT162b2 es una vacuna desarrollada por BioNTech, Pfizer y Fosun, está compuesta por ARN mensajero modificada por nucleósidos y formulada de forma encapsulada en nanopartículas lipídicas que va a codificar al dominio de

unión del receptor de la glicoproteína de la espícula S (spike). El esquema de vacunación recomendado son 2 dosis con un intervalo de separación entre ellas de 21 días ¹⁸⁹. Tras la segunda dosis, la reactogenicidad sistémica es de moderada intensidad. Es menor en los individuos mayores de 65 años. En general induce buenas respuestas inmunes humorales después de la primera dosis y mejoran con la pauta completa, incluidos los mayores de 65 años.

Esta vacuna provoca eficientemente respuestas de células *helper* de fenotipo Th1, respuestas celulares de linfocitos T CD4+ y linfocito T CD8+. Su conservación y almacenamiento es complejo, requiere temperaturas de -70°C, lo cual exige una logística especial y delicada para evitar su deterioro.

En julio del 2020 se publicaron los datos del ensayo clínico en fase II/III¹⁹⁷ realizado en EEUU con 37.700 voluntarios de más de 16 años de edad procedentes de diferentes países de todo el mundo. Todos ellos recibieron 2 dosis de vacuna o placebo separados por 18-40 días. El 21,3% eran mayores de 65 años y el 20,3% presentaban comorbilidades. Se evaluó la eficacia 7 días post vacunación completa (después de la segunda dosis) con resultado del 95%. En individuos con patología de base fue del 95,4%. Cuando se analizó la eficacia solo 10 días tras la primera dosis ésta fue del 86,7% y aumentaba al 90,5% en global tras la segunda dosis (10 días después)¹⁹⁸. Los efectos secundarios más frecuentes ocurrieron tras la segunda dosis y fueron los siguientes: dolor en el punto de inyección (84,1%), fatiga (62,9%), dolor de cabeza (55,1%), dolores musculares (38,3%), escalofríos (31,9%) y fiebre (14,2%), siendo más habituales en los sujetos de 55 años o más.

En diciembre de 2020 se notificaron 21 casos de anafilaxia postvacunal al sistema de vigilancia de efectos adversos de EEUU, tras la administración de 1.900.000 dosis¹⁹⁹.

Se dispone de datos reales de efectividad en varios países:

En Israel, al comparar con población sanitaria no vacunada hubo una reducción del 30% de las infecciones tras la primera dosis y del 75% tras la segunda dosis.

En pacientes asintomáticos la reducción llegó al 47% y 85% respectivamente²⁰⁰. Además, en este mismo país se realizó otro estudio observacional en el momento en el que el 80% de los aislamientos pertenecían a la variante británica (B.1.1.7). La efectividad a los 14-20 días tras la primera dosis y a partir del séptimo día tras la segunda para la infección fue del 46% y 92%, del 57% y 94% para la COVID-19 sintomática del 74% y 87% para las hospitalizaciones, del 62% para las formas severas y 92% y del 72% para los fallecimientos entre los días 14 y 20²⁰¹.

En Inglaterra, la efectividad en personas mayores de 80 años frente a enfermedad sintomática y grave a partir del día 28 de la primera dosis o a partir del séptimo día tras la segunda fue del 57% y del 88% respectivamente²⁰².

En relación con el poder neutralizante de esta vacuna frente a las nuevas variantes, todos los sueros de vacunados con dos dosis neutralizaban las variantes B.1.1.7, P.1, B.1.351²⁰¹.

- La vacuna *Moderna, Inc. (COVID-19 Vaccine, mRNA-1273)*

ARNm-1273 es una vacuna desarrollada por Moderna. Al igual que la de Pfizer es una vacuna de ARN mensajero modificada por nucleósidos y formulada de forma encapsulada en nanopartículas lipídicas que va a codificar al dominio de unión del receptor de la glicoproteína de la espícula S (spike). El esquema de vacunación recomendado son 2 dosis con un intervalo de separación de 28 días entre ellas.

El ARNm-1273 indujo fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes tanto al SARS-CoV-2 del tipo silvestre (D614) como al D614G mutante 2, así como respuestas de las células T CD8+, y protege contra la infección por SARS-CoV-2 en ratones y primates no humanos²⁰³.

En humanos tras la primera dosis induce la producción de anticuerpos frente a la espícula y anticuerpos neutralizantes después de la segunda dosis tanto en mayores como en menores de 55 años. Induce además respuestas inmunes celulares de linfocitos T CD4+ con perfil de citoquinas Th1. Una vez descongelada es muy termosensible, su almacenamiento requiere temperaturas muy bajas²⁰⁴.

Los datos de eficacia y seguridad se basan en los resultados obtenidos de un ensayo en el que se incluían a individuos de más de 18 años, los cuales recibieron dos dosis con un intervalo entre ellas de 28 días. La eficacia de la vacuna llegó al 95,5% a partir del día 14 tras la segunda dosis para los de 18 a 64 años, y del 86,4% para los de mayor edad. La eficacia global alcanzada a día 28 fue del 92,1%. En los grupos de riesgo de padecer enfermedad grave fue del 90,9% y del 94,4% para todas las edades. Los efectos secundarios locales más frecuentes fueron hinchazón y/o dolor en el punto de inyección y linfadenopatía axilar, lo cuales aparecieron tras la segunda dosis y en edades comprendidas entre 18 a 64 años. El cansancio, cefalea, mialgia, artralgia y fiebre, fueron los efectos sistémicos más comunes²⁰⁴.

En relación con el poder neutralizante de esta vacuna frente a las nuevas variantes, P.1., P.2. y B.1.351 mostraron una notable resistencia a la neutralización.

- La vacuna *Oxford Vaccine Group/AstraZeneca. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222)*

ChAdOx1 es una vacuna desarrollada por la Universidad de Oxford, AstraZeneca y el Instituto del Suero de la India. Utiliza como vector un adenovirus no replicante de chimpancé, que contiene la glicoproteína estructural de superficie no modificada de longitud completa (proteína S) del SARS-CoV-2. El esquema de vacunación recomendado son 2 dosis con un intervalo de separación de 10-12 semanas entre una y otra. Actualmente utilizada en voluntarios de 18 a 55 años.

Los resultados de un ensayo aleatorio de fase I/II mostraron que en los vacunados, las respuestas de las células T alcanzaron su punto máximo en el día 14, las respuestas de IgG anti-spike aumentaron en el día 28, y las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 se detectaron en > 90%.

Produce anticuerpos frente a la proteína S y anticuerpos neutralizantes tras la segunda dosis y no se ha constatado interferencia entre la inmunidad previa anti-vector y la respuesta inmune a la primera y a la segunda dosis. Los anticuerpos frente al vector generados tras la primera dosis no influyen en la respuesta humoral, pero sí en la respuesta celular. Las condiciones de almacenamiento es simple refrigeración entre 2°C y 8°C²⁰⁵. Se han publicado los resultados de eficacia y seguridad de la vacuna en régimen de dos dosis llevadas a cabo en el Reino Unido y en Brasil. Los sujetos tenían más de 18 años. Los participantes proporcionaron muestras semanales nasofaríngeas y orofaríngeas para detección de virus por PCR. A las dos semanas tras la segunda dosis, la eficacia fue del 60,3%. La seguridad de la vacuna se evaluó en 23.744 participantes²⁰⁶. Los efectos secundarios más comunes fueron dolor en el punto de inyección, dolor de cabeza, fatiga, mialgia, fiebre, náuseas, artralgia y linfadenopatía, siendo menos habituales en los de 65 años o más²⁰⁶.

La eficacia evaluada en la fase III de los ensayos clínicos llevados a cabo en el Reino Unido, Brasil y Sudáfrica de la primera y de la segunda dosis frente a la enfermedad sintomática, fue de 78,3% con una dosis y cuando habían pasado 12 semanas entre ambas dosis llegaba al 81,3%²⁰⁶.

En un estudio prospectivo de cohortes realizado en Escocia, la efectividad de la primera dosis de vacuna frente a hospitalizaciones en personas de 80 años o más, a los 28-34 días de su administración, fue del 94%²⁰⁷.

La efectividad de esta vacuna frente a las nuevas variantes a día de hoy en circulación ha sido objeto de diversas publicaciones. En un estudio se comprobó una efectividad de 74,6% para la variante B.1.1.7 frente a 84% para el resto de variantes²⁰⁷²⁰⁶.

En cuanto a la variante B.1.351, esta vacuna tuvo una eficacia frente a enfermedad del 10,4%²⁰⁷.

- La vacuna *Janssen Vaccines & Prevention B.V./Johnson & Johnson. Ad26.COVS.2*

Ad26.COVS.2 es una vacuna desarrollada por Janssen, basada en un vector del adenovirus tipo 26 (Ad26) recombinante e incompetente para la replicación, en el cuál se vehiculiza la proteína de la espícula de SARS-CoV-2. El esquema de vacunación recomendado es una sola dosis.

Se considera que su perfil de seguridad es aceptable. La administración de una sola dosis provoca la producción de anticuerpos neutralizantes en cualquier edad, incluidos aquellos mayores de 65 años. Consigue inducir las respuestas CD4+Th1 y CD8+. Las condiciones de almacenamiento y conservación son en frío (2-8°C)

Se han incluido 60.000 participantes en la fase III del ensayo clínico y, a la vista de los resultados, la vacuna ha sido autorizada para su comercialización por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) el 11 de marzo de 2021. En dicho ensayo, se incluyeron sujetos residentes en el Reino Unido, Sudáfrica y en países sudamericanos, particularmente Brasil. En este último, el 69,4% de los virus analizados correspondían a la variante P.2 y en Sudáfrica el 94,5% lo eran de la variante B.1.351. A partir del día 28 tras la dosis única del esquema vacunal, la eficacia para los de 18 a 64 años y para los de 65 o más llegó al 65,1% (IC 95% 53-74) y al 74,0% (IC 95% 34-91). Para los casos graves, a partir del día 28, fue del 85,4% (IC 95% 54-97) para todas las edades²⁰⁸.

Vacunas NO aprobadas en Europa y EE. UU

- La vacuna Sputnik-V, Instituto de Investigación Gamaleya

La vacuna Sputnik-V, desarrollada por el Instituto ruso de Investigación de Gamaleya (Rusia), consiste en la utilización de dos adenovirus (Ad5 y Ad26) como

vectores de un antígeno S del SARS-CoV-2²⁰⁹. Los ensayos de la fase III se realizaron con 40.000 individuos. Se obtuvieron buenos resultados de efectividad y se aprobó en Rusia el 28 de diciembre del 2020.

- Novavax. NVX-CoV2373

Está compuesta por la proteína de la espícula de forma íntegra. Se obtiene mediante técnicas recombinantes en baculovirus, infectante de células de insecto *Spodoptera frugiperda*. Como adyuvante tiene una saponina Matrix-M1. El esquema de vacunación son 2 dosis con un intervalo de separación de 21 días entre ambas. La vacuna presenta un buen perfil de seguridad y produce respuestas de anticuerpos neutralizantes mayores a los de los convalecientes. Tiene la capacidad de inducir respuestas celulares con perfil de citoquinas Th1. Las condiciones de almacenamiento son las habituales (2-8 °C). Se llevó a cabo un estudio con 7.500 voluntarios en el Reino Unido, los participantes que recibieron la vacuna eran mayores de 18 años y un 25% de ellos con 65 años o más. Su efectividad global con dos dosis frente a enfermedad en cualquiera de sus manifestaciones clínicas fue del 89,3%²¹⁰. Para la cepa de Wuhan original fue de 95,6% y para la variante B.1.1.7 fue del 85,6%. Los datos obtenidos en la fase I/IIa/b en Sudáfrica en 2.199 voluntarios, 30% con infección por VIH, y con una circulación de la variante B.1.351 por encima del 90%, mostraron que la infección previa por la cepa primitiva no protegía frente a esta variante, pero en los vacunados, independientemente de su status basal respecto al VIH, la eficacia llegó al 50,4%. La eficacia para las personas VIH negativos alcanzó el 60,1%. La eficacia específica para la variante B.1.351 llegó al 49,4%²⁰⁹.

La fase III del ensayo clínico en los Estados Unidos y en México se inició hace unos meses aún no hay resultados concluyentes.

- CoronaVac (Sinovac)

Es una vacuna desarrollada en China por Sinovac Biotech, Ltd. Está compuesta de virus inactivado. Se ha probado en simios y ha mostrado una protección parcial o completa contra el SARS-CoV-2^{211,212}. En los ensayos clínicos de fase I/II realizados en septiembre 2020, la farmacéutica comunicó resultados

obtenidos en adultos sanos de 60 años o más. La tasa de seroconversión de los individuos de edad avanzada fue comparable con el grupo de personas sanas de 18 a 59 años. En los ensayos de fase III se incluyeron 24.000 personas en Indonesia, Brasil y Turquía. Además, se empezó con la inclusión en los ensayos de menores de 18 años. Los datos están pendientes de publicación.

- CTII-nCoV

Esta vacuna se ha desarrollado en una empresa china llamada CanSino Biologics, ha sido posible gracias a la colaboración de la Academia de Ciencias Médicas Militares. Se basa en el uso de un adenovirus denominado Ad5 como vector.

Los resultados de los ensayos de la fase II demostraron que la vacuna producía respuestas significativas de anticuerpos neutralizantes²¹². Una sola inyección de la vacuna vectorizada por Ad5 generó respuestas inmunológicas específicas comparables a la glicoproteína de la espícula en el día 28, en el 95% de los individuos.

Se observaron respuestas específicas de células T en el 90% participante que recibieron la vacuna²¹². Se descubrió que, en comparación con la población más joven, las personas de edad avanzada tenían una respuesta inmunológica significativamente menor, pero una mayor tolerabilidad, a dicha vacuna. La inmunidad preexistente al vector Ad5 y el aumento de la edad podrían obstaculizar parcialmente las respuestas inmunitarias específicas a la vacunación, en particular las respuestas inmunitarias humorales. Los eventos adversos más comunes fueron fiebre, agotamiento, cefalea o dolor local. El 25 de junio 2020, el ejército chino aprobó la vacuna por un año para el uso en sus militares²¹².

Tabla 2. Vacunas aprobadas en Europa y EEUU

VACUNA	EFICACIA	EDAD	Nº DOSIS	CONSERVACIÓN
BioNTech/Pfizer BNT162b2	95%	>16	2 (Intervalo 21 días)	-70° C
Moderna mRNA-1273	94%	>18	2 (Intervalo 28 días)	-20° C
AstraZeneca & Oxford University (formerly AZD1222, ChAdOx1 nCoV-19)	62-90%	>18	2 (hasta 12 semanas separadas)	2-8° C
Johnson&Johnson Ad26.COV2.S	67%	>18	1	2-8° C

Fuente: Elaboración propia

IV. JUSTIFICACIÓN

La detección de infecciones virales pasadas mediante la búsqueda de anticuerpos de una persona infectada ha sido y sigue siendo uno de los objetivos más importantes en la lucha contra la Pandemia ¹²². Las pruebas de anticuerpos son polivalentes y de gran importancia para determinar la seroprevalencia, la exposición previa al virus e incluso identificar donantes humanos altamente reactivos para la generación de plasma humano convaleciente para su uso terapéutico²¹³. Además, estas determinaciones apoyan el rastreo y la detección de contactos de los profesionales sanitarios para identificar a los que pueden presentar inmunidad. Saber cuántas personas realmente se infectaron, cuántas son asintomáticas o en cuántas personas escapó el virus al diagnóstico de RT-PCR entre nuestro colectivo durante los primeros meses de la pandemia, y por qué razones, son algunas de las preguntas que se pretenden responder con éste trabajo.

El Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (HCDGU) es un hospital militar adscrito a la Comunidad de Madrid que atiende a pacientes tanto de ISFAS (Instituto Social de las Fuerzas Armadas) como del SERMAS (Servicio Madrileño de salud). Durante la pandemia, además del personal destinado en el hospital (militar o civil), se han incorporado militares procedentes de otras unidades (cuarteles, bases, etc.) para dar apoyo durante esta crisis sanitaria.

Todo este personal que ha prestado sus servicios durante la pandemia, es uno de los colectivos más afectados, con un riesgo elevado de contraer la infección, debido a la alta incidencia de COVID19 en el hospital.

El personal que desarrolló infección asintomática pudo transmitirlo de modo inadvertido a los pacientes que atendió, contribuyendo, de este modo, a mantener la epidemia en población más vulnerable. Esto es especialmente sensible en nuestro hospital porque además de lo anteriormente citado, aquellos en condición de comisionados regresaron a sus unidades de origen pudiendo generar un nuevo foco de infección y favoreciendo la propagación del virus, lo que podría comprometer la operatividad, tanto en el territorio Nacional como en Zona de Operaciones (Misiones Internacionales) de estas unidades que se vería

afectada en caso de un brote. Debe considerarse que gran parte del personal que ha prestado sus servicios no reside en Madrid, por lo que el control de este personal es fundamental para evitar la propagación del virus a otras comunidades autónomas.

Por todo ello es conveniente la valoración de su situación infectiva e inmunológica.

Además, al tratarse de un nuevo virus, se puede considerar que la totalidad de la población a estudio carecía de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 (Ac) antes de la pandemia. Esta situación *náïve* es ideal para hacer un estudio serológico en personal de riesgo, como lo es el personal del HCDGU. La detección de anticuerpos (SARS-CoV-2 IgG) debería ayudar a identificar a aquellos que ya podrían estar inmunes y puedan atender a pacientes infectados, minimizando el riesgo de propagación del virus. Esto, hasta el momento, no está del todo claro, existe evidencia científica para pensar que un elevado número (aprox. 70%) de los pacientes desarrollan anticuerpos protectores^{24,39}. No obstante, esta circunstancia debe tomarse con cautela cuando se traslada a la población en general y a los diferentes colectivos, incluyendo los profesionales sanitarios, ya que no hay suficientes estudios que lo avalen.

La situación óptima epidemiológica de un individuo sería IgM- IgG+ PCR-, pues no portaría el virus y sería, probablemente, inmune por haber sufrido ya la infección y que esto se mantuviera por mucho tiempo sería lo ideal.

Un año después del descubrimiento de la COVID-19, varias vacunas han sido aprobadas y autorizadas para su uso¹⁸⁹. Actualmente un porcentaje elevado de los profesionales sanitarios están vacunados y se pretende que la población general este vacunada en su totalidad en pocos meses.

Los casos graves de esta enfermedad, así como las defunciones de los pacientes de riesgo van disminuyendo. No existen analogías para describir el desarrollo de la vacuna para la COVID-19. No hay duda de que, al crear vacunas frente al SARS-CoV-2 en un tiempo récord, la ciencia nos ha dado una lección de

lo que puede lograr. Hasta el momento actual, es una incógnita la duración de la presencia de los anticuerpos y su significado, tanto para los anticuerpos generados de forma natural después de pasar la infección como para los generados después de la vacunación, por lo que el seguimiento de estos pacientes resulta de especial interés. Es por ello el objeto de este estudio, para ahondar en el conocimiento del estado inmunitario del personal sanitario del HCD.

V. HIPÓTESIS

Para este trabajo, partimos de los siguientes supuestos:

1. La seroprevalencia de la COVID-19 en el personal del HCDGU (el porcentaje de trabajadores con presencia de anticuerpos tras haber padecido la infección) durante la primera ola de la pandemia se corresponde a las estadísticas publicadas a nivel nacional e internacional, es decir entre un 10-20%.
2. La inmunidad frente a SARS-CoV-2 se mantiene, al menos, el mismo tiempo (2 años) que se ha demostrado en otros coronavirus (SARS y MERS).
3. La inmunidad desarrollada por el personal del HCDGU tras su vacunación tiene una duración similar a la generada de forma natural tras haber padecido la infección.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Evaluar la situación infectiva y la inmunidad adquirida frente al SARS-CoV-2 en personal que trabaja en el HCDGU en los primeros 3 meses de la pandemia.

2. Objetivos secundarios

Conocer la evolución del estado inmunológico en aquellas personas que hayan desarrollado inmunidad tras haber padecido la infección (en los cuales se hayan detectado anticuerpos contra SARS-CoV-2) durante un periodo de 9 meses.

Conocer la evolución del estado inmunológico después de la vacunación valorando si hay diferencias en función de haber padecido o no la COVID-19 durante un periodo de 7 meses.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño

1. Estudio observacional descriptivo transversal sobre la situación infectiva (sí o no infectado en un momento determinado) y sobre el estado inmunológico frente al SARS-2 (sí o no presencia de anticuerpos).
2. Estudio prospectivo longitudinal, se trata del seguimiento del estado inmunológico de un grupo de sujetos (los que desarrollaron anticuerpos frente al SARS-CoV-2) a lo largo del tiempo, durante un periodo de seguimiento de tres meses.
3. Estudio de cohortes prospectivo con el fin de evaluar el estado inmunológico del personal del HCDGU tras su vacunación enfrentando un grupo que ha sufrido la enfermedad y otro que no la ha sufrido.

2. Población a estudio

Se incluye en el estudio a todo el personal que preste servicios en el HCDGU destinado o que haya sido comisionado en este con motivo de la pandemia.

El HCDGU es un hospital militar situado en el barrio de Aluche (distrito de Latina, Madrid), en el antiguo término de Carabanchel. Gracias a un convenio de colaboración entre el Ministerio de Defensa y la Comunidad de Madrid, este se encuentra plenamente integrado en el Sistema Sanitario Público desde 2011, siendo el hospital de referencia de los barrios de Carabanchel y Aluche. Atiende a una población de 125.000 habitantes según datos del Observatorio de resultados del Servicio Madrileño de Salud²¹⁴. Dispone de 450 camas de hospitalización con los servicios médicos y quirúrgicos habituales y una unidad de cuidados intensivos de 16 camas polivalentes. La plantilla del hospital está compuesta por personal militar y civil.

3. Período de estudio

La recogida de datos transversales y longitudinales se realizó en el periodo comprendido entre el 24 abril de 2020 y el 15 de septiembre de 2021.

4. Selección de la muestra

Se empleó un muestreo de conveniencia. Se ofreció la participación voluntaria en el estudio a todos aquellos que cumplieron los criterios de selección que a continuación se detallan.

5. Tamaño muestral

5.1. Estudio transversal

Corresponde a un tamaño muestral de 2754 sujetos que trabajaron en el HCDGU durante la pandemia.

5.1.1. *Criterios de inclusión*

Trabajadores del HCDGU y comisionados, sin límite de edad y de ambos sexos.

5.1.2. *Criterios de exclusión*

Personal que no diera su consentimiento para ser incluido en dicho estudio.

5.2. Estudio prospectivo

Se reclutaron 168 trabajadores del HCDGU que presentaban anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) frente a SARS-CoV-2.

5.2.1. *Criterios de inclusión*

Trabajadores que resultaron tener anticuerpos IgG frente al SARS-CoV-2 en el estudio transversal. Sin límite de edad y de ambos sexos

5.2.2. *Criterios de exclusión*

Personal que no diera su consentimiento para ser incluido en dicho estudio. Dada la dificultad de seguimiento de los comisionados, se les excluyó del estudio prospectivo.

5.3. Estudio de cohortes

Corresponde a un tamaño muestral de 122 trabajadores del HCDGU vacunados con Pfizer-BioNTech BNT162b2. (58 que han padecido la COVID-19 vs 64 que no han sufrido la enfermedad)

5.3.1. *Criterios de inclusión*

Trabajadores vacunados con Pfizer (esquema de vacunación completo con 2 dosis). Sin límite de edad y de ambos sexos.

5.3.2. *Criterios de exclusión*

Personal que no diera su consentimiento para ser incluido en dicho estudio.

6. Variables a estudio

6.1. Variables

1. Resultado de RT-PCR en exudado nasofaríngeo (cualitativa dicotómica): **positivo** (existe amplificación de genoma viral) o **negativo** (No hay amplificación).
2. Resultado de la determinación de anticuerpos IgG antinucleocápside en suero o plasma (cualitativa dicotómica): **positivo** (se detectan anticuerpos IgG antinucleocápside) o **negativo** (no se detectan anticuerpos IgG antinucleocápside)
3. Resultado de la determinación de anticuerpos IgG anti-spike de unión al receptor (RBD) en suero (cuantitativa continua): valores de concentración de anticuerpos expresados en unidades internacionales de anticuerpo de unión por mililitro establecidas por la OMS²¹⁵ (BAU/ml)
4. Riesgo de exposición (cualitativa ordinal): grupo 1 (elevada exposición), grupo 2 (exposición moderada) y grupo 3 (exposición baja)
5. Tiempos de determinación de anticuerpos IgG antinucleocápside (cuantitativa discreta): tiempo en mes entero en el momento de la toma de muestra (3, 6 y 9).
6. Tiempos de determinación de anticuerpos IgG anti-spike (cuantitativa discreta): tiempo en meses entero en el momento de la toma de muestra (1, 3, 5 y 7).

6.2. Otras variables

1. Fiebre (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF (Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa).
2. Cefalea (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF.
3. Mal estar general (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF.
4. Tos (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF.
5. Pérdida de olfato (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF.
6. Pérdida de gusto (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, siempre referido en la encuesta epidemiológica realizada por el IMPDEF.
7. Formación COVID (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, en función de su participación en charlas y cursos de formación referente al uso de equipos de protección individual y prevención frente al SARS-CoV-2.
8. Edad (cuantitativa discreta): años cumplidos en el momento del estudio
9. Sexo (cualitativa dicotómica) : hombre o mujer
10. Militar (cualitativa dicotómica): **si** o **no**
11. Civil (cualitativa dicotómica): **si** o **no**
12. Ha padecido la COVID-19 (cualitativa dicotómica): **si** o **no**, en función de si se tiene conocimiento de haber sufrido la enfermedad.

7. Material

- Sistema informático INFINITY: subsistema departamental que da soporte a los procesos más específicos y especializados del

laboratorio y permite la validación de resultados y realización de informes microbiológicos.

- Encuesta epidemiológica elaborada por el Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa (IMPDEF) en colaboración con el Servicio de Microbiología y parasitología del HCDGU.(anexo 1)
- 50 muestras de Plasma/suero congelado archivado de 2018 procedente del Centro de Transfusiones de las Fuerzas armadas (CTFAS) (sueros pre pandémicos)
- Toma de muestras :
 - Hisopo nasofaríngeo en tubo UTM para transporte de virus. Incluye antibióticos que inhiben el crecimiento de las bacterias y hongos, asegura la idoneidad en la recuperación de la muestra.
 - Tubo de tapón rojo de 10ml para serología.
- Tubos de muestra 1.5ml (Eppendorf RCBioscience® sample tube)
- Puntas desechables con filtro de 1000 µL
- Puntas desechables con filtro de 200 µL.
- Pipetas pasteur
- Placas de elución: Deep Well Plate 96 (DWP96)
- Placas de PCR BioRad®
- Pipeta automática para suministrar volúmenes de 5-40 µL
- Pipeta automática para suministrar volúmenes de 20-200 µL
- Pipeta automática para suministrar volúmenes de 100-1000 µL
- Congelador (-20°C) para conservación de los reactivos.
- Gradillas
- Film sellador (Microseal® BioRad) de PCR
- Vortex
- Citocentrífuga
- Centrífuga de seguridad

- EPI individuales: guantes desechables y mascarilla quirúrgica o FFP2 (especialmente recomendada para el procedimiento de inactivación de las muestras).
- Reactivos:
 - Etanol absoluto
 - Lejía diluida al 10%,
 - Acetilcisteína
 - Reactivos para inactivación de muestras : Buffer AVL (tiocianato de guanidina)
 - Reactivos para la extracción: STARMag 96x4 viral DNA/RNA 200C kit, cartucho202, bolitas magnéticas, proteinasa K, reactivos de lavado, carrier y control interno.
 - Reactivos de RT-PCR: Para la amplificación del ARN se utilizó el kit Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seúl, Corea del Sur) y el kit qCOVID-19 (Genómica, Madrid, España):
 - 2019-nCoV MOM
 - Rnasa free Water
 - 5x Buffer + Enzyme Mix
 - 2019-nCoV PC (Control positivo).
 - RP-V IC (Control Interno)
 - Reaction mix-1
 - Reaction mix-2
 - RT-Enzyme
 - RT-PCR mix
 - Control positivo mix-1
 - Control positivo mix-2
 - Agua PCR
 - Reactivos SARS-CoV-2 IgG Reagent (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)
 - Reactivos SARS-CoV-2 IgG Calibrator Kit(Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)

- Reactivos SARS-CoV-2 IgG Control Kit (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)
- Reactivos SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)
- Reactivos SARS-CoV-2 IgG II Quant Calibrator Kit (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)
- Reactivos SARS-CoV-2 IgG II Quant Control Kit (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU)
- Solución preactivadora
- Solución activadora
- Solución de lavado
- Equipos de extracción:
 - Nimbus Microlab seegene (Hamilton Company, Bonaduz, Suiza) (Figura 13).
 - MagCore HF16 (RBC bioscience, Taipei, Taiwán) (Figura 14).
- Equipo de amplificación: Termociclador CFX 96 Real-time System (Figura 15).
- Equipo Architect i System (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU) (Figura 16)

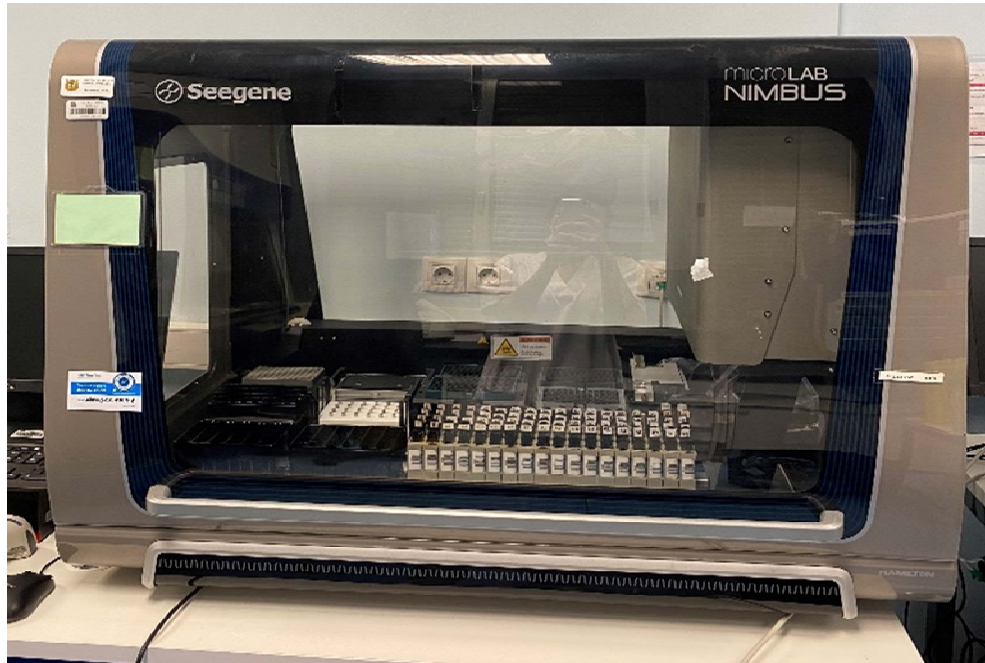


Figura 13. Nimbus Microlab Seegene. Servicio de Microbiología. HCDGU



Figura 14. MagCore HF16. Servicio de Microbiología.HCDGU



Figura 15. Analizador CFX 96 Real-time System. Servicio de Microbiología. HCDGU



Figura 16. Equipo Architect Servicio de Microbiología. HCDGU

- Sistema SPSS v25 para tratamiento estadístico: programa informático muy usado en las ciencias sociales y aplicadas.
- Acceso ilimitado a artículos de investigación y publicaciones recientes de revistas de impacto a través de la Biblioteca Virtual de la Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid.
- Utilización de programas informáticos paquete Microsoft Office Excel 1997-2003 y Word 2018 como soporte al análisis e investigación.
- Software SARS-CoV-2 Launcher: para el manejo de equipo de extracción
- Software SARS-CoV-2 Viewer: para la interpretación y visualización de resultados.
- Cuaderno de registro de muestras

8. Método

8.1. Planificación. Organización general del trabajo

8.1.1. *Estudio transversal*

Se realizó RT-PCR y detección de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 (IgG anti-nucleocápside) a todo el personal que estaba prestando sus servicios en el HCDGU durante la pandemia para evaluar la seroprevalencia y la situación infectiva de nuestros trabajadores entre el 25 de abril y el 10 de junio de 2020.

Los 2.754 sujetos fueron citados por el Servicio de Salud Laboral donde se obtuvieron dos tipos de muestras: exudado nasofaríngeo para la detección de ARN viral (RT-PCR) y un tubo de 10ml de suero para la detección de anticuerpos IgG antinucleocápside. Las muestras se procesaron en el Servicio de Microbiología.

En el momento de la extracción y de forma voluntaria cumplimentaron una encuesta epidemiológica proporcionada por el IMPDEF (Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa).

El resultado de la serología frente a SARS-CoV-2 (IgG) fue informado personalmente a todos los trabajadores por el personal de Salud Laboral una o dos semanas después de la extracción de sangre. El resultado de la PCR en caso de ser positivo se informaba el mismo día y en caso negativo dos días después de la toma de muestra.

Características epidemiológicas:

A través de la encuesta elaborada por IMPDEF se recogieron los siguientes datos: edad, sexo, categoría profesional, área de trabajo, reubicación durante la pandemia, exposición potencial al SARS-CoV-2, presencia de síntomas en los últimos dos meses, fecha de extracción de muestras, situación laboral

(militar/civil), asistencia a ciclos formativos. Este último punto es relevante porque desde el inicio de la pandemia el Servicio de Medicina Preventiva organizó ciclos formativos de asistencia voluntaria para el personal del hospital basados en formación presencial, talleres prácticos de puesta y retirada de equipo de protección individual (EPI), formación audiovisual con diferentes escenarios posibles, cartelería distribuida por todo el hospital y visitas de los preventivistas a las diferentes plantas del hospital durante la jornada laboral para aclarar posibles dudas.

Una vez obtenidos los datos de la encuesta se volcaron a una hoja de datos Excel.

A los efectos del análisis, los empleados del HCDGU se clasificaron en tres categorías o grupos según el riesgo de exposición nosocomial a la infección por SARS-CoV-2:

- Grupo 1 (Riesgo alto): trabajadores que estuvieron en contacto directo con pacientes infectados (o sospechosos de estar infectados con SARS-CoV-2), personal del Servicio de urgencias o áreas hospitalarias donde se habían ubicado a pacientes con COVID19, así como áreas de cuidados intensivos y reanimación.

- Grupo 2 (Riesgo moderado): trabajadores que tuvieron un contacto ocasional con pacientes COVID-19 (oncología, hematología, radiología, obstetricia / ginecología, y áreas médicas no relacionado con COVID-19) y aquellos trabajadores que a pesar de no estar en contacto directo con pacientes tuvieron contacto diario con muestras biológicas obtenidas de pacientes infectados, como el personal de laboratorio.

- Grupo 3 (Riesgo bajo): trabajadores que no estuvieron en contacto con el SARS-CoV-2 ni a través de pacientes ni por contacto con muestras biológicas, como el personal de administración, cocina, farmacia, seguridad, limpieza y mantenimiento.

8.1.2. *Estudio Prospectivo*

Una vez obtenidos y analizados los resultados del estudio transversal se reclutaron de forma voluntaria a trabajadores que presentaban inmunidad frente al SARS-CoV-2.

Se realizaron extracciones de sangre completa mediante flebotomía en tubos separadores de suero de 10 ml en el Servicio de Salud Laboral del HCDGU para la detección cualitativa de anticuerpos IgG frente a la nucleocápside en el Servicio de Microbiología y Parasitología del HCDGU.

La toma de muestras se llevó a cabo trimestralmente, con un total de 3 extracciones por participante en un período de tiempo de 9 meses. Las muestras se codificaron y registraron en el programa informático del Servicio de Microbiología y Parasitología del HCDGU.

Se recogieron datos que se volcaron en una base de datos Excel: fecha de toma de muestra, edad, sexo del paciente y resultado de la determinación.

8.1.3. *Estudio de cohortes*

Se incluyó a personal del HCDGU que había sufrido la infección por SARS-CoV-2 y personal *naïve* frente al SARS-CoV-2, ambos grupos vacunados (pauta completa con dos dosis) con *Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2)* entre el 27 de enero y el 11 de febrero de 2021.

Se realizaron extracciones de sangre completa mediante flebotomía en tubos separadores de suero de 10 ml al mes, a los 3 meses, a los 5 meses y a los 7 meses post-vacunación.

La toma de muestras se realizó en el Servicio de Salud Laboral para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos post-vacunales (IgG anti-spike). Las muestras se codificaron y registraron en el programa informático y se procesaron en el Servicio de Microbiología y Parasitología.

Se recogieron datos que se volcaron en una base de datos Excel: fecha de toma de muestra, edad, sexo del paciente, cantidad de anticuerpos detectados.

8.2. Procedimientos microbiológicos

8.2.1. *Diagnóstico molecular*

La RT-PCR del virus puede realizarse en esputo, aspirados nasofaríngeos, hisopos nasofaríngeos, broncoaspirados y lavados broncoalveolares. Todas las muestras recibidas fueron hisopos nasofaríngeos recogidas en un tubo UTM específico para transporte de virus.

Antes de su procesamiento las muestras se sometieron a un pre-tratamiento para su inactivación, según recomendaciones científicas²¹⁶. El manejo de muestras biológicas de individuos infectados con el virus SARS-CoV-2 requiere estrictas medidas de bioseguridad. Este procedimiento se llevó a cabo dentro del laboratorio de Bioseguridad Nivel-2 (BSL-2), se utilizó la cabina de bioseguridad tipo II.

En nuestro caso se utilizó buffer AVL (QiaGen) como solución de inactivación (tiocianato de guanidina) en proporción 1:1 (200 μ L de muestra/medio de transporte+200 μ L de AVL), esta mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la correcta inactivación de las muestras.

De este modo se redujo la propagación del virus, la contaminación de superficies y la transmisión del mismo en los trabajadores que manipulan las muestras. En la literatura estaban descritas varias técnicas de inactivación química y física empleadas contra aislados de SARS-CoV-2²¹⁶. Los datos reportados en diferentes artículos publicados demostraban que todos los métodos químicos (AVL, tampón de muestra inactivante y formaldehído) y de tratamiento térmico

(56°C y 98°C) conseguían muestras con cargas virales elevadas completamente inactivadas de hasta $5 \log_{10}^{217}$.

Una vez inactivadas las muestras, se utilizaron 2 tipos de extractores automáticos para la obtención del ARN viral: MagCore HF16 (RBC bioscience, Taipei, Taiwán) y Nimbus Microlab Seegene (Hamilton Company, Bonaduz, Suiza). La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa en las técnicas de biología molecular.

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial, pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico diana. Esto se realizó en ambos equipos mediante un reactivo denominado Proteinasa K cuya función es inducir una digestión enzimática que rompe proteínas facilitando la liberación del material genético, además es necesario inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células, lo cual se lleva a cabo gracias a bolas magnéticas (sílice), a las soluciones de lavado y el carrier, que aumenta la sensibilidad de la extracción en muestras con menos carga viral.

Se utilizó un volumen total de 400 μL de muestra inactivada, el volumen de eluido obtenido (ARN Vial) fue de 60 μL que posteriormente se utilizó para la realización de la PCR. El MagCore tiene la capacidad de procesar 16 muestras a la vez en un tiempo de 60 min, mientras que el Nimbus puede procesar hasta 74 muestras a la vez en un tiempo máximo de 2.45h con el equipo al completo.

La eficiencia de la amplificación se ve reducida con frecuencia por inhibidores presentes en muestras clínicas. Por lo tanto, el Control Interno (CI) se incorporó en el producto como un control exógeno para controlar la extracción del ácido nucleico y comprobar una posible inhibición posterior de la PCR.

Para la amplificación del ARN se utilizaron dos plataformas de RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa de distintos genes del SARS-CoV-2:

El kit Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seúl, Corea del Sur), que detecta tres dianas: el gen *E* (específico del subgénero *Sarvecovirus*), el gen *RdRP* y el gen *N* (ambos específicos del SARS-CoV-2). Este kit incluye oligonucleótidos y mezclas de sondas específicas del SARS-CoV-2 y pueden ser detectados a través del canal FAM, Cal Red 610 y Quasar 670. La sonda de control interno puede detectarse en el canal HEX²¹⁸.

El segundo kit que se precisó por problemas de abastecimiento con el primero debido a la elevada demanda de este a nivel nacional e internacional fue qCOVID-19 (Genómica, Madrid, España).

La prueba qCOVID-19 (Genómica, Madrid, España) es un kit de RT PCR multiplex a tiempo real para la detección cualitativa del gen *N* (mix-1) y el gen *ORF1ab* (mix-2) del SARS-CoV-2. El kit incluye al igual que el anterior oligonucleótidos y mezclas de sondas específicas del SARS-CoV-2 y pueden ser detectados a través del canal FAM. La sonda de control interno en esta ocasión puede detectarse en el canal VIC.

Las dos técnicas (qCOVID-19 y Allplex 2019-nCoV) se llevaron a cabo en tres áreas separadas físicamente, con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

- 1. Área de Pre-PCR de preparación de los tubos/placa de amplificación:** En éste área se preparó la mezcla (mastermix) de reactivos en los tubos/placa de amplificación, siempre en cabina de bioseguridad tipo II de PCR.
- 2. Área Pre-PCR de adición del material extraído:**
En este lugar se añadió el ARN extraído a los tubos/placa de amplificación a los que previamente se les había incorporado la mastermix.
- 3. Área de Post-PCR:**
En éste área tuvo lugar la amplificación y visualización del producto de amplificación. Se ha de evitar que el material del área

de Post-PCR entre en contacto con el del área de Pre-PCR, por lo que se recomienda no entrar en las áreas de Pre-PCR tras trabajar en Post-PCR.

Cada área disponía de su propio material independiente (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.). Se limpiaba en profundidad las áreas de trabajo empleadas (poyata, cabinas, gradillas, pipetas), con lejía diluida al 10%, después de procesar cada tanda de muestras.

La detección en ambos casos se realizó (RT PCR multiplex a tiempo real) en un solo paso: La transcripción inversa (RT) y la amplificación del cADN ocurre en un único tubo de reacción.

En ambos kit se utilizó un control positivo que indica que la Taq polimersa, los oligonucleótidos y las sondas de SARS-CoV-2 funcionan correctamente y un control negativo (agua libre de RNasas/DNasas) que indica ausencia de contaminación.

Todo el proceso consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, cada uno de ellos generalmente consta de 2-3 pasos a diferentes temperaturas denominado perfil térmico el cuál es específico de cada kit comercial: Allplex 2019-nCoV (Figura 17) y qCOVID-19 (Figura 18); se llevó a cabo en un sistema de detección automatizado (termociclador CFX96™) el cual repitió el proceso de amplificación durante 44 ciclos utilizando ambos kit para poder detectar el cADN viral.

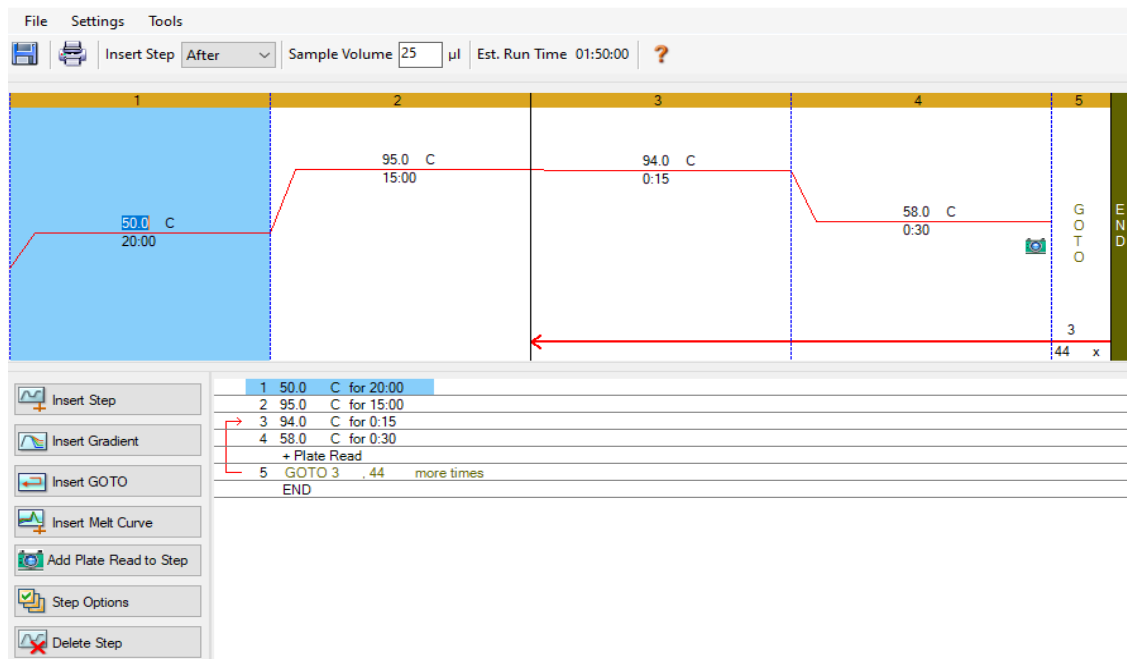


Figura 17. Perfil térmico Allplex 2019-nCoV. Servicio de Microbiología. HCDGU

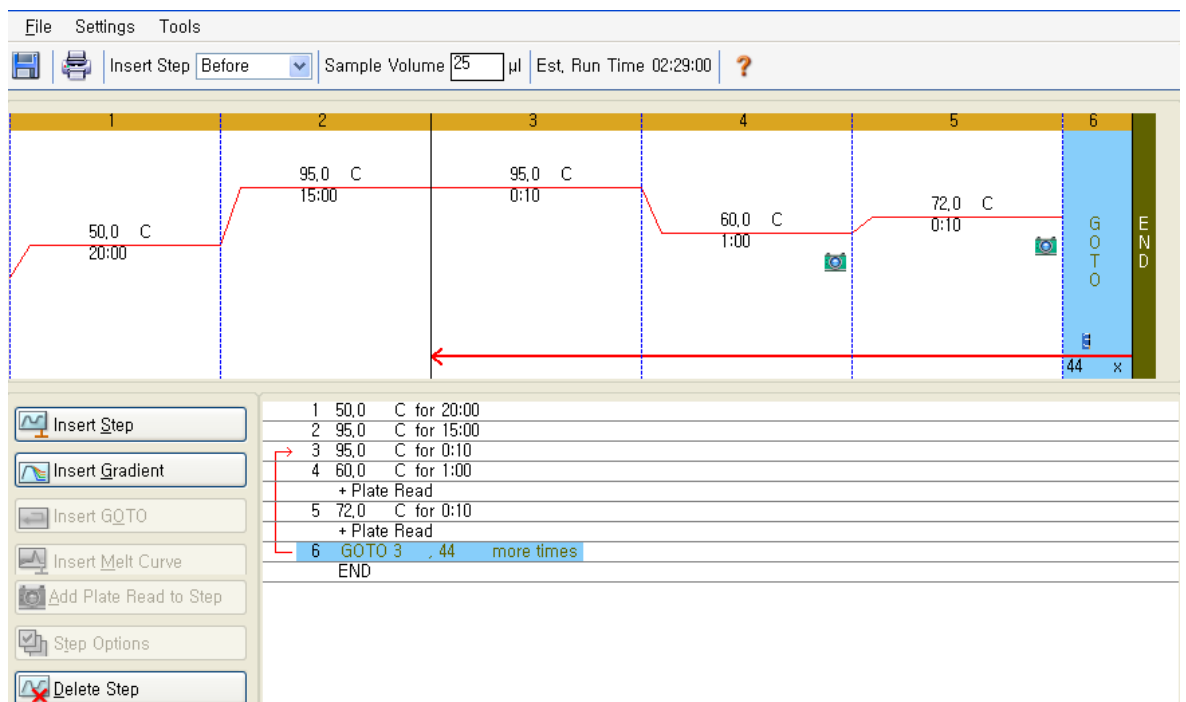


Figura 18. Perfil térmico qCOVID19. Servicio de Microbiología. HCDGU

Se consideró “resultado negativo” cuando no se detectaba ninguno de los genes; resultado “no concluyente” cuando solo se detectaba uno de los genes (gen *N* o el gen *ORF1ab*) utilizando el kit qCOVID-19 (Genómica, Madrid, España), o se detectaba solo el gen *E* usando el kit Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seúl, Corea del Sur).

El “resultado positivo” correspondía a la detección de los dos genes (gen *N* y el gen *ORF1ab*) con el kit qCOVID-19 o a los tres genes simultáneamente (gen *E*, el gen *RdRP* y el gen *N*) *fig 16*, o dos de ellos (gen *RdRP* y el gen *N*) o uno solo, siempre que no fuese el gen *E*, utilizando el kit Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seúl, Corea del Sur).

Ambos kits se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, tanto para el manejo como para la interpretación de los resultados.

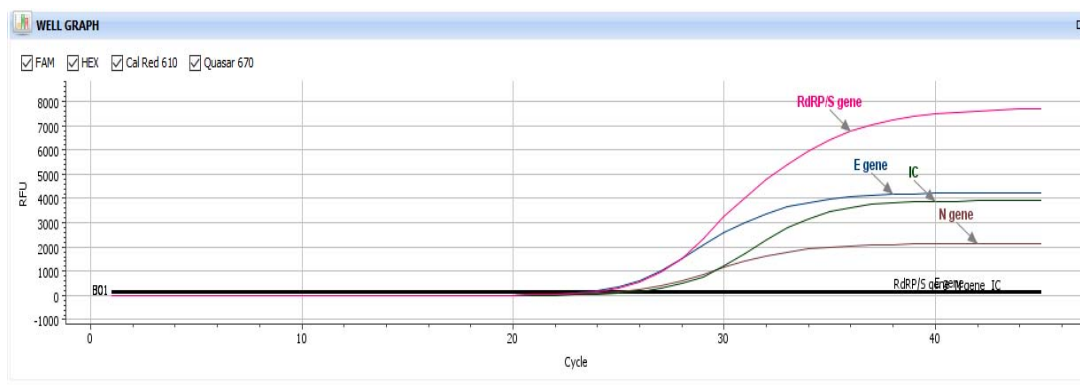


Figura 19. Positivo (Allplex 2019-nCoV) Servicio de Microbiología. HCDGU

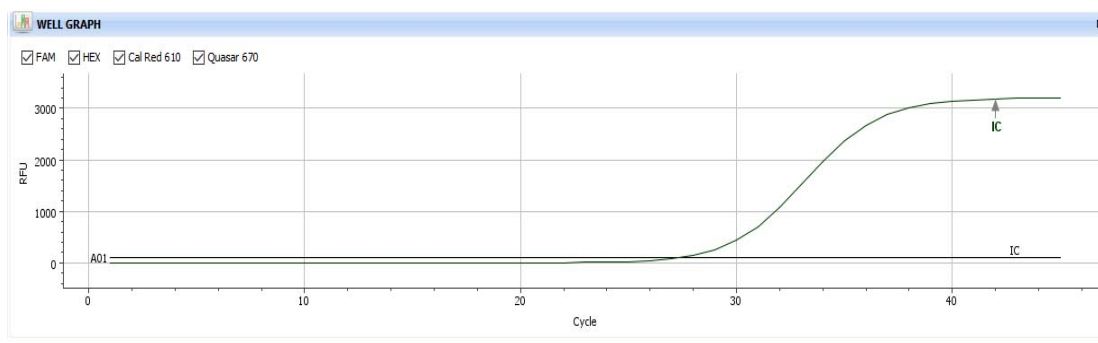


Figura 20. Negativo (Allplex 2019-nCoV) Servicio de Microbiología. HCDGU

8.2.2. Diagnóstico serológico

a. Detección de anticuerpos IgG anti-nucleocápside

Para la elección del método utilizado para la determinación de anticuerpos en pacientes de HCDGU, se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología un estudio de comparación de técnicas diagnósticas publicado recientemente²¹⁹, en el cual se utilizaron como “muestras control” sueros archivados del 2018 que fueron proporcionados por el CTFAS, es decir, sueros pre-pandémicos. En dicho estudio concluimos que los ensayos de quimioluminiscencia eran los de mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otras técnicas serológicas disponibles en el mercado, a pesar de no existir un “*Gold standard*” para dicha determinación.

La prueba de SARS-CoV-2 IgG escogida es un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para la detección cualitativa de anticuerpos IgG frente al virus del SARS-CoV-2: SARS-CoV-2 IgG (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU).

Dicho ensayo está diseñado para detectar anticuerpos IgG frente a la proteína de la nucleocápside. El fabricante comunica una sensibilidad del 86,4% después de 7 días desde inicio de los síntomas y 100% después de 14 días, y una especificidad de 99,6%, utilizando RT-PCR como “*Gold standard*”.

Se centrifugaron todos los tubos a 3.500rpm durante 10 minutos antes de su procesamiento, repitiendo la centrifugación en aquellas muestras que se apreciaba restos de fibrina, eritrocitos u otras partículas en suspensión con el fin de asegurar la reproductibilidad de los resultados. Se utilizaron 100 µl de suero para realizar la determinación.

La prueba está automatizada y se realizó en el equipo ARCHITECT i System (Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU). Una vez introducidas las muestras en el equipo cada una de ellas se mezcla y se incuba (36,4°C a 37,6°C) junto con las micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígeno del SARS-

CoV-2 y el diluyente del ensayo. Los anticuerpos frente al SARS-CoV-2 presente en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas de antígeno del SARS-CoV-2. Se lava la mezcla y después se añade el conjugado de anticuerpos anti-IgG humana (monoclonal, de ratón) marcado con acridinio para crear la mezcla de reacción y se incuba (36.4°C a 37.6°C). Tras un ciclo de lavado, se añaden las soluciones preactivadora y activadora.

Al finalizar todo el proceso se genera una reacción quimioluminiscente que se mide en unidades relativas de luz (URL).

Existe una relación proporcional²²⁰ entre la presencia de anticuerpos IgG frente al virus SARS-CoV-2 en la muestra y las URL detectadas por el sistema óptico. Esta relación se refleja en el Index (S/C) calculado, un índice muestra/punto de corte. La presencia o la ausencia de anticuerpos IgG frente al virus SARS-CoV-2 en la muestra se determina comparando las URL quimioluminiscentes presentes en la reacción con las URL del calibrador.

El punto de corte corresponde a un Index (S/C) de 1.4 (≥ 1.4 Positivo; <1.4 Negativo). Este ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

b. Detección de anticuerpos IgG anti-spike

Se utilizó el ensayo SARS-CoV-2 IgG II Quant diseñado para detectar las inmunoglobulinas de clase G (IgG) frente a la región de la subunidad S1 de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, que se une al receptor (RBD, receptor-binding domain). Estas inmunoglobulinas se han correlacionado con la presencia de anticuerpos neutralizantes²²¹ generados gracias a la vacunación, los cuales confieren efecto protector al individuo frente a la infección.

Al igual que en la técnica anterior se centrifugaron todos los tubos a 3500rpm durante 10 minutos antes de su procesamiento, se repitió la centrifugación en aquellas muestras que se apreciaba restos de fibrina, eritrocitos u otras partículas en suspensión con el fin de asegurar la

reproductibilidad de los resultados. Se utilizaron 100 μ l de suero para realizar la determinación, tras su centrifugación.

Este ensayo también es un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG frente al virus SARS-CoV-2 en suero, para el que se utilizó el mismo equipo anteriormente descrito.

El ensayo SARS-CoV-2 IgG II Quant utiliza un método de cálculo de datos de ajuste a una curva logística de 4 parámetros para generar la calibración y obtener los resultados cuantitativos expresados en unidades de anticuerpo por mililitro (AU/ml).

El punto de corte establecido por la casa comercial es 50.0 AU/mL (\geq 50.0 AU/mL Positivo; $<$ 50.0 AU/mL Negativo), con la cuantificación lineal de los resultados detectados de 50 a 40.000 AU/ml.

La conversión expresada en unidades internacionales de anticuerpo de unión por mililitro establecidas por la OMS²¹⁵ (BAU/ml) sigue la siguiente ecuación: $BAU/mL = 0.142 \times AU/mL$.

8.3. Análisis estadístico

8.3.1. *Estadística descriptiva*

Como índices de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas se empleó la media aritmética y la desviación estándar \bar{x} (DE) o la mediana y el rango intercuartílico Md(IQR), dependiendo de la asunción o no, respectivamente, del supuesto de la normalidad determinado mediante el test de Kolmogorof-Smirnov (K-S).

Para las variables categóricas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

Como representaciones gráficas se usaron los diagramas de barras, para variables categóricas; y los de barras de error o de cajas, para variables cuantitativas que asuman o no, respectivamente, el supuesto de la normalidad. También se emplearon para estas últimas, diagramas de dispersión.

8.3.2. *Estadística analítica*

La medida de asociación entre dos variables categóricas se efectuó mediante la χ^2 de Pearson, o la prueba exacta de Fisher si ambas fueran dicotómicas, en cuyo caso la valoración del efecto se realizó mediante la estimación del riesgo (RR, para estudios de cohortes y RP, para estudios transversales), y su precisión con su intervalo de confianza del 95%.

Para determinar la asociación entre una variable independiente dicotómica y dependiente cuantitativa de distribución paramétrica (K-S o S-W) se empleó el test t de Student para muestras independientes o para muestras dependientes. Se valoró el efecto mediante la diferencia de medias, y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95%. Si la variable dependiente vulnerara el supuesto de la normalidad se empleó el test U de Mann Whitney, para muestras independientes; o el test de Wilcoxon para muestras apareadas. La medida del efecto se valoró en ambos casos mediante la diferencia de las medianas.

Para la medida de asociación entre una variable politómica de medidas repetidas se empleó el test de Friedman. Las comparaciones múltiples se efectuaron mediante el test de Wilcoxon, previa corrección del nivel de significación estadística según el número de comparaciones.

Para determinar la relación entre dos variables cuantitativas se empleó la Rho de Spearman con el correspondiente coeficiente de correlación (r).

En todos los casos, como grado de significación estadística se empleó un valor de $p < 0,05$ y la aplicación estadística será el paquete SPSS® versión 25.

VIII. RESULTADOS

1. Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico):

1.1. Descripción general

En este estudio se incluyeron a 2754 trabajadores del HCDGU reclutados entre el 25 de abril 2020 y el 10 de junio de 2020.

La media de edad fue de 45 años (DE 12). El 60,2% (N=1659) fueron mujeres y el 39,8% (N=1095) eran varones. El 26,7% (N=734) era personal perteneciente a las Fuerzas Armadas y el 73,3% (N=2020) era personal civil (Tabla 3).

Del total de trabajadores incluidos en el estudio: 1250 (46,4%) fueron clasificados en el grupo 1 de exposición (Alto), 969 (35,1%) fueron asignados al grupo 2 (Moderado) y 535 (19,4%) al grupo 3 (Bajo).

El porcentaje de mujeres fue más elevado en el grupo 1 seguido del grupo 2 y del grupo 3 (69,2%; 62,5% y 35,1% respectivamente; $p < 0,001$).

Un total de 1642 sujetos (59,6%) cumplieron la encuesta epidemiológica proporcionada, de los cuales 1059 (64,5%) afirmaron haber recibido formación para la prevención frente a la infección por COVID-19.

El porcentaje de sujetos que había recibido dicha formación fue diferente en ambos grupos de exposición: grupo 1: 74,5 %, grupo 2: 62,2 % y grupo 3: 44,8 % ($p < 0,001$) siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Tabla 3).

1.2. Resultados RT-PCR SARS-CoV-2

30 profesionales sanitarios tuvieron RT-PCR positiva (1,1%) en el momento del estudio, de los cuales en 20 de ellos (66,6%) también se detectaron anticuerpos IgG frente al SARS-CoV-2.

El porcentaje de sujetos con RT-PCR positiva frente SARS-CoV-2 fue similar en los tres grupos de exposición: grupo1: 1,0%, grupo 2: 1,0% y grupo 3: 1,5% ($p=0,617$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 3).

1.3. Resultados de la serología

Del total de los profesionales sanitarios ($N=2754$) se detectaron anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2 en 450 (16,3%; IC95%: 15,8-17,3). La prevalencia de anticuerpos IgG según el sexo fue similar (16,1%; IC95%: 15,5-17,4 y 15,9; IC95%: 14,1-16,8 respectivamente, $p=0,865$).

Del total de sujetos con anticuerpos tipo IgG presentes ($N=450$), 244 pertenecían al grupo 1 de exposición (19,5%), 139 sujetos al grupo 2 (14,3%) y 67 sujetos al grupo 3 (12,5%) ($p<0,001$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de exposición (Tabla 3).

En este grupo un 4,4% ($N=20$) también tenía la PCR positiva en el mismo momento. El porcentaje de sujetos con PCR positiva e IgG positiva frente SARS-CoV-2 fue similar en los tres grupos de exposición (grupo1: 3,3%, grupo 2: 5,8%, grupo 3: 5,9% $p=0,352$) (Tabla 4).

Se detectaron anticuerpos tipo IgG en 154 (14,5%) empleados de los 1060 que afirmaron haber recibido formación frente a la infección por COVID-19 y en 108 (18,6%) de 582 sujetos que no la recibieron ($p=0,035$). En general la seroprevalencia fue mayor en aquellos sin formación específica frente al SARS-CoV-2, independientemente del grupo de exposición.

Al analizar la seroprevalencia por grupos de exposición se observó que en el grupo 1 hubo diferencias estadísticamente significativas entre aquellos sujetos que habían recibido formación (16,7%) y los sujetos que no recibieron ningún tipo de formación (25,3 %) ($p=0,009$).

La prevalencia de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 en el personal militar fue ligeramente inferior que la del personal civil (15,1% y 16,7% respectivamente; $p=0,297$), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Al comparar la detección de anticuerpos IgG en personal militar y personal civil en función del grupo de exposición no hubo diferencias en el grupo 1 (18,2% y 20,0% respectivamente; $p=0,461$). En el grupo 2 sí se observaron diferencias estadísticamente significativas: se infectó un 16,6% del total de personal civil frente a un 6% del personal militar ($p<0,001$). Si bien, en el grupo 3 de exposición hubo un porcentaje mayor de personal militar en los que se detectaron anticuerpos IgG (16,7%) en comparación con el personal civil (10,2%) ($p=0,031$).

De los 450 sujetos que tenían anticuerpos tipo IgG, 263 (58,4%) habían presentado síntomas asociados a COVID-19 en los últimos 2 meses y el 41,6% eran asintomáticos.

Los síntomas más frecuentes en esta cohorte fueron fiebre (67,1%) y tos (67,1%); le siguieron en frecuencia malestar general (63,6%), dolor de cabeza (62,3%), anosmia (49,7%), ageusia (40,6%) y diarrea (39,8%) (Figura 21).

Estos mismos síntomas se observaron en 158 (64,8%) sujetos del grupo 1, 72 (51,8%) sujetos del grupo 2 y 33 (49,3%) sujetos del grupo 3 ($p < 0,001$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de exposición (Tabla 4).

Tabla 3. Resultados en base a grupos de riesgo

	Alto (N=1250)	Moderado (N=969)	Bajo (N=535)	Total (N=2754)	valor p*
IgG positivo N (%)	244 (19,5)	139 (14,3)	67 (12,5)	450 (16,3)	<0,001*
rRT-PCR positiva N (%)	12 (1,0)	10 (1,0)	8 (1,5)	30 (1,1)	0,617
Mujer N (%)	865 (69,2)	606 (62,5)	188 (35,1)	1659 (60,2)	<0.001*
Varón N (%)	385 (30,8)	363 (37,5)	347(64,9)	1095 (39,8)	
Formación N (%)	580 (74,5)	332 (62,2)	147 (44,8)	1059 (64,5)	<0.001*
Militares N (%)	383 (30,6)	166 (17,1)	185 (34,5)	734 (26,7)	<0.001*
Civiles N (%)	867 (69,3)	803 (82,8)	350 (65,4)	2020 (73,3)	

Fuente: elaboración propia

Tabla 4. Características de pacientes positivos

	Alto N (%)	Moderado N (%)	Bajo N (%)	Total N (%)	valor <i>p</i> *
Síntomas	158 (64,8)	72 (51,8)	33 (49,3)	263 (58,4)	<0,001*
RT-PCR positiva	8 (3,3)	8 (5,8)	4 (5,9)	20 (4,4)	0,352
Total por grupo	244 (54,2)	139 (30,8)	67 (14,9)	450 (100)	<0.001*

Fuente: elaboración propia

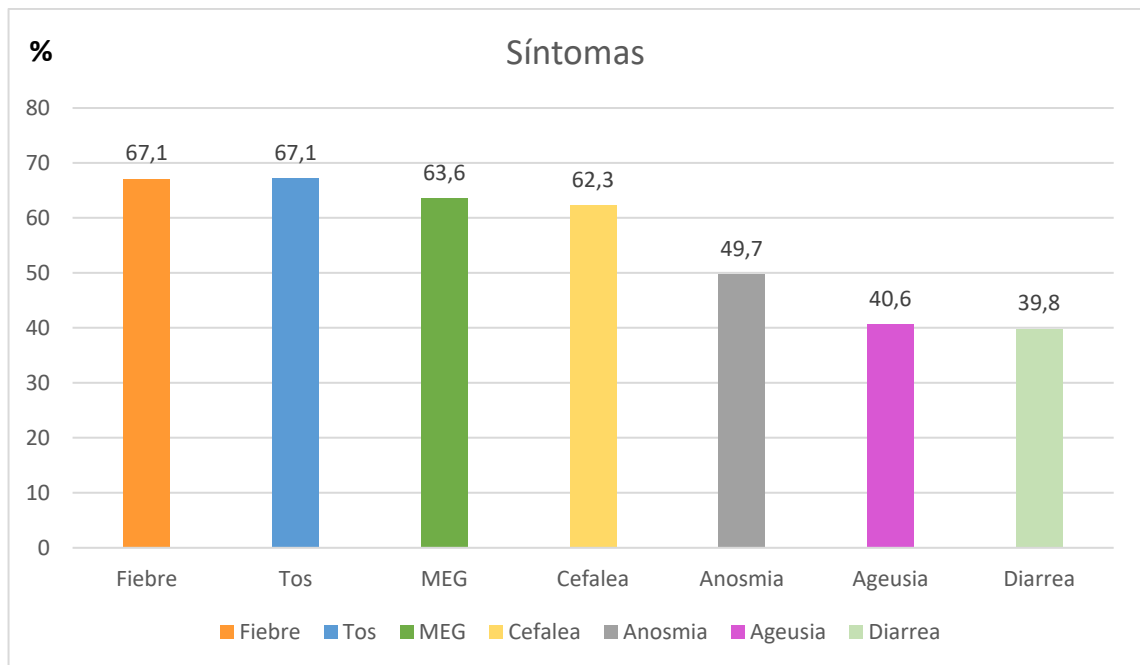


Figura 21. Síntomas más frecuentes

Fuente: Elaboración propia

2. Estudio prospectivo (evolución estado inmunológico en pacientes IgG positivos)

2.1. Descripción general

Se incluyeron 168 trabajadores del HCDGU que presentaban anticuerpos tipo IgG antinucleocápside reclutados a partir del estudio transversal. Se analizaron un total de 437 muestras procedentes de los mismos. El 76,7% (129/168) del total de participantes completaron el seguimiento de 9 meses (Figura 22).

Del total de los participantes el 67,8% (114/168) había presentado síntomas frente a COVID-19.

Del total de trabajadores incluidos en el estudio; 103 (61,3%) fueron clasificados en el grupo 1 de exposición (alto), 53 (31,5%) fueron asignados al grupo 2 (moderado) y 12 (7,1%) al grupo 3 (bajo).

El 62,5% (N=105) fueron mujeres y el 37,5% eran varones (N=63). La media de edad fue de 44 años en los varones (DE 11) Y 45 años en las mujeres (DE 13).

En global al analizar la prevalencia de anticuerpos IgG antinucleocápside en los tres controles realizados a lo largo del seguimiento, hubo una disminución estadísticamente significativa (83,3%; 52,1% y 24,0% respectivamente; $p < 0,001$) (Figura 23).

En la Tabla 5 se resumen las características de los sujetos que mantienen anticuerpos a lo largo del seguimiento.

2.2. Primer control (3 meses tras detección inicial)

Del total de los profesionales sanitarios (N=168) en seguimiento el 83,3% (140/168) mantenían anticuerpos IgG antinucleocápside y en el 16,7% (28/168) no se detectaron.

Del total de participantes con niveles de anticuerpos por encima del punto de corte el 85,7% (90/105) eran mujeres y el 79,4% (50/63) eran varones, no existiendo diferencias estadísticamente significativas según el sexo ($p=0,285$). No se ha encontrado asociación entre el sexo y la durabilidad de la inmunidad humoral.

En este grupo la edad media fue de 46 años (DE 13) mientras que en aquellos sujetos en los cuales no se detectaron anticuerpos tipo IgG fue de 39 años (DE 9), existiendo una media de edad 7 años menor (IC95%: 2,618-11,286) (Figura 24). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos según la edad ($p=0,002$). Se encontró una relación entre la edad y la persistencia de anticuerpos IgG antinucleocápside.

Se detectaron anticuerpos tipo IgG en 96 empleados de los 114 que habían presentado síntomas asociados a COVID-19 (84,2%) y en 44 (81,4%) de 54 que fueron asintomáticos ($p=0,663$). A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas el porcentaje de sujetos con IgG presentes fue mayor en el grupo de sujetos sintomáticos.

Al analizar la prevalencia de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 según grupos de exposición se observó que mantenían anticuerpos en el primer control el 86,4% (89/103) de los sujetos que pertenecían al grupo 1 de exposición (alto), el 77,4% (41/53) de los incluidos en el grupo 2 de exposición (moderado) y el 83,3% (10/12) de los sujetos del grupo 3 de exposición (bajo) ($p=0,377$). Se observó que a mayor grado de exposición a la COVID-19 mayor número de sujetos conservaban anticuerpos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

2.3. Segundo control (6 meses tras detección inicial)

Del total de los profesionales sanitarios (N=168) se les realizó la segunda determinación a 140. Un 16,7% de los participantes inicialmente reclutados para el estudio no acudió al segundo control (28/168).

De los empleados que continuaron en seguimiento (N=140) se detectaron anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2 en el 52,1% (73/140). No hubo detección de anticuerpos en 67 de 140 (47,9%).

Del total de sujetos con anticuerpos IgG presentes el 54,7% (47/86) eran mujeres y el 48,1% (26/54) eran varones, no existiendo diferencias estadísticamente significativas según el sexo ($p=0,453$).

La edad media entre los que mantenían anticuerpos a los 6 meses fue de 49 años (DE 12) sin embargo en el grupo de sujetos con niveles de anticuerpos IgG no detectables fue de 41 años (DE 11). Con una diferencia de edad media en ambos grupos de 8 años (IC95%: 3,864-11,904). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos según la edad ($p<0,001$) (Figura 25). Como ocurrió en el primer control se observó que existía asociación entre la edad y la durabilidad de la inmunidad humoral.

Se detectaron anticuerpos tipo IgG en 53 empleados de los 100 que habían presentado síntomas asociados a COVID-19 (53,0%) y en 20 (50,0 %) de 40 que fueron asintomáticos ($p=0,852$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas aunque la prevalencia de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 en el personal sintomático fue ligeramente superior.

Del total de sujetos con anticuerpos tipo IgG presentes (N=73), 50 pertenecían al grupo 1 de exposición (alto) (58,1%), 19 sujetos al grupo 2 (moderado) (43,2%) y 40 sujetos al grupo 3 (bajo) (40,0%) ($p=0,216$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de exposición.

2.4. Tercer control (9 meses tras detección inicial)

11 sujetos no acudieron al tercer control. El porcentaje total de empleados que no finalizaron el seguimiento fue del 23,2%(39/168).

Del total de profesionales sanitarios que se les realizó la tercera determinación (N=129) el 24,0% (31/129) presentaban anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2, mientras que el 76,0% (98/129) de los empleados habían negativizado tras 9 meses de seguimiento.

Del total de sujetos con anticuerpos detectables el 23,7% (18/76) eran mujeres y el 24,5% (13/53) eran varones. No existiendo diferencias estadísticamente significativas según el sexo ($p=0,912$).

Del total de sujetos con anticuerpos IgG al finalizar el seguimiento, la edad media fue de 47 años (DE 13) y en aquellos sujetos en los cuales no se detectaron anticuerpos tipo IgG fue de 44 años (DE 12) (Figura 26). Sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos según la edad ($p=0,396$). Al completar el último control tras nueve meses de seguimiento no se encontró relación entre la edad y la persistencia de anticuerpos IgG antinucleocápside.

En este último control 22 sujetos que habían presentado síntomas asociados a COVID-19 de un total de 94 (23,4%) mantenían anticuerpos tipo IgG frente al SARS-CoV-2 y 9 sujetos asintomáticos de un total de 35 (25,7%) ($p=0,819$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar en función del grupo de exposición, se detectaron anticuerpos tipo IgG en 24 empleados de los 80 que pertenecían al grupo 1 (alto) (30,0%), en 5 (12,8%) de 39 del grupo 2 (moderado) y en 2 (20,0%) de 10 sujetos del grupo 3 (bajo) ($p=0,101$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo seguía siendo superior el porcentaje de sujetos que mantenían anticuerpos pertenecientes al grupo 1 de exposición en comparación con el resto de grupos de exposición.

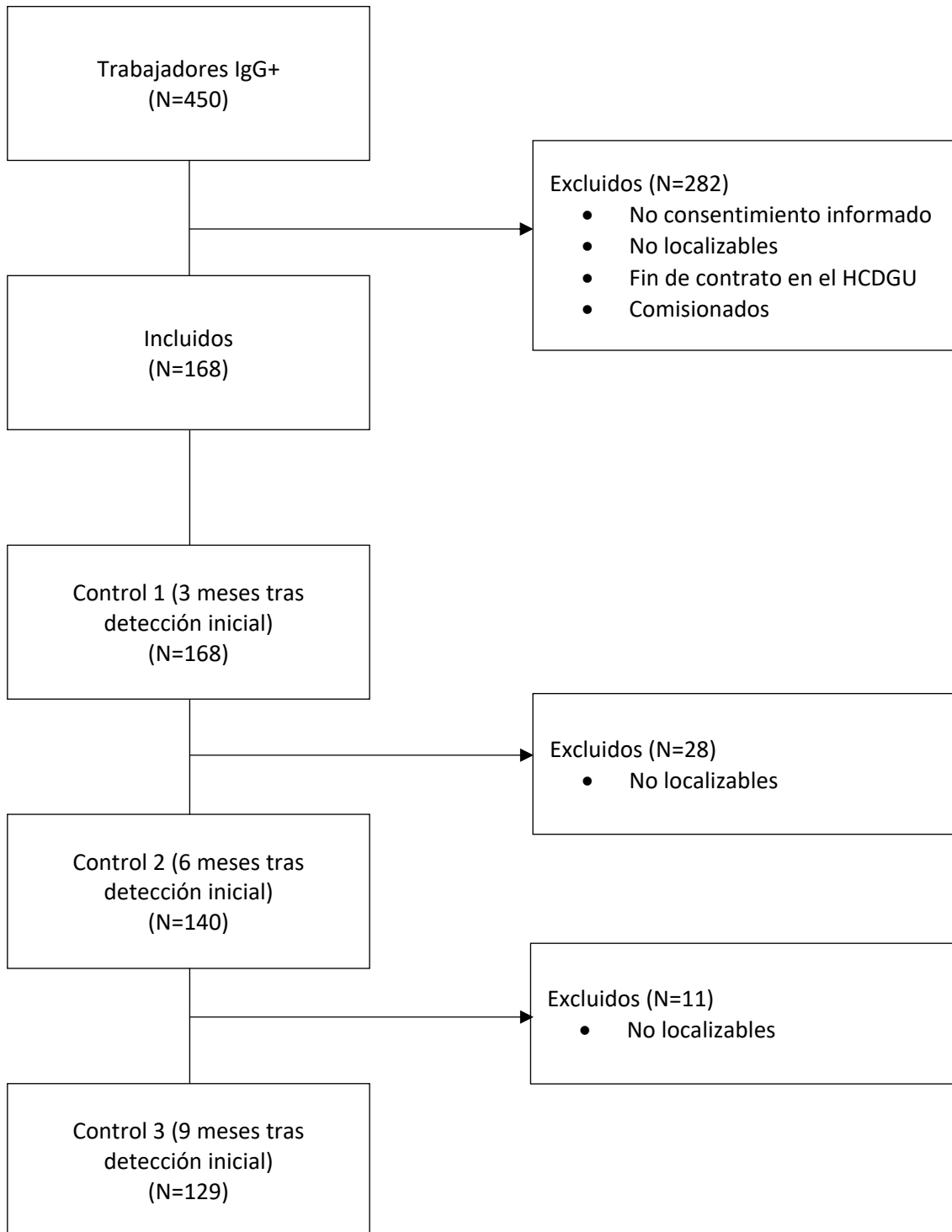


Figura 22. Diagrama de flujo del estudio prospectivo

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5. Resultados IgG positivos por sexo, síntomas y grupos de exposición.

		3 meses	p	6 meses	p	9 meses	p
Sexo n(%)	Varón	50(79,4)	0,285	26(48,1)	0,453	13(24,5)	0,912
	Mujer	90(85,7)		47(54,7)		18(23,7)	
Síntomas n(%)	Si	96 (84,2)	0,663	53 (53,0)	0,852	22 (23,4)	0,819
	No	44(81,4)		20 (50,0)		9 (25,7)	
Grupos de exposición n(%)	Elevado	89 (86,4)	0,377	50 (58,1)	0,216	24 (30,0)	0,101
	Moderado	41(77,4)		19 (43,2)		5 (12,8)	
	Bajo	10 (83,3)		4 (40,0)		2 (20,0)	

Fuente: elaboración propia

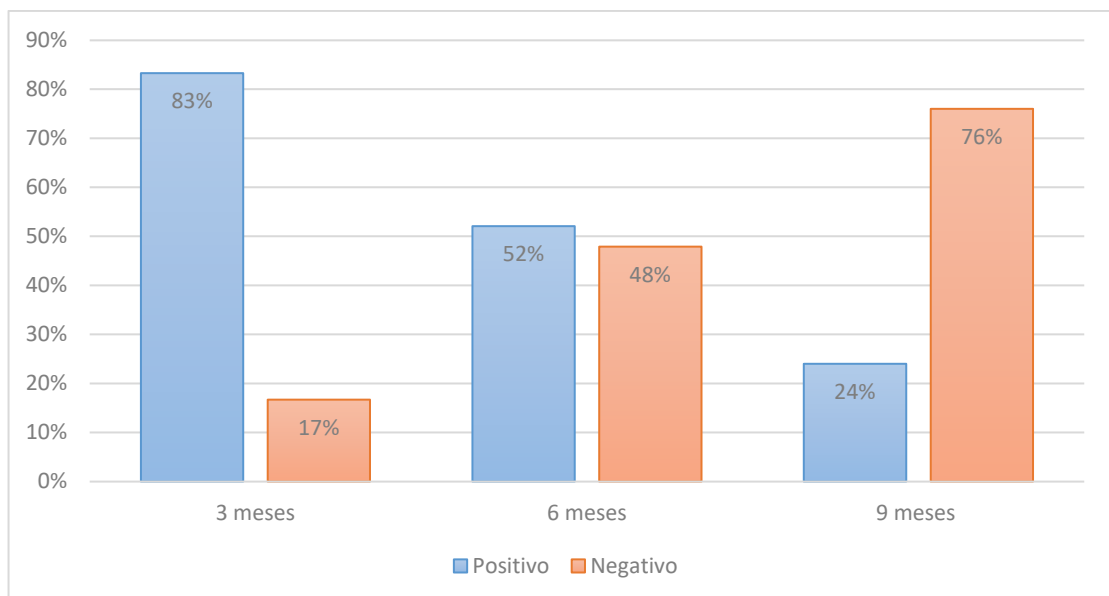


Figura 23. Evolución detección de anticuerpos a los 3, 6 y 9 meses

Fuente: Elaboración propia

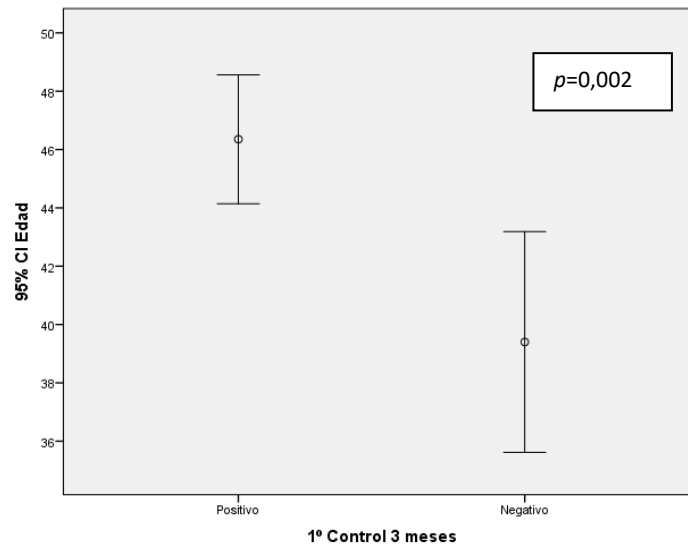


Figura 24. Prevalencia anticuerpos según edad en el primer control.

Fuente: Elaboración propia

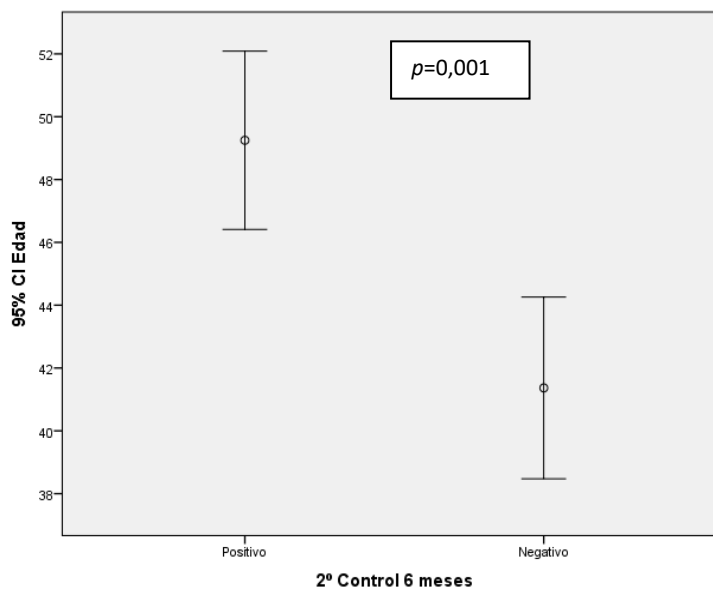


Figura 25. Prevalencia anticuerpos según edad en el segundo control

Fuente: Elaboración propia

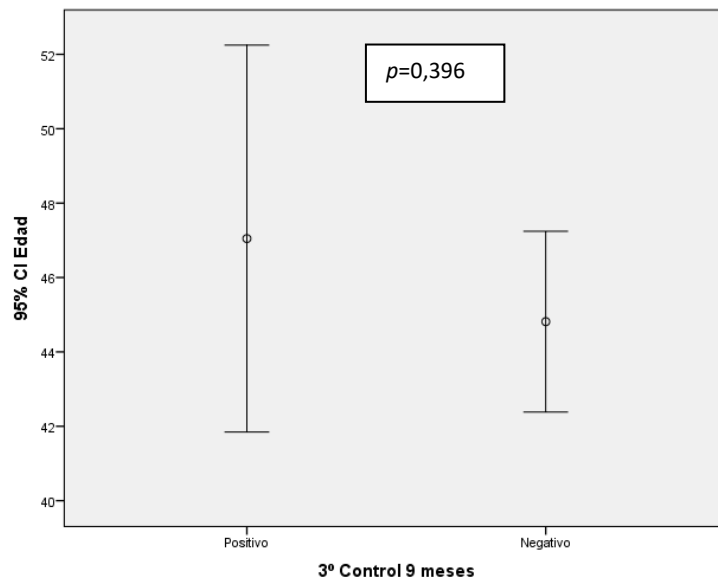


Figura 26. Prevalencia anticuerpos según edad en el tercer control

Fuente: Elaboración propia

3. Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico después de la vacunación)

3.1. Descripción general

Para el estudio de cohortes se incluyeron 122 trabajadores del HCDGU; 58 que habían sufrido la infección por SARS-CoV-2 y 64 sujetos *naive* frente al SARS-CoV-2 (confirmados serológicamente y a través de la encuesta epidemiológica), ambos grupos previamente vacunados (pauta completa con dos dosis) con *Pfizer/BioNTech Comirnaty (BNT162b2)*.

Se analizaron un total de 480 muestras procedentes de los mismos. El 95,9% (117/122) del total de participantes completaron el seguimiento (Figura 27).

El 77,9% (N=95) fueron mujeres y el 22,1% eran varones (N=27). La media de edad fue de 45 (DE 13) años en los varones y 48 (DE 13) años en las mujeres.

En la determinación inicial realizada un mes después de la vacunación, todos los individuos incluidos en el estudio (N=122) presentaban niveles de anticuerpos IgG anti-spike por encima de 50AU/ml, punto de corte que se establece para considerar que un individuo ha desarrollado inmunidad.

Todos los sujetos que finalizaron el seguimiento (N=117) mantuvieron concentraciones detectables de anticuerpos IgG anti-spike (>50AU/ml) pasados 7 meses tras la vacunación.

En global al analizar los niveles de anticuerpos IgG anti-spike (AU/ml) en los cuatro controles realizados, se observó un descenso estadísticamente significativo a lo largo de los 7 meses de seguimiento ($p<0,001$) (Tabla 6).

Se observó que los títulos de anticuerpos se van reduciendo cerca de un 50% en cada uno de los controles realizados respecto al control previo partiendo de una mediana de 14000 AU/ml.

Al finalizar el seguimiento los niveles de anticuerpos IgG anti-S se redujeron 7,6 veces respecto a los anticuerpos detectados inicialmente.

En el primer control llevado a cabo al mes de la vacunación se observan valores extremos, sin embargo en el resto de las determinaciones realizadas a los 3, 5 y 7 meses encontramos valores de niveles de anticuerpos alejados y también valores extremos. Existe una dispersión marcada en los valores por encima de la mediana, es decir, un grado de asimetría positivo, sin embargo esto no sucede con los valores inferiores a la mediana (Figura 28).

3.2. Resultados en función de haber padecido o no la COVID-19

3.2.1. Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG anti-spike (AU/ml) a lo largo de los 7 meses de seguimiento tanto en el grupo con infección previa como en el grupo de sujetos sin infección previa se observó un descenso estadísticamente significativo ($p < 0,001$). (Tabla 6).

Los sujetos con infección previa presentaron una disminución en sus niveles de anticuerpos (AU/ml) del 38,2% entre el primer (1 mes post-vacuna) y segundo control (3 meses post-vacuna), del 42,5% entre el segundo y tercer control (5 meses post-vacuna) y del 33% entre el tercer y último control (7 meses post-vacuna). Al finalizar el seguimiento hubo una disminución global del 75,6% en los títulos de anticuerpos con respecto a los valores obtenidos en el control inicial (1 mes post-vacuna) (Tabla 7) (Figura 29).

En el grupo sin infección previa presentaron una disminución en sus niveles de anticuerpos (AU/ml) del 54% entre el primer (1 mes post-vacuna) y segundo control (3 meses post-vacuna), del 55,4% entre el segundo y tercer control (5 meses post-vacuna) y del 42,5% entre el tercer y último control (7 meses post-vacuna). La reducción global en los títulos de anticuerpos al finalizar el seguimiento fue del 87% (Tabla 7) (Figura 29).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de reducción de niveles de anticuerpos en ambos grupos ($p < 0,001$).

El porcentaje de disminución en niveles de anticuerpos en el grupo sin infección previa en cada una de las determinaciones realizadas siempre es superior al observado en aquellos que habían padecido la infección, siendo la diferencia entre el primer y segundo control 15,8% (IC 95%: 6,7-24,9), entre el segundo y el tercer control 12,9% (IC 95%: 8,2-17,5) y entre el tercero y el último

control 9,5% (IC 95%: 5,6-13,4). Finalmente, la diferencia global entre el primer control realizado y el último control realizado a los 7 meses post vacunación fue de un 11,4% (IC 95%: 6,5-15,9) (Tabla 7) (Figura 29).

3.2.2. Niveles de anticuerpos IgG anti-spike

El análisis cuantitativo de anticuerpos IgG anti-spike demostró una respuesta sustancialmente más alta después de una infección previa (Tabla 6). Observándose diferencias estadísticamente significativas en todos los controles realizados:

Al mes post-vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los sujetos que habían padecido la COVID-19 (N=58) y en aquellos sin evidencia de infección previa (N=64) fue de 20741,4 (IQR 20894) AU/ml y 10847,3(IQR 12224) AU/ml respectivamente ($p<0,001$).

En el segundo control realizado a los 3 meses post- vacunación la mediana de niveles de anticuerpos en los dos grupos analizados fue de 12687 (IQR 12946) AU/ml en aquellos con evidencia de infección previa (N=58) y 4229,3 (IQR 4022) AU/ml en los sujetos sin evidencia de infección previa ($p<0,001$).

Después de 5 meses de la vacunación en el grupo de individuos con infección previa (N=56) la mediana de los títulos de anticuerpos fue de 6957,2 (IQR 9050) AU/ml mientras que en el grupo No-COVID la mediana fue 1686,5 (IQR 1481) AU/ml ($p<0,001$).

Por último, al finalizar el seguimiento a los 7 meses tras la vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los sujetos que había padecido la COVID-19 (N=57) y en aquellos sin evidencia de infección previa (N=60) fue de 4798,8 (IQR 6095) AU/ml y 892,1 (IQR 1051) AU/ml respectivamente ($p<0,001$).

Se observó que en cada uno de los cuatro controles realizados a lo largo del tiempo, los niveles de anticuerpos eran entre 2 y 5 veces superiores en el

grupo de pacientes con infección previa que en el grupo de sujetos sin evidencia de infección (Figura 30).

Además es importante destacar que la respuesta frente a la vacuna generada por aquellos individuos que han sufrido la enfermedad es heterogénea por la dispersión de los resultados, se encontraron valores de títulos de anticuerpos extremos, respecto al comportamiento de grupo. Sin embargo, en el grupo de sujetos naive la respuesta es más homogénea, ya que no había valores tan dispersos (Figura 31).

3.3. Distribución de edad y sexo en sujetos con y sin infección previa

Las variables sexo y edad en nuestra cohorte se han distribuido de forma homogénea entre aquellos sujetos que han padecido la COVID-19 y los que no la han padecido (Tabla 8).

La media de edad fue de 46(DE 13) años en los sujetos con infección previa y 48 (DE 13) años en aquellos sin evidencia de infección previa. No existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,376$).

En el grupo de sujetos con infección previa el 59,3% (16/27) fueron varones y el 44,2% (42/95) mujeres. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,167$).

En el grupo de sujetos sin evidencia de infección previa el 40,3% (11/27) fueron varones y el 55,8%(53/95) mujeres. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos ($p=0,167$).

En resumen, ni la edad ni el sexo se manifestaron como variables de confusión.

3.4. Resultados en función del sexo

3.4.1. *Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike*

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG anti-S (AU/ml) a lo largo de los 7 meses de seguimiento en función del sexo se observó un descenso estadísticamente significativo tanto en varones como en mujeres ($p < 0,001$). (Tabla 6).

Los varones presentaron una disminución en sus niveles de anticuerpos (AU/ml) del 49,9% entre el primer y segundo control, del 45,7% entre el segundo y tercer control y del 34,3% entre el tercer y último control (7 meses post-vacuna).

Las mujeres presentaron una disminución en sus niveles de anticuerpos (AU/ml) del 45,5% entre el primer y segundo control, del 50,3% entre el segundo y tercer control y del 38,9% entre el tercer y último control (7 meses post-vacuna) (Tabla 9) (Figura 32).

En los varones hubo una disminución global del 80,8% en los títulos de anticuerpos con respecto a los valores obtenidos en el control inicial mientras que en las mujeres esta disminución fue del 81,6% (Tabla 9) (Figura 32).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de reducción de niveles de anticuerpos en ambos grupos en ninguno de los controles realizados.

3.4.2. *Niveles de anticuerpos IgG anti-spike*

Al mes post-vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones (N=27) y en las mujeres (N=95) fue de 19192 (IQR 22730) AU/ml y 12753,2 (IQR 15686) AU/ml respectivamente ($p = 0,031$).

En el segundo control realizado a los 3 meses post- vacunación la mediana de niveles de anticuerpos en los dos grupos analizados fue de 9143,9 (IQR 11393) AU/ml en varones y 6278,4 (IQR 9688) AU/ml en las mujeres ($p=0,069$).

Después de 5 meses de la vacunación en los varones la mediana de los títulos de anticuerpos fue de 5185,6 (IQR 9113) AU/ml mientras que en las mujeres la mediana fue 2435,3 (IQR 4669) AU/ml ($p=0,027$).

Por último, al finalizar el seguimiento a los 7 meses tras la vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones y en mujeres fue de 3836,2 (IQR 5414) AU/ml y 1427,2 (IQR 3290) AU/ml respectivamente ($p=0,021$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los controles realizados, excepto en el segundo control realizado a los 3 meses de la vacunación debido posiblemente a la dispersión de los datos.

3.5. Resultados en función del sexo y de haber padecido o no la enfermedad

3.5.1. Sujetos con infección previa

a. Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike

Al analizar la evolución en los títulos de anticuerpos IgG anti-S (AU/ml), se observó un descenso estadísticamente significativo tanto en varones como en mujeres ($p<0.001$) (Tabla 6).

En los varones hubo una disminución al finalizar el seguimiento del 76,8% en los títulos de anticuerpos con respecto a los valores obtenidos en el control inicial y en las mujeres esta disminución fue del 75,1% ($p=0,672$).

El porcentaje de disminución en los títulos de anticuerpos a lo largo del seguimiento en ambos sexos fue muy similar, avanzando en paralelo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (Figura 33).

b. Niveles de anticuerpos IgG anti-spike

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG anti-S (AU/ml) se observó que en el primer control la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones (N=16) y en las mujeres (N=42) fue de 29643,7 (IQR 21528) AU/ml y 17784 (IQR 20756) AU/ml respectivamente ($p=0,060$).

En el segundo control realizado a los 3 meses post- vacunación la mediana de niveles de anticuerpos en los dos grupos analizados fue de 16126,2 (IQR 15376) AU/ml en varones y 11915,8 AU/ml (IQR 12750) AU/ml en las mujeres ($p=0,169$).

Después de 5 meses de la vacunación en los varones la mediana de los títulos de anticuerpos fue de 9824,4 (IQR 8640) AU/ml mientras que en las mujeres la mediana fue 6140,7 (IQR 9240) AU/ml ($p=0,147$).

Por último, al finalizar el seguimiento a los 7 meses tras la vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones y en mujeres fue de 6310,8 (IQR 5651) AU/ml y 4104,8 (IQR 6133) AU/ml respectivamente ($p=0,150$).

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los controles, se observó que en todos los casos los niveles de anticuerpos detectados en los varones fueron ligeramente superiores a los de las mujeres.

3.5.2. Sujetos sin infección previa

a. Evolución de los anticuerpos IgG anti-spike

Se observó un descenso estadísticamente significativo en los títulos de anticuerpos IgG anti-S (AU/ml) tanto en varones como en mujeres ($p < 0,001$) (Tabla 6).

En los varones hubo una disminución al finalizar el seguimiento del 87,4% en los títulos de anticuerpos con respecto a los valores obtenidos en el control inicial y en las mujeres esta disminución fue del 87 % ($p = 0,918$).

La disminución en los títulos de anticuerpos a lo largo del seguimiento en ambos sexos fue muy similar, al igual que se mostró en los pacientes con infección previa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (Figura 33).

b. Niveles de anticuerpos IgG anti-spike

Al analizar los niveles de anticuerpos detectados en a lo largo del tiempo se observó que al mes post-vacunación la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones ($N=11$) y en las mujeres ($N=53$) fue de 10454,1 (IQR 12622) AU/ml y 10934 (IQR 12764) AU/ml respectivamente ($p = 0,650$).

En el segundo control realizado la mediana de niveles de anticuerpos en los dos grupos analizados fue de 5097,3 (IQR 4070) AU/ml en varones y 4177,5 (IQR 4578) AU/ml en las mujeres ($p = 0,729$).

Después de 5 meses de la vacunación en los varones la mediana de los títulos de anticuerpos fue de 2000,3 (IQR 1855) AU/ml mientras que en las mujeres la mediana fue 1686,5 (IQR 1362) AU/ml ($p = 0,652$).

Al finalizar el seguimiento la mediana de los títulos de anticuerpos en los varones y en mujeres fue de 1171,8 (IQR 1486) AU/ml y 892,1 (IQR 851) AU/ml respectivamente ($p = 0,451$).

Al comparar las medianas de los niveles de anticuerpos en cada uno de los controles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo en pacientes sin infección previa.

3.6. Resultados en función de la edad

En nuestros resultados no encontramos asociación entre los títulos de anticuerpos detectados en cada uno de los controles realizados y la edad.

A medida que aumenta la edad no se encontraron cambios respecto a la concentración de anticuerpos (Figura 34).

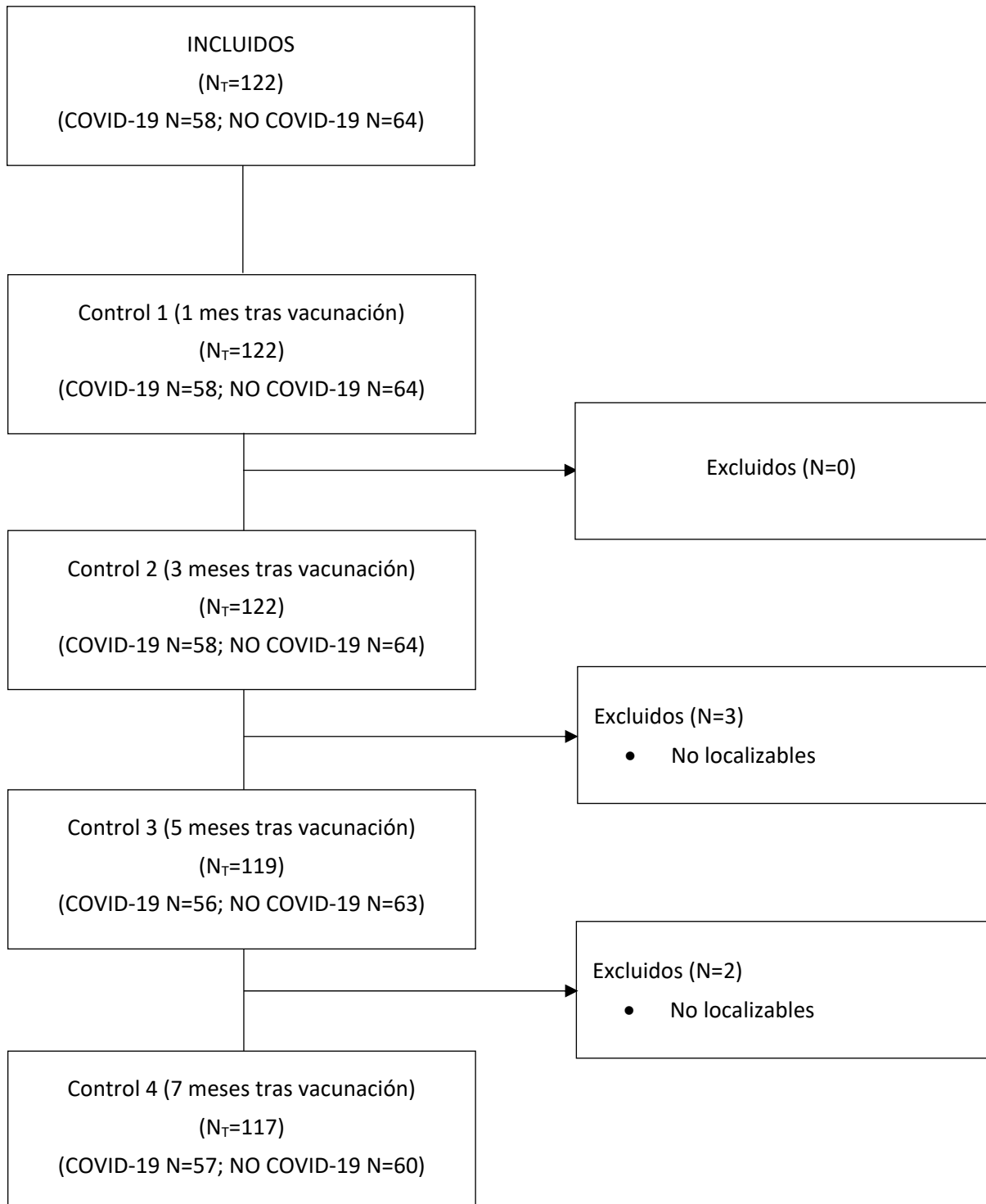


Figura 27. Diagrama de flujo de la muestra para el estudio de cohortes

Fuente: elaboración propia

Tabla 6. Concentración sérica de IgG anti-spike en AU/ml

		1 mes	3 meses	5 meses	7 meses	p	
<i>Global</i> <i>MD(IQR)</i>		13932,7(18508)	6826,0(10307)	2717,7(5810)	1827,1(4355)	<0,001	
<i>COVID-19</i> <i>MD(IQR)</i>	Si	20741,4(20894)	12687 (12946)	6957,2(9050)	4798,8(6095)	<0,001	
	No	10847,3(12241)	4229,3(4022)	1686,5(1481)	892,1 (1051)	<0,001	
<i>Sexo</i> <i>MD(IQR)</i>	Varón	19192(22730)	9143,9(11393)	5185,6(9113)	3836,2(5414)	<0,001	
	Mujer	12753,2(15686)	6278,4(9688)	2435,3(4669)	1427,2(3290)	<0,001	
<i>COVID-19 +</i> <i>MD(IQR)</i>	Sexo					<0,001	
		Varón	29643,7(21528)	16126,2(15376)	9824,4(86049)	6310,8(5651)	
		Mujer	17784(20756)	11915,8(12750)	6140,7(9240)	4104,8(6133)	
<i>COVID-19 -</i> <i>MD(IQR)</i>	Sexo					<0,001	
		Varón	10454,1(12622)	5097,3(4070)	2000,3(1855)	1171,8(1486)	
		Mujer	10934(12764)	4177,5(4578)	1686,5(1362)	892,1(851)	

Fuente: elaboración propia

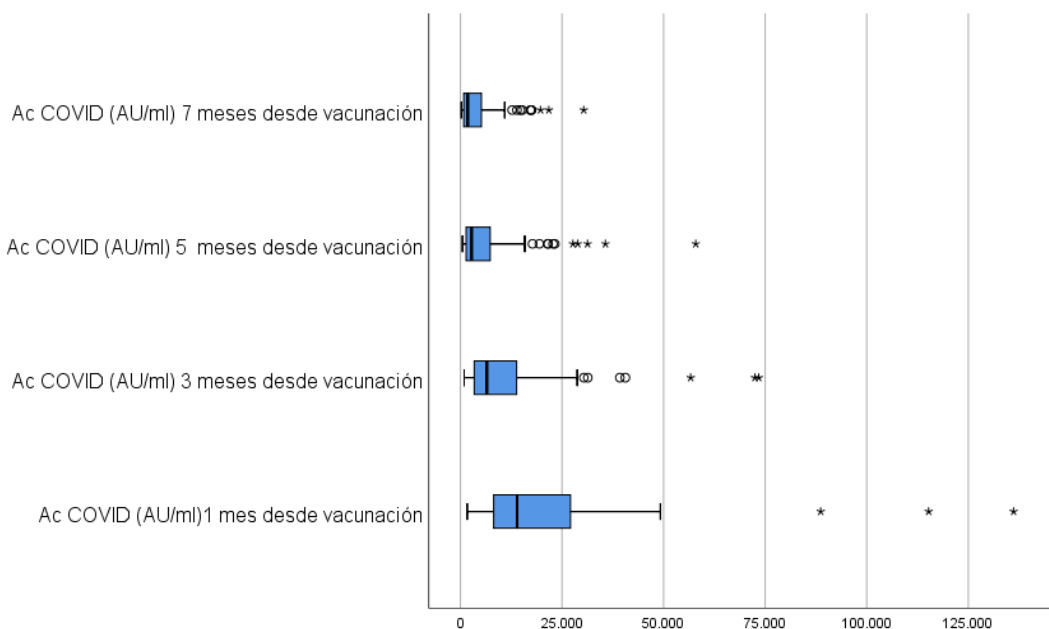


Figura 28. Concentración sérica de IgG anti-S a lo largo del periodo de estudio

Fuente: elaboración propia

Tabla 7. Porcentaje de disminución de Ac en sujetos con y sin infección previa

	COVID-19 + $\bar{x}(DE)$	COVID-19 + $\bar{x}(DE)$	Dif. $\bar{x}(IC95\%)$	p
1-3 meses	38,2% (19,2)	54,0% (30)	15,8% (6,7-24,9)	<0,001
3-5 meses	42,5% (13,1)	55,4% (12,6)	12,9% (8,2-17,5)	<0,001
5-7 meses	33,0% (8,6)	42,5% (12,1)	9,5% (5,6-13,4)	<0,001
1-7 meses	75,6% (12,9)	87,0% (11,7)	11,4% (6,9-15,9)	<0,001

Fuente: elaboración propia

Tabla 8. Distribución de edad y sexo

		COVID-19		p
		SI	NO	
Sexo n (%)	Varón	16(59,3)	11(40,7)	0,167
	Mujer	42(44,2)	53(55,8)	
Edad $\bar{x}(DE)$		46(13)	48(13)	0,375

Fuente: elaboración propia

Tabla 9. Porcentaje de disminución en función del sexo

	Varón $\bar{x}(DE)$	Mujer $\bar{x}(DE)$	Dif. \bar{x}	p
1-3 meses	49,9% (15,6)	45,5% (15,6)	4,3%	<0,001
3-5 meses	45,7% (11,7)	50,3% (14,8)	4,7%	<0,001
5-7 meses	34,3% (9,8)	38,9% (11,8)	4,6 %	<0,001
1-7 meses	80,8% (9,9)	81,6% (14,4)	0,7%	<0,001

Fuente: elaboración propia

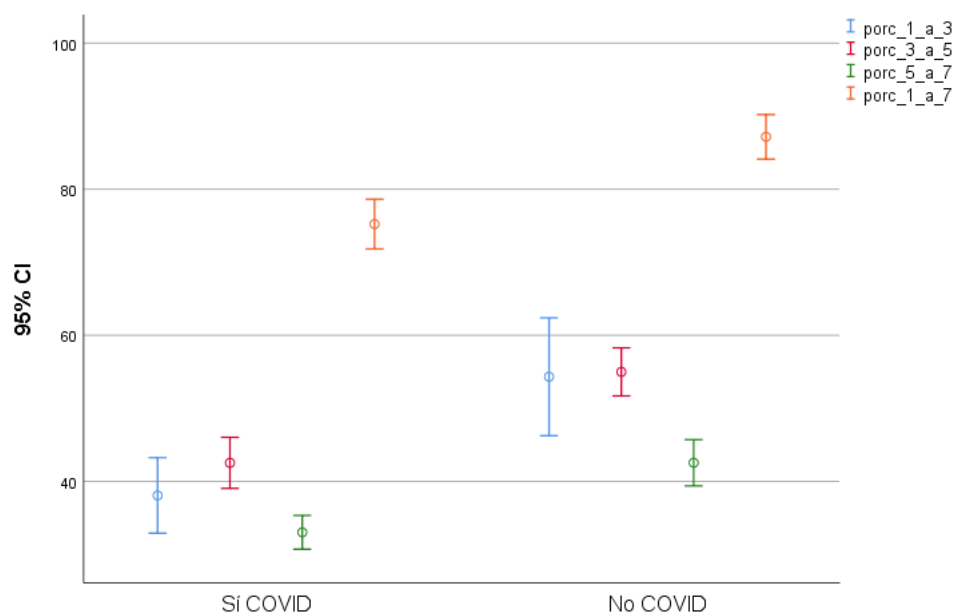


Figura 29. Representación gráfica del porcentaje de reducción de los niveles de Ac en función de infección previa.

Fuente: elaboración propia

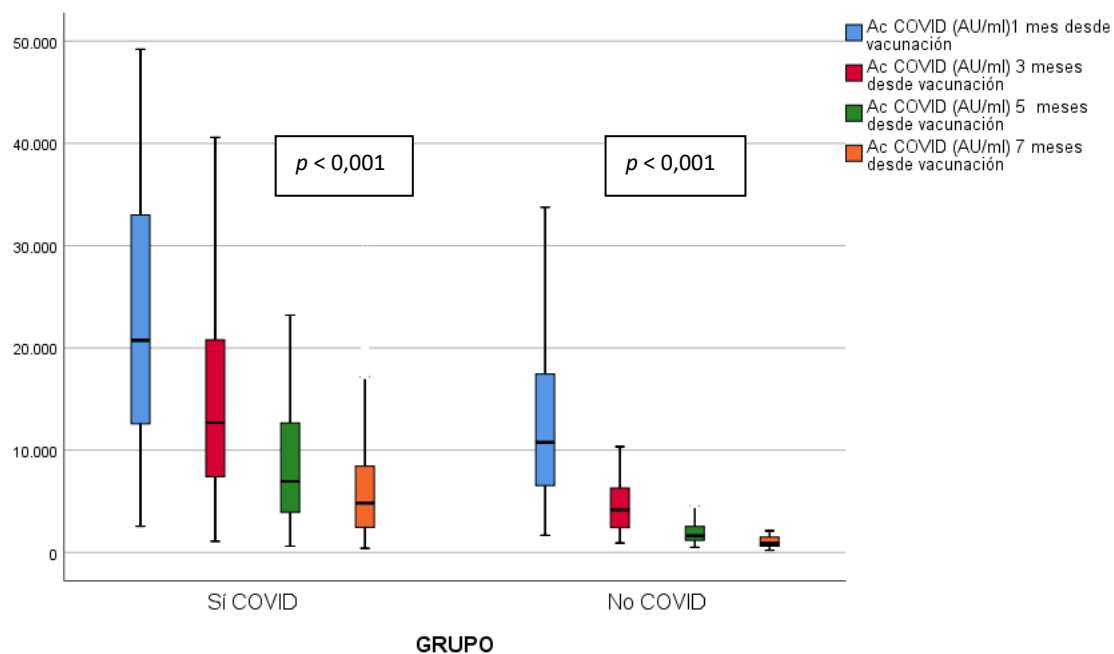


Figura 30. Representación de los títulos Ac (AU/ml) en ambos grupos (Se omiten los valores alejados y extremos para una mejor visualización de las cajas).

Fuente: elaboración propia

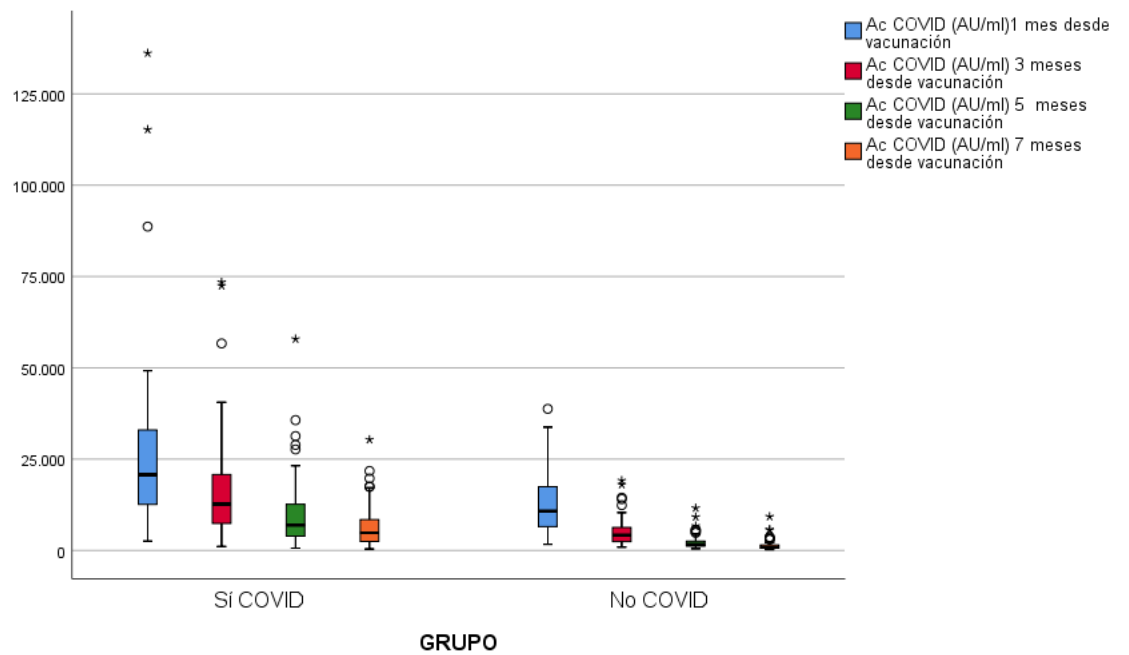


Figura 31. Representación de los títulos Ac (AU/ml) en ambos grupos.

Fuente: elaboración propia

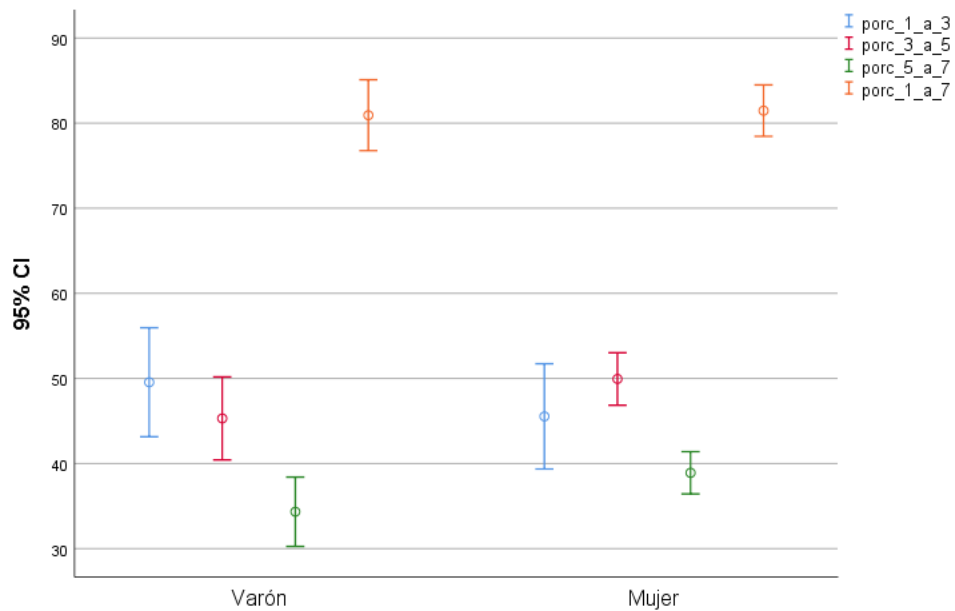


Figura 32. Representación gráfica del porcentaje de reducción de los niveles de Ac en función de sexo.

Fuente: elaboración propia

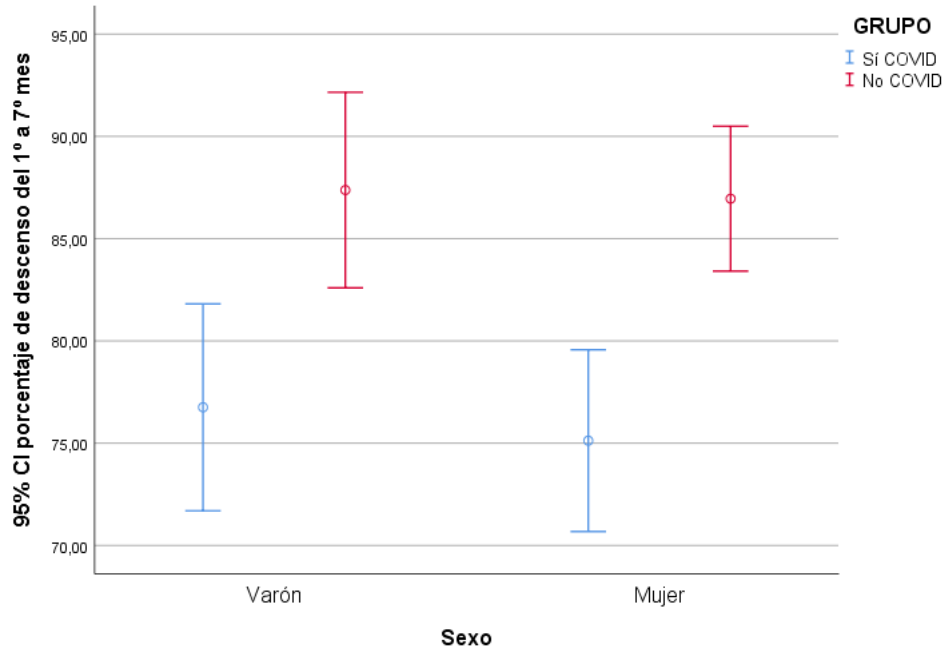
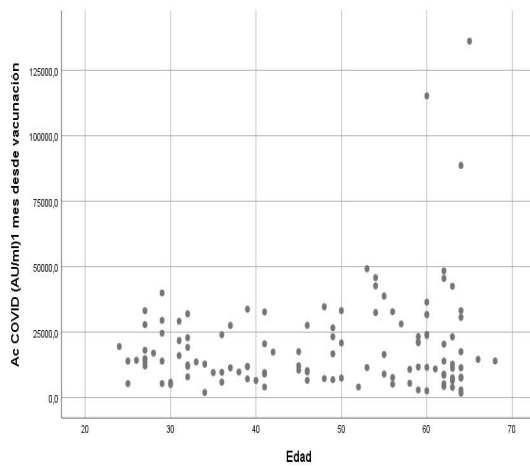
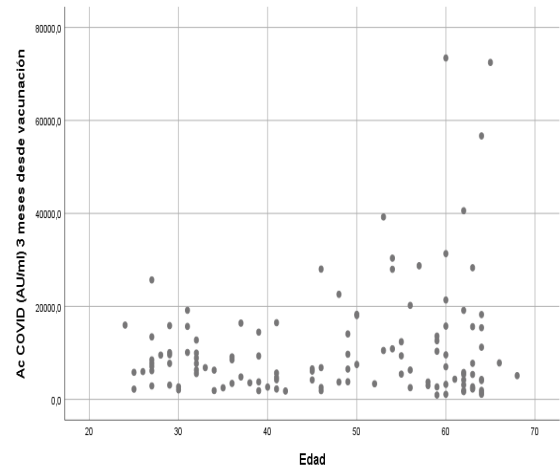


Figura 33. Representación del porcentaje de reducción de los niveles de Ac a los 7 meses según sexo y en función de infección previa.

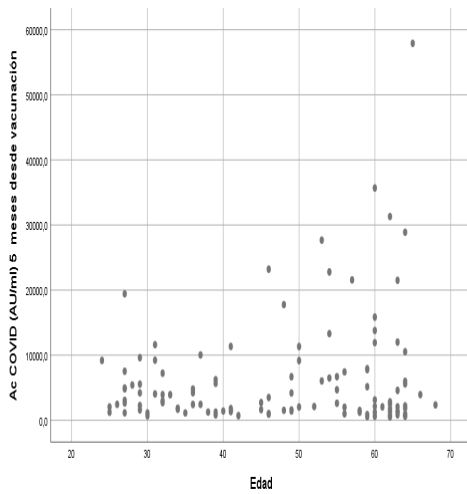
Fuente: elaboración propia



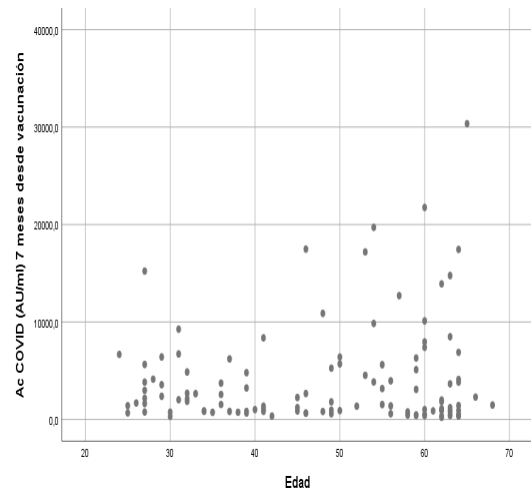
a) Ac 1 mes



b) Ac 3 meses



c) Ac 5 meses



d) Ac 7 meses

Figura 34. Representación de los títulos de Ac en función de la edad.

Fuente: elaboración propia

IX. DISCUSIÓN Y LIMITACIONES

1. Discusión

1.1. Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico)

La presente investigación está motivada por la necesidad de aproximarnos al conocimiento de la situación infectiva y el estado inmunológico así como de la evolución del mismo a lo largo del tiempo de los profesionales sanitarios de nuestro centro. Los ensayos serológicos representan un papel importante en el conocimiento del impacto y la evolución de la pandemia, especialmente en los profesionales sanitarios. En mi opinión, estos datos son útiles para ayudar a aclarar dos cuestiones: 1) la exposición de nuestros trabajadores al SARS-CoV-2 durante la crisis y 2) el análisis de la respuesta humoral en una población bien caracterizada.

Los principales resultados de nuestro estudio mostraron que el número de participantes con infección activa en el momento de la toma de muestra fue bajo (1,1%), sin embargo encontramos una proporción relativamente alta (16,3%) de trabajadores sanitarios con anticuerpos IgG frente al SARS-CoV-2.

El HCDGU está ubicado en Madrid, una de las regiones con mayor incidencia de COVID-19 del país especialmente al principio de la pandemia, lo que podría explicar la alta tasa de detección de anticuerpos en nuestro centro. En julio de 2020 se publicó un estudio de la población española que mostró una seroprevalencia de todo el país del 5,0% pero los datos variaron notablemente entre provincias²²². En 7 provincias del centro de España incluida Madrid, la seroprevalencia fue superior al 10%. En concreto los datos de seroprevalencia obtenidos en este estudio cuando se realiza la detección de anticuerpos IgG antinucleocápside con la misma técnica empleada en esta investigación (SARS-CoV-2 IgG; Abbott Laboratories Inc. Illinois, EE.UU) es del 11,5% en la Comunidad de Madrid.

Una explicación parcial de una mayor prevalencia en nuestro hospital en comparación con la población general es la mayor exposición al virus en los distritos del sur de Madrid. Los datos de la Comunidad de Madrid muestran que los barrios de Carabanchel y Aluche tuvieron una incidencia de la COVID-19 ligeramente superior a la de la Comunidad de Madrid²²³.

En el Hospital Universitario de Alcorcón de características y áreas asistenciales similares a nuestro centro, ubicado también en la zona sur de Madrid realizaron un estudio similar, describiéndose una seroprevalencia del 38% entre sus trabajadores²²⁴. Estos resultados son mucho mayores que los obtenidos en nuestro centro, los autores lo explican por la elevada incidencia de la enfermedad que tuvo Alcorcón durante los primeros meses de pandemia, la falta de equipos de protección individual y el retraso en la implementación de adecuadas medidas de prevención. Además otra explicación posible para la diferencia encontrada en la seroprevalencia entre ambos hospitales es que, nuestro hospital jugaba con ventaja, se implementaron medidas de prevención y se establecieron protocolos estrictos de seguridad semanas previas al inicio de la pandemia. Las autoridades sanitarias españolas seleccionaron nuestro centro como el lugar donde los españoles repatriados de la ciudad Wuhan cumplieran su cuarentena, cuando aún no había llegado la COVID-19 a nuestro país. Se consideró útil esta decisión por varias razones: ser hospital militar de referencia, tener su perímetro cerrado, contar con planes de seguridad y disponer de una unidad de aislamiento de alto nivel (UAAN) siendo por ello nuestro centro miembro de la red nacional de hospitales para el tratamiento de enfermedades altamente infecciosas, y tener capacidad para estar preparados si los casos en cuarentena se convertían en casos confirmados.

En otro estudio realizado en el Hospital Clínico de Barcelona observaron una seroprevalencia del 11,6% en los profesionales sanitarios, que duplicaba la descrita en la población general en la ciudad condal²²⁵, ratificando a los hospitales como lugares de riesgo de infección por SARS-Co2 entre los trabajadores.

Era de esperar obtener una mayor seroprevalencia que la de la población general entre los profesionales sanitarios, ya que este colectivo ha estado en contacto con pacientes infectados durante más de 3 meses, en una destacada labor profesional. Nuestros resultados fueron superiores, pero no tan preocupantes como se podría haber esperado sin la aplicación de protocolos estrictos.

Conocer la seroprevalencia de nuestro personal en comparación con nuestra población local es importante para evaluar la eficiencia de los protocolos de seguridad establecidos y poder controlar la transmisión en el entorno hospitalario; estudios como el de *Zhou Q et al*²²⁶ estimaron que la transmisión nosocomial es la fuente de infección por SARS-CoV-2 en aproximadamente el 44% de los casos. Esta estimación, se vio incrementada hasta más del 90% de los casos en un modelo matemático, utilizado en un hospital inglés (el 20% de las infecciones en pacientes hospitalizados y el 73% de las infecciones en trabajadores se debieron a transmisión nosocomial)²²⁷.

El último metaanálisis publicado sobre estimación de la seroprevalencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 entre los profesionales sanitarios informa de una media del 8,7% en diferentes hospitales en todo el mundo²²⁸. Conviene mencionar que en los EE.UU. observaron una alta variabilidad en la prevalencia de anticuerpos del SARS-CoV-2, que van desde el 1,1% al 14,4%, como ocurre en España con importantes variaciones de seroprevalencia en los estudios realizados en hospitales generales oscilando entre el 1,8% y el 38%^{229,230,225,224}. Estas diferencias entre los estudios pueden ser debidas a varias razones: la incidencia en el momento y lugar del estudio, las distintas técnicas empleadas con variación en sensibilidad y especificidad o diferentes medidas de bloqueo y prevención implementadas.

En otro metaanálisis²³¹ se encontró que la proporción de trabajadores sanitarios infectados por SARS-CoV-2 entre todos los pacientes con COVID-19 fue menor en China (4,2%) que en EE. UU. (17,8%) y Europa (9%). Esto podría explicarse por una mejor adherencia de los profesionales sanitarios de China a

las medidas de prevención y control de la infección; este país puso en prácticas las lecciones aprendidas al sufrir la epidemia de SARS en 2003 mediante la aplicación inmediata de medidas efectivas: identificación y aislamiento de casos, vigilancia activa a gran escala de las personas, aplicaciones para teléfonos inteligentes, seguimiento y puesta en cuarentena de contactos, detección de temperatura en lugares públicos, distanciamiento físico, inspección de viajeros, y sistema de cámara de calle para la identificación de personas sin mascarilla o mostrando síntomas. Sin embargo, EE.UU. y Europa parecían no estar preparados para manejar la oleada de pacientes que condujo a una grave escasez de material necesario para hacer frente a lo que se enfrentaban, lo que les llevó a actuar demasiado tarde.

Existen importantes implicaciones de la COVID-19 entre los trabajadores sanitarios. En primer lugar, hay consecuencias para su salud: en una serie de China, el 14,8% de los casos entre los trabajadores sanitarios se clasificaron como graves o críticos y cinco de ellos de un total de 247 fallecieron²³². En segundo lugar, los trabajadores sanitarios infectados también podrían transmitir la infección a pacientes vulnerables si no se aíslan de manera adecuada y rápida. En tercer lugar, las altas tasas de infección entre los trabajadores sanitarios podrían causar problemas debido a la falta de personal en el sistema de salud. En cuarto lugar, los trabajadores pueden transmitir la infección a familiares cercanos, otros trabajadores sanitarios y la comunidad.

En cuanto a los grupos en los cuales clasificamos a nuestros sujetos, como era de esperar la detección de IgG fue mayor en el grupo de “Alto riesgo” en comparación con el grupo de riesgo moderado y riesgo bajo (19,5%; 14,3%; 12,5% respectivamente $p < 0,001$). Estas diferencias podrían explicarse por el tipo de actividad que realizan, ya que los empleados del grupo categorizado de “Alto riesgo” trabajaron en unidades COVID-19 o servicio de urgencias donde tuvieron un contacto diario y prolongado con los pacientes infectados. Estos mismos resultados los encontramos en otros estudios como en uno realizado en Dinamarca²³³ en el cuál concluían que existía claramente un mayor riesgo de

infección por SARS-CoV-2 en los trabajadores relacionados con áreas destinadas a pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2 o alta sospecha de la misma.

Está claro que el personal que tiene un mayor contacto con pacientes infectados con representan un grupo de alto riesgo, y esto fue particularmente cierto durante los primeros meses de la pandemia donde el conocimiento, las medidas de control y el equipo de protección individual era limitado. Además, no usar mascarilla en cualquier actividad clínica y la escasez de EPI aumenta la probabilidad de contagio. Por lo tanto, el suministro y uso de equipos de protección para los trabajadores sanitarios en los hospitales son una herramienta necesaria contra la COVID-19 de suma importancia, ya que disminuye la tasa de infección entre trabajadores sanitarios.

Otro hallazgo del presente estudio es que un enfoque importante para prevenir la infección entre el paciente y el personal es recibir capacitación en prevención de la COVID-19 y en uso de equipos de protección individual (EPIs).

Cabe destacar que la tasa global de empleados que afirmaron haber recibido formación específica fue del 64,5%, ya fuese de forma presencial, asistiendo a sesiones teórico-prácticas impartidas por el Servicio de Medicina Preventiva o de forma online, mediante la descarga en la Intranet del Hospital de videos formativos, sobre los diferentes protocolos de puesta y retirada de EPIS, simulando diferentes entornos hospitalarios y sobre las correctas pautas de higiene. Esta cohorte de pacientes presentó una seroprevalencia significativamente menor de anticuerpos en comparación con los empleados sin ningún tipo de formación específica (14,5% frente a 18,6%). Además, estos hallazgos se pudieron observar en todos los niveles de exposición. En particular, observamos diferencias importantes en los empleados del grupo del alto riesgo donde la prevalencia de anticuerpos IgG en el subgrupo que no asistieron a programas de formación fue mucho más elevada (25,3% vs 16,7%).

Nuestros resultados concuerdan con varios informes emitidos durante la pandemia, que identificaban la falta de capacitación en medidas de control de la infección como uno de los factores que aumentan el riesgo de exposición del paciente al personal sanitario, lo que resulta en una mayor tasa de infección entre el personal²³⁴.

En nuestro Hospital el Servicio de Medicina Preventiva, en sus ciclos formativos impartidos desde el inicio de la pandemia, puso especial interés tanto en la adecuada puesta y retirada de equipo de protección individual (EPI) así como en llevar a cabo adecuadas pautas de higiene entre otras medidas de prevención. Este último punto es esencial; sabemos que la transmisión por contacto es una de las principales rutas del SARS-CoV-2. La transmisión de pacientes a profesionales sanitarios por lo general sigue a la contaminación de las manos después de tocar a pacientes o fómites, por lo que la higiene de manos se considera la medida de prevención más importante para las infecciones asociadas con la atención médica. Es posible que los resultados obtenidos se deban en parte al esfuerzo para concienciar de la importancia de realizar una buena higiene de manos después de contactar o cuidar a pacientes enfermos. Como todos sabemos, la acción de lavarse las manos puede reducir significativamente la presencia de microorganismos residuales.

Respecto al análisis de la prevalencia de anticuerpos tipo IgG en función de la condición laboral de los profesionales sanitarios de nuestro centro, en general se observaron resultados ligeramente diferentes entre el personal militar y el personal civil (15,1% y 16,7%, respectivamente).

Al analizar la seroprevalencia según los grupos de riesgo de exposición al SARS-CoV-2, encontramos que en los grupos 1 (Alto) y 2 (moderado) había más personal civil con anticuerpos IgG detectables. Esto podría explicarse por el hecho de que el personal de las Fuerzas Armadas (FAS) desde el inicio de su carrera profesional es preparado y adiestrado de forma continuada con el fin de adquirir diversas capacidades, para atender cualquier situación de emergencia y en cualquier momento ya sea en territorio nacional o en zona de operaciones

(misiones internacionales). Esto implica la participación de forma regular en ciclos formativos, asistencia a cursos de actualización teórico-prácticos con contenidos específicos, como puede ser la formación en riesgos NRBQ (nuclear, radiológico, biológico, químico). En adición, se debe tener en cuenta que parte de los militares incluidos en este estudio no formaban parte de la plantilla habitual del HCDDGU sino que habían sido comisionados para apoyar al personal del hospital durante la pandemia y la mayoría procedían de unidades especializadas en catástrofes sanitarias, como puede ser la Agrupación de Sanidad (AGRUSAN) o la Unidad de Apoyo Logístico Sanitario (UALSAN).

En el grupo 3 de bajo riesgo encontramos una seroprevalencia mayor en los militares frente a la encontrada en el personal civil. Los contagios se debieron a contactos fuera del ámbito hospitalario fundamentalmente por contactos estrechos con familiares con enfermedad confirmada en base a los datos aportados por la encuesta epidemiológica.

Un total de 263 empleados seropositivos (58%) habían sido previamente diagnosticados con COVID-19, este hallazgo sugiere que una proporción significativa de las infecciones en nuestra cohorte eran pauci-sintomáticas o asintomáticas (42%), estos individuos no se habrían autoaislado cuando se infectaron y podrían haber actuado como vectores de transmisión nosocomial, lo que denota que se deben implementar programas de detección temprana / cribado en los profesionales sanitarios para disminuir la transmisión intrahospitalaria y maximizar la fuerza de trabajo disponible²³⁵. Esto es acorde con otros estudios que observaron tasas similares de sujetos asintomáticos²²⁵.

En comparación con el espectro clínico de los pacientes descrito para la población general, en la cual aproximadamente la mitad de ellos son asintomáticos o paucisintomáticos, nuestra tasa de asintomáticos es menor (42%). Llama la atención que en nuestra serie este porcentaje de asintomáticos sea relativamente inferior.

No es fácil encontrar una explicación clara a este hecho sin analizar tamaños muestrales, edad de los participantes u otros posibles sesgos de cada uno de los informes. Nos encontramos frente a una selección de sujetos en un ambiente en el cual el riesgo de contagio es mayor debido al tiempo y la intensidad en cuanto al contacto con individuos infectados graves o críticos. Si bien, la sintomatología analizada a través de la encuesta epidemiológica auto cumplimentada tiene mucha subjetividad.

Con respecto a los trabajadores con síntomas evidentes que sugieren la enfermedad COVID-19, la mayoría de ellos tenían una enfermedad leve que podía tratarse de forma ambulatoria. No hubo ningún fallecimiento entre los trabajadores del HCDGU. Esto no es de extrañar, ya que no hay población de personas mayores de 65 entre los trabajadores activos. Para prevenir la transmisión nosocomial, tanto los pacientes como los trabajadores de la salud deben someterse a pruebas de detección de la infección por SARS-CoV-2 independientemente de la ausencia de síntomas típicos de la enfermedad, ya que la transmisión asintomática ya está claramente reconocida como muy importante en la propagación del SARS-CoV-2.

Como punto fuerte, hasta donde sabemos, este es uno de los primeros estudios sobre detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 que compara militares con civiles, siendo ambos grupos profesionales sanitarios. Sin embargo, serían necesarios más estudios multicéntricos con un gran número de sujetos de diferentes hospitales militares para evaluar más a fondo la seropositividad en estas dos cohortes. Además, este es uno de los pocos trabajos en los que se ha realizado simultáneamente pruebas serológicas y moleculares para conocer la seroprevalencia y la infección activa en un momento determinado.

1.2. Estudio prospectivo (evolución del estado inmunológico en pacientes IgG positivos)

Uno de los objetivos secundarios del presente estudio fue investigar la respuesta inmunológica humoral a lo largo del tiempo (seguimiento durante nueve meses) en una cohorte de 168 profesionales sanitarios que fueron positivos para anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 después de la primera ola de la pandemia en España. Estos resultados pueden ayudar a comprender mejor la naturaleza de inmunidad después de la infección.

Los anticuerpos tipo IgG que se pueden medir se desarrollan después de muchas, pero no de todas las infecciones por SARS-CoV-2. Las respuestas serológicas suelen detectarse en 1-3 semanas. Esto permite que los ensayos de anticuerpos se utilicen para estimar la proporción de una población expuesta o infectada. Además, aunque el grado de inmunidad asociado con diferentes títulos de anticuerpos y otras respuestas inmunes aún no se ha determinado por completo, es probable que los niveles de anticuerpos proporcionen alguna información sobre el riesgo y / o la gravedad de una infección futura.

Los resultados de este trabajo muestran que un alto porcentaje de los profesionales sanitarios no mantienen niveles de anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) detectables pasados 9 meses de la infección (76%). Casi la mitad de nuestros trabajadores perdieron los anticuerpos a los 6 meses (48%). Se observó una disminución estadísticamente significativa (83,3%; 52,1% y 24,0% respectivamente; $p < 0,001$) en la detección de anticuerpos IgG antinucleocápside a medida que pasaban los meses, siendo la pérdida de anticuerpos ligeramente mayor entre el primer control y el segundo control.

Estos resultados sugieren que una proporción significativa de personas infectadas con SARS-CoV-2 podrían tener resultados negativos en las pruebas serológicas en los meses posteriores a la infección. Esto tiene varias implicaciones a tener en cuenta. Los estudios transversales de seroprevalencia

que estiman el número de personas que han sido infectadas con SARS-CoV-2, probablemente corran el riesgo de subestimar la incidencia. Una parte de estas tendrán un resultado negativo en los ensayos serológicos y por lo tanto no se incluirán como sujetos infectados previamente. Estudios previos en profesionales sanitarios han informado una rápida pérdida de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 durante los primeros tres meses después de la infección, lo que alerta sobre una protección humoral de corta duración.

En el estudio de *Self WH et al*²³⁶ se recogieron muestras de suero de personal sanitario en 13 hospitales y se analizaron los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en la primavera de 2020. Pasados dos 2 meses se repitió la determinación a todos aquellos que habían desarrollado anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2.

Tras repetir la prueba, el 93,6% de los participantes positivos (146/156) experimentaron una disminución en la respuesta de anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) y en el 28% no se detectaron.

Se observó que, los participantes que inicialmente presentaban respuestas de anticuerpos más altas, tenían más probabilidades de seguir manteniendo anticuerpos en los controles posteriores que aquellos que tenían una respuesta de anticuerpos inicial más baja.

En otro estudio en el que se realizaron mediciones seriadas de IgG anti-nucleocápside durante un período de 6 meses, concluyeron que existía una disminución significativa en los niveles de dichos anticuerpos y la vida media de los mismos se estimó en 85 días²³⁷.

Un trabajo anterior con un tamaño muestral más pequeño en el que comparan distintos inmunoensayos también observaron disminución de IgG anti-nucleocápside usando la plataforma Abbott, pero cuando las determinaciones se llevaron a cabo con un inmunoensayo distinto (Roche), los niveles de anticuepos IgG anti-nucleocápside no disminuyeron sino que permanecieron estables²³⁸.

Estudios a gran escala como el de *Gudbjartsson et al*²³⁹ realizado en Islandia en una cohorte de 30756 personas han demostrado la persistencia de anticuerpos hasta 4 meses después de la infección.

Por otro lado algunos autores defienden que la durabilidad de los anticuerpos es aún mayor, como el grupo de *L'Huillier AG, et al*²⁴⁰ en cuyo trabajo observaron que los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 persistieron en los 200 trabajadores del hospital al menos 6 meses después de la enfermedad; estos resultados difieren de los nuestros a nivel general. Sin embargo, al igual que en nuestro estudio los niveles más elevados los encontraron en el tercer mes post detección inicial y posteriormente disminuyeron entre los meses tres y seis.

Es habitual que se observe un pico inicial y una disminución temprana de anticuerpos después de una infección; la mayoría de los plasmablastos secretores de anticuerpos de vida corta responsables del pico inicial tienen una vida media de aproximadamente tres meses²⁴¹. A partir del sexto mes las células plasmáticas de vida larga y las células B de memoria son las que contribuyen a una protección mediada por anticuerpos a más largo plazo.

En otro estudio de *Varona JF et al*²⁴² llevado a cabo en profesionales sanitarios en España, en una cohorte de más de 300 empleados muestran que un alto porcentaje de los sujetos (75%) mantiene niveles de anticuerpos detectables más allá de los 9 meses. Si bien, en la mayoría de ellos se observa una disminución significativa en los niveles de anticuerpos; estos resultados demuestran una durabilidad mayor de los anticuerpos en comparación con los resultados de nuestro estudio y de los demás estudios anteriormente citados.

Se observa una gran variabilidad entre los estudios disponibles hasta el momento en la literatura; sin embargo, en la mayoría de las respuestas serológicas se observa una rápida disminución temprana seguida de un descenso más lento.

Estas diferencias entre los estudios pueden ser debidas a varias razones: en primer lugar a las características de la población de estudio, como la sintomatología de la infección por SARS-CoV2, la edad o los títulos de anticuerpos basales y en segundo lugar las diferentes técnicas empleadas (detección de distintas inmunoglobulinas), además los resultados obtenidos están condicionados a los límites de detección de los inmunoensayos, que pueden ajustarse para priorizar la sensibilidad o la especificidad de cada una de las determinaciones realizadas.

En nuestra investigación sólo se evaluó la presencia o ausencia de anticuerpos IgG anti-nucleocápside al no disponer de otras técnicas que nos permitieran detectar otros componentes el sistema inmunitario (IgA, IgM, IgG anti-S). Posiblemente si estas técnicas adicionales hubieran estado a nuestro alcance, podríamos afirmar que la inmunidad frente al SARS-CoV-2 es algo más duradera que lo demostrado únicamente con el análisis de anticuerpos tipo IgG anti- nucleocápside. Algunos estudios defienden que la IgG frente a la proteína de la nucleocápside (N), la cual se encuentra dentro del virus, se descompone más rápido que la IgG frente a la proteína de la espícula (S), pudiendo ser un marcador de una infección más reciente pero ligeramente menos sensible para evaluar la seroprevalencia poblacional^{243,244}.

Un grupo de investigadores españoles del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), ha publicado recientemente un trabajo en el que estudian la cinética durante 7 meses de distintos anticuerpos frente al SARS-CoV-2²⁴⁵. Los autores concluyen que la inmunidad dura en la mayoría de los sujetos hasta 7,7 meses después del inicio de síntomas; bien es cierto que miden los isotipos IgM, IgG e IgA frente a un panel de seis antígenos del SARS-CoV-2 y tienen en cuenta la vida media de todos estos componentes del sistema inmunitario para estimar la durabilidad final de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, cuando analizan la cinética de las diferentes inmunoglobulinas por separado observan que los niveles de IgG frente a la proteína S (S, S1, S2 y RBD) y los niveles de IgA se mantienen estables hasta 230 días (71% y 69% de los participantes

permanecieron seropositivos seis meses, respectivamente). Mientras que los niveles de IgG anti-nucleocápside disminuyen a mayor velocidad (Sólo el 26% de los participantes permaneció seropositivo al final del seguimiento). Coincidiendo sus hallazgos de la cinética de la IgG anti-nucleocápside con nuestros resultados.

Con respecto a población general, la información sobre los niveles de anticuerpos después de 4 meses de la primera positividad es escasa. Como sucede con los estudios efectuados en personal sanitario, existen discrepancias entre ellos, sin embargo parece que un elevado número de las cohortes analizadas con seguimientos de 5-6 meses han mostrado altos porcentajes de persistencia de la seropositividad (80% o más)^{246, 247}. Además en todos ellos se aprecia una disminución relevante en los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo. Si bien en estos trabajos, evalúan en profundidad y de forma exhaustiva no sólo la inmunidad humoral (cuantificación de los distintos anticuerpos y capacidad neutralizante), si no también evalúan la inmunidad celular, dando lugar a resultados mucho más completos.

Una de las hipótesis planteadas en esta tesis era que la inmunidad frente a SARS-CoV-2 se mantendría, al menos, el mismo tiempo que se ha demostrado en otros coronavirus como el SARS-CoV y el MERS-CoV. Ambos, comparten características clínicas, genéticas y epidemiológicas similares con el SARS-CoV-2, asimismo el proceso de generación de anticuerpos específicos es equivalente. Por estas razones nos planteamos que la duración de la inmunidad humoral podría ser comparable. Sin embargo, después de obtener los resultados podemos decir que con la detección de IgG anti-nucleocápside esta hipótesis no se cumple.

Lo estudios del SARS-CoV y MERS-CoV como el de *Lin Q et al*²⁴⁸ demuestran que los anticuerpos IgG específicos persisten durante 1 a 2 años después de la infección y disminuyen a partir de entonces.

En una revisión reciente en la que analizan la respuesta inmune después de la infección por SARS-CoV-2, SARS-CoV y MERS-CoV recuperaron veinticinco

estudios sobre el SARS-CoV y observaron que en general la IgG específica se mantuvo durante 1-2 años después de la infección y luego disminuyó. Tres de estos estudios tuvieron un seguimiento de más de 10 años y evaluaron la duración a largo plazo de la IgG, anticuerpos neutralizantes y células T. Curiosamente en uno de ellos se detectaron anticuerpos IgG específicos del SARS-CoV hasta 12 años después de la infección. Los anticuerpos neutralizantes se detectaron hasta 17 años en otro estudio²⁴⁹.

En cuanto al MERS-CoV las publicaciones son escasas, únicamente encontramos tres estudios que informaron que la IgG puede detectarse hasta 2 años después de la infección²⁴⁹.

Sin embargo, incluso si se mantuviese una respuesta inmune durante este período en los tres coronavirus mencionados (SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV) no se sabe si es suficiente para garantizar una protección total.

Es posible que la respuesta de anticuerpos dé lugar a infecciones menos graves o asintomáticas, lo que por otro lado, podría aumentar el riesgo de transmisión a otras personas.

Un mayor grado de exposición del personal sanitario a los pacientes con la COVID-19, (aquellos sujetos previamente clasificados dentro el grupo 1) se asoció a mayor persistencia de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, esta observación puede invitar a la reflexión y puede estar indicando un mecanismo potencial de reexposición viral para mantener los niveles de anticuerpos en los trabajadores sanitarios de primera línea. Estos hallazgos también se encontraron en otro artículo recientemente publicado²⁴².

Otro dato a destacar es que encontramos una relación entre la durabilidad de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 y la sintomatología de los sujetos. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas el porcentaje de sujetos con IgG anti-nucleocápside presentes fue mayor en el grupo de sujetos sintomáticos que en aquellos asintomáticos. Esto está en línea

con diversos estudios que han informado que los anticuerpos persisten durante al menos 6 meses en pacientes graves mientras que en infecciones asintomáticas y enfermedad paucisintomática han mostrado una respuesta inmunitaria humoral débil y no sostenida contra el SARS-CoV-2²⁵⁰. Como los datos de *Long et al*²⁵¹ donde el 40% de los individuos asintomáticos y el 13% del grupo sintomático se volvieron negativos para IgG anti-nucleocápside poco tiempo después de la infección. El factor “síntomas” podría explicar en parte los resultados globales obtenidos en nuestro trabajo, ya que los participantes de nuestra cohorte o eran asintomáticos o bien padecieron síntomas leves. Esto está relacionado con una pérdida temprana de la inmunidad humoral. Probablemente los resultados obtenidos hubieran sido diferentes si la población analizada hubiera sufrido COVID-19 grave.

Curiosamente, también observamos una asociación entre la edad (dentro de esta cohorte de profesionales sanitarios en edad laboral, hasta 65 años) y la durabilidad de la inmunidad humoral. En los tres controles realizados a lo largo del seguimiento la media de edad de los participantes con niveles detectables de IgG anti-nucleocápside fue mayor que en aquellos en los cuales no se detectaron dichos anticuerpos. Siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el primer y segundo control (mes 3 y mes 6). Esto podría indicar que la velocidad con la que se pierden los anticuerpos es mayor cuando se trata de pacientes más jóvenes.

Este hallazgo coincide con dos estudios previos en los cuales el aumento de la edad se asoció con una mayor durabilidad de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 (títulos máximos de IgG anti-nucleocápside y vidas medias más largas)^{237,242}. Se plantea la hipótesis de que esto podría surgir de un refuerzo de anticuerpos IgG antinucleocápside debido a una exposición previa, a otro coronavirus humano circulante, más allá de la reactividad cruzada; la cual es poco común entre coronavirus endémicos y otros coronavirus epidémicos (SARS-CoV y MERS-CoV)^{252,245}.

No obstante, también hemos encontrados que este hallazgo contrasta con un estudio transversal realizado en Reino Unido (REACT2)²⁵³, que informó mayores reducciones a lo largo del tiempo de niveles de anticuerpos en adultos ≥ 65 años en comparación con individuos de entre 18-24 años. Esto se podría explicar porque todos los trabajadores de nuestro estudio tenían < 65 años; al mismo tiempo estas diferencias pueden ser consecuencia del diseño del estudio o del ensayo utilizado.

Queda por determinar si la disminución de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 se asocia con un mayor riesgo de reinfección y enfermedad. Este problema tiene implicaciones especiales en el personal sanitario de primera línea, ya que tienen un riesgo particular debido al contacto cercano con pacientes infectados.

Aunque los casos documentados de reinfección muestran que esto es posible, una cuestión importante a abordar es como de probable es que esto ocurra y el nivel de protección proporcionado por una infección previa.

En el trabajo actual detectamos un solo caso de posible reinfección. Esto está en línea con los hallazgos de *Lumley et al*²³⁷ quienes informaron que la presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 se asocia con una reducción significativa en el riesgo de reinfección del SARS-CoV-2 en los siguientes 6 meses, con solo 2 casos asintomáticos de reinfección y ninguna infección sintomática detectada en sujetos seropositivos. Este estudio estimó que la seropositividad redujo la incidencia de reinfección un 89% durante una mediana de seguimiento de 139 días.

Es importante mencionar que no hay una definición acordada del término reinfección, posiblemente debido al número limitado de tales eventos descritos en la literatura. En muchas ocasiones se confunde con el término “re-detección” refiriéndose a la detección intermitente de ARN residual después de la recuperación.

En un metaanálisis que estudian 1312 casos identificados como posible reinfección, observan que solo dos de estos tuvieron fiebre en el segundo evento

y cumplieron con los criterios de admisión iniciales²⁴⁹. Los autores afirman no haber encontrado reinfecciones realmente probadas y bien documentadas en los artículos analizados; no se realizó secuenciación para comparar el genoma en la primera y en la segunda infección, tampoco se llevó a cabo el cultivo del virus. Defienden el término “re-detección” que podría reflejar el hallazgo de material viral no viable. Otra explicación posible para estos casos “re-detectados” es que la confirmación del aclaramiento del virus en la infección inicial se basara en un resultado falso negativo de la prueba, que podría ocurrir por alguna de las siguientes razones: en primer lugar, existe la posibilidad de errores preanalíticos, (muestra insuficiente, contaminación de las muestras y condiciones inadecuadas de almacenamiento y transporte). En segundo lugar, durante el proceso analítico puede afectar a los resultados la presencia de inhibidores de la PCR o errores humanos. En tercer lugar, la dinámica viral del SARS-CoV-2 a lo largo de la evolución de la infección aún no se comprende completamente, pueden producirse resultados falsos negativos si las muestras se analizan durante la fase de convalecencia tardía, cuando los niveles de virus pueden estar fluctuando. Las pruebas de diagnóstico molecular (RT-PCR) detectan el ARN viral, pero no confirman la presencia de virus vivos. Por lo tanto, los resultados positivos intermitentes de las pruebas pueden reflejar una diseminación inconsistente de virus no viables.

Creemos que es poco probable que estos casos “re-detectados” sean clínicamente o epidemiológicamente importantes, debido a la naturaleza asintomática de la mayoría de los casos y la falta actual de evidencia de que estos casos sean infecciosos para otros. Por otro lado, es probable que exista un subregistro significativo de reinfecciones por SARS-CoV-2 debido, entre otras cosas, a la falta de recursos con los que secuenciar todas las infecciones.

1.3. Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico tras la vacunación)

El último objetivo planteado en este trabajo fue conocer el estado inmunológico como consecuencia de la vacunación y su evolución a lo largo del tiempo, valorando si hay diferencias en función de haber padecido o no la COVID-19.

A medida que las vacunas se han implementan en todo el mundo, una de las cuestiones primordiales es asegurarse de que la vacunación ha sido "eficaz" y llegar a comprender cuánto tiempo es probable que dure la protección. Dado que las vacunas actuales generan una respuesta inmune frente a la proteína S, los títulos de anticuerpos IgG anti-S son un posible marcador de protección, puesto que se asocian con la actividad neutralizante²⁵⁴.

En esta cohorte de trabajadores sanitarios, predominantemente adultos sanos en edad laboral, el 100 % desarrolló anticuerpos IgG anti-spike después de 1 mes de la inoculación de la segunda dosis (vacunación completa), todos ellos mantuvieron niveles de anticuerpos por encima del punto de corte durante los el período de estudio (7 meses).

Esto coincide con otros estudios que ratifican la generación de anticuerpos prácticamente en todos sus participantes después de la vacunación completa²⁵⁵,²⁵⁶. En uno de los estudios más grandes realizado en Israel (cuyo objetivo fue estimar la eficacia de dos dosis de la vacuna Pfizer-BioNTech y evaluar el impacto en la salud pública) observaron que dos dosis son altamente efectivas en todos los grupos de edad para prevenir infecciones sintomáticas y asintomáticas por SARS-CoV-2, hospitalizaciones, enfermedad grave y muerte. En este mismo estudio afirman que hubo una disminución sostenida en la incidencia de SARS-CoV-2 que corresponde al aumento de la cobertura de la vacuna, más allá de las medidas preventivas aplicadas en el país (distanciamiento social, uso de mascarillas, cierre de establecimientos)²⁵⁷.

Muchos de los trabajos publicados hasta el momento demuestran que la mayoría de los individuos desarrollan anticuerpos post-vacunales pocos días después de la primera dosis, habitualmente entre los días 7 y 14²⁵⁸.

Tal y como está diseñado nuestro estudio los niveles máximos de anticuerpos se alcanzaron en el primer control realizado un mes después de la pauta completa, posteriormente fueron disminuyendo gradualmente a lo largo del seguimiento.

Estos hallazgos coinciden en parte con los de *Stephen J. Thomas et al*²⁵⁶ cuyos resultados muestran una tendencia a la disminución en la eficacia de la vacuna después de un seguimiento de 6 meses, no obstante los autores concluyen que la vacuna Pfizer-BioNTech (BNT162b2) tuvo un perfil de seguridad favorable y fue muy eficaz en la prevención de la COVID-19 hasta 6 meses después de la segunda dosis 2 en diversas poblaciones, a pesar de la aparición de variantes del SARS-CoV-2, incluido el linaje B.1.351 (conocido comúnmente como variante sudafricana).

Aunque actualmente no se conocen los títulos de anticuerpos ni tampoco los ensayos que mejor se correlacionan con la eficacia de la vacuna, en otro artículo²⁵⁹ describen los anticuerpos neutralizantes y los de unión provocados por la vacuna Moderna, que al igual que la vacuna Pfizer-BioNTech su componente principal es ARNm y que codifica para la producción de la proteína S de SARS CoV-2. Sus resultados muestran que los anticuerpos generados después de la segunda dosis de la misma persistieron durante 6 meses. Para su detección se usaron tres ensayos serológicos distintos. Curiosamente, los autores no mencionan la disminución observada a lo largo del tiempo. Simplemente confirman que todos los sujetos mantienen anticuerpos por encima del punto de corte finalizado el seguimiento.

Creemos que es necesario un seguimiento continuo para comprender la persistencia del efecto de la vacuna a lo largo del tiempo, plantearse la necesidad de una dosis de refuerzo y el momento de administrar dicha dosis. No

obstante, la observación continua de los individuos inmunizados durante periodos prolongados junto con los datos de efectividad podrá determinar la posibilidad de que un refuerzo sea beneficioso después de un intervalo más largo. Esto quizá deba incluir un seguimiento serológico previo a una tercera dosis, dicho seguimiento puede no ser viable en la población general, sin embargo sería interesante realizarlos en determinados grupos de riesgo, como los inmunodeprimidos (en los cuales ya es inminente la inoculación de esta tercera dosis). Asimismo debería incluirse al personal sanitario, que sin duda tendrá más acceso a la realización de estos estudios que el resto de la población.

En la actualidad ya están en marcha ensayos de refuerzo para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de varias vacunas para hacer frente a esta situación.

Los datos de la literatura sugieren que la edad, el sexo y otros factores como el índice de masa corporal (no evaluado en nuestro estudio), podrían estar asociados con diferencias en las respuestas inmunitarias a las vacunas^{260, 261}.

En nuestro estudio no se encontró una asociación entre niveles de anticuerpos y la edad. Estos hallazgos no coinciden con el ensayo Pfizer-BioNTech que informó que los títulos de neutralización y las concentraciones de anticuerpos de unión a S1 fueron más altas en los participantes más jóvenes (18-55 años) que en los mayores (56-85 años)²⁶², y con otros estudios como el de *Eyre DW et al*²⁶³ realizado a 3610 profesionales sanitarios de diferentes hospitales y en el que concluyen que los más jóvenes eran más propensos a desarrollar anticuerpos, y a tener niveles más altos de los mismos. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse al número de sujetos incluidos en nuestro estudio; posiblemente con un tamaño muestral superior se podrían haber encontrado diferencias en función de la edad, además la edad de los sujetos de nuestro estudio oscilaba entre 25 y 65 años no así en estudios anteriores con edades comprendidas entre 18-85 años.

Se ha demostrado que el envejecimiento da lugar al deterioro gradual del sistema inmune, que implica tanto la capacidad para responder a las infecciones como el desarrollo de la memoria inmune a largo plazo mediante la vacunación. Se han observado diferencias cualitativas en las células B de memoria y también en su comportamiento plasmático en adultos mayores²⁶⁴.

Con la edad se produce la expansión de un subconjunto proinflamatorio de células B, que se ha relacionado con un título reducido de anticuerpos específicos. Muchos estudios demuestran este hecho, en particular con el virus de la influenza y defienden que puede ser válida esta explicación para la mayoría de las vacunas^{265, 264}.

En otros trabajos como el de *Raul Pellini et al*²⁶⁶ además de estudiar la influencia que puede tener la edad en la generación de anticuerpos, cuyos resultados coinciden con lo mencionado anteriormente (los jóvenes parecen tener una mayor capacidad para generar respuestas inmunes humorales); también se analizó el impacto de otros factores como el sexo, observando respuestas de anticuerpos de mayor magnitud en mujeres que en varones en una cohorte de trabajadores sanitarios. Aunque se necesitan más estudios, estos datos pueden tener implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias de vacunación personalizadas para la COVID-19.

La evidencia reciente sugiere que la COVID-19 exhibe diferencias en morbilidad y mortalidad entre sexos. Los pacientes varones tienen casi tres veces más probabilidades de necesitar ingreso en la unidad de cuidados intensivos y mayores probabilidades de muerte en comparación con las mujeres²⁶⁷.

Los resultados de varios estudios^{261,266} también confirmaron esta diferencia en la respuesta a la vacuna.

Está demostrado que las mujeres producen títulos de anticuerpos más altos en respuesta a la vacuna de la gripe estacional (inactivada trivalente/tetravalente)²⁶⁸. Ocurre lo mismo con la mayoría del resto de vacunas utilizadas en la actualidad²⁶⁹. Más concretamente, las mujeres alcanzan títulos

de anticuerpos protectores equivalentes a los de los varones con la mitad de la dosis de la vacuna antigripa; parece ser que los niveles de testosterona en suero se correlacionan inversamente con los títulos de anticuerpos generados en respuesta a la vacuna²⁷⁰.

Ahora bien, no toda la bibliografía defiende esta idea sino que algunos autores como *Stephen J. Thomas et al*²⁵⁶ observan una efectividad similar con semejantes niveles de anticuerpos en diversos perfiles demográficos como el sexo, la etnia incluso en los factores que aumentan el riesgo de la COVID-19, como un IMC alto y otras comorbilidades (hipertensión, obesidad). E igualmente *Haas EJ et al*²⁵⁷ concluye que no hay diferencias ni entre grupos de edad ni en función del género o la etnia. A pesar de ello, este último grupo hace una consideración final recordando que se deberían confirmar estos hallazgos mediante otros estudios longitudinales a más largo plazo. Nuestros resultados están en línea con los últimos estudios mencionados, pues tampoco encontramos asociación entre los títulos de anticuerpos detectados y el sexo ni en el grupo de sujetos naive ni en aquellos con infección previa. Sin embargo, cuando se analizan los niveles de anticuerpos sin tener en cuenta si han padecido la enfermedad o no, los títulos de anticuerpos fueron estadísticamente superiores en los varones en 3 de los 4 controles realizados. Una posible respuesta a este resultado la podría dar un estudio posterior balanceado por sexos.

Se observó que aquellos que habían padecido la infección desarrollaron títulos de anticuerpos IgG anti-spike significativamente más altos. El mayor determinante de la magnitud de las respuestas cuantitativas de anticuerpos fue la infección previa, con lecturas hasta 5 veces más elevadas en sujetos con infección previa en comparación con aquellos sin infección previa en los cuatro controles realizados a lo largo del seguimiento.

En parte, estos mismos resultados han sido secundados en la bibliografía por varios grupos de investigación como el de *Krammer et al*²⁷¹ o el de *Manisty et al*²⁵⁸. Aunque a diferencia de nuestra investigación, ninguno de ellos realiza seguimiento y los datos obtenidos en ambos casos hacen referencia a respuestas generadas en un momento determinado pocos días después de la inoculación de la primera dosis de vacuna.

En uno de sus artículos²⁷¹ describen las respuestas de anticuerpos en 109 individuos con y sin infección previa documentada (41 y 68 sujetos respectivamente). Observan que la mayoría de los individuos sin infección previa presentan respuestas de IgG de SARS-CoV-2 variables y relativamente bajas dentro de los 9-12 días posteriores a la primera dosis de vacunación. Por el contrario, los individuos con infección previa desarrollan rápidamente títulos de anticuerpos altos y uniformes a los pocos días, estos títulos son entre 10 y 20 veces más altos que en los anteriores.

Los hallazgos de este último trabajo²⁷¹ además sugieren que una sola dosis de la vacuna de ARNm provoca respuestas inmunitarias muy rápidas en individuos previamente infectados, sus títulos de anticuerpos posteriores a la vacuna superan los títulos encontrados en individuos sin infección previa que recibieron dos vacunas.

Estos resultados y los de otros estudios similares²⁵⁸ han proporcionado una justificación para actualizar las recomendaciones de las vacunas a nivel mundial y considerar que una sola dosis de vacuna es suficiente para alcanzar la inmunidad en esta población que había sido previamente infectada.

Estamos de acuerdo con esta consideración, sin embargo creemos que sería más conservador el uso de ensayos serológicos cuantitativos ahora disponibles en el mercado, para examinar a los individuos antes de la vacunación si se desconoce el historial de infección. Aunque somos conscientes de los problemas logísticos y económicos que esto supondría, por ello probablemente hasta donde sabemos no se ha puesto en práctica en ningún país.

En nuestra opinión, lo ideal sería una evaluación personalizada de cada individuo, puesto que existen poblaciones determinadas (como se ha mencionado anteriormente en este mismo trabajo), que desarrollan niveles más bajos de anticuerpos independientemente de haber padecido o no la infección en el pasado.

En base a esto, algunos estudios²⁶⁰ defienden que una segunda dosis es importante en cualquier sujeto, pero imprescindible para las personas mayores y grupos de riesgo como la población inmunodeprimida. Destacan la necesidad de evitar la larga brecha que hay entre las dos dosis en algunos países sobre todo en aquellos con menos recursos.

Un reciente estudio muy interesante que analiza las respuestas inmunológicas generadas por la vacuna en pacientes convalecientes (con infección previa) es el de *Zijun Wang et al*²⁷², que indica que la vacunación aumenta todos los componentes de la respuesta humoral y da como resultado actividades de neutralización contra nuevas variantes similares o mayores que la actividad neutralizante lograda contra la cepa original en individuos vacunados sin infección previa.

Parece ser que la vacunación después de la infección por SARS-CoV-2 aumenta el número de células de memoria que se unen al dominio de unión al receptor (RBD) al reclutar nuevos clones de células B y expandir los clones persistentes.

Los clones persistentes se expanden sin acumular un gran número de mutaciones adicionales, lo que indica que la expansión clonal de las células B de memoria humana no requiere la reentrada en los centros germinales y se produce en el compartimento células B activadas²⁷².

Estamos seguros de que es cierta una marcada evolución de neutralización después de la infección con SARS-CoV-2 y hay una mejora sólida de las respuestas serológicas y de la memoria de las células B logradas con la vacunación; las personas convalecientes que están vacunadas deben presentar

altos niveles de protección contra variantes emergentes sin necesidad de modificar vacunas existentes. Sin embargo, si las respuestas de memoria evolucionan de manera similar en individuos *naïve* que reciben vacunas, quizás un refuerzo adicional en el momento apropiado con las vacunas disponibles debería conducir a una inmunidad protectora contra las variantes circulantes en esta población *naïve*.

Nuestros resultados demuestran además de lo anteriormente citado que estas diferencias en las respuestas inmunitarias se mantienen a lo largo del tiempo.

Los ensayos de neutralización son el “gold standard” para evaluar la protección que confiere las vacunas; sin embargo son técnicas laboriosas y requieren personal altamente cualificado.

Se utilizan técnicas serológicas para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG anti-Spike que se correlacionan con la capacidad neutralizante, pero el grado en el que los niveles de estos anticuerpos equivalen a la protección contra la infección u otros criterios, como la hospitalización, la muerte o la transmisión, sigue sin estar claro. Con suerte, en el futuro permitirán la evaluación de la correlación de protección.

Nuestro estudio no tuvo el poder estadístico suficiente para determinar la relación entre los títulos de anticuerpos y la protección, ya que solo hubo un profesional sanitario infectado durante el periodo de estudio en nuestra cohorte.

Se observó diferencias en las concentraciones de anticuerpos entre distintas poblaciones (infección previa); sin embargo, es importante tener en cuenta que otras respuestas inmunes como las células T pueden contribuir a la eficacia de la vacunación. Además, dado que aún no se han determinado las correlaciones de protección, no podemos predecir los títulos de anticuerpos necesarios para la protección.

Por otro lado, las pruebas de anticuerpos posteriores a la vacunación también pueden desempeñar otras funciones. Puede ser útil identificar a las personas de los grupos de alto riesgo que no seroconvierten²⁷³, que pueden seguir teniendo un mayor riesgo de infección y pueden beneficiarse de un asesoramiento personalizado sobre el contacto social y, según la comorbilidad subyacente, de nuevas dosis de vacuna.

En resumen, la vacunación conduce a anticuerpos anti-S detectables en todos los profesionales sanitarios adultos sanos. Se observan respuestas marcadamente más altas a la vacuna después de una infección previa; se podría considerar la vacunación de dosis única o diferida cuando sea necesario ahorrar vacuna en individuos sanos con evidencia sólida de infección previa. Se requiere cierta precaución con la interpretación de los resultados de los anticuerpos y cualquier cambio de comportamiento posterior, ya que a pesar de la buena protección de la vacunación, la seroconversión con niveles altos de anticuerpos todavía no ofrece una protección absoluta contra la infección. Se necesitarán estudios a gran escala para evaluar cómo varía la protección contra la infección según el título de anticuerpos.

Es importante destacar la variabilidad en la toma de decisiones desde que se iniciaron las campañas de vacunación en todo el mundo; en España hay publicadas hasta el momento 8 actualizaciones derivadas de la Estrategia inicial de vacunación frente a COVID-19. Dicha estrategia se ha ido modificando a medida que se ha ido ampliando el conocimiento y se ha ido teniendo en cuenta que el contexto de la pandemia va cambiando. Es de reseñar que en un contexto de escasez de recursos sanitarios se debe llevar a cabo una justa distribución y priorización de las vacunas basándose en la evolución de la pandemia, las novedades sobre el virus, la evolución de la enfermedad y en las indicaciones de las vacunas para los distintos grupos de población.

2. Limitaciones

2.1. Estudio transversal (situación infectiva y estado inmunológico)

Una de las principales limitaciones es el propio diseño de estudio, ya que el enfoque observacional descriptivo no implica necesariamente relaciones de causalidad; este diseño de estudio a veces puede generar factores de confusión cuando se trata de enfermedades poco frecuentes o de corta duración.

Otra limitación ha sido su realización en un único centro teniendo, por tanto, menor validez externa que los estudios multicéntricos.

Otro aspecto a señalar es el limitado número de participantes, incluso incluyendo a todo el personal, lo que puede explicarse por ser un hospital terciario en el que el número de trabajadores no es elevado. Además, las muestras se recogieron durante un período concreto de 40 días por lo que la interpretación de la prevalencia debe estar relacionada con la prevalencia promedio en ese momento.

Por otro lado, sólo se procesaron muestras nasofaríngeas (en lugar de orofaríngeas y nasofaríngeas) para la detección molecular del ARN del SARS-CoV-2. Aunque esto podría reducir la sensibilidad de la rRT-PCR, hay evidencia que demuestra que las muestras nasofaríngeas tienen una mayor tasa de positividad que las muestras orofaríngeas²⁷⁴.

La encuesta epidemiológica proporcionada por el IMPDEF fue autocumplimentada, por lo que algunas preguntas pueden no haber sido correctamente interpretadas. Además, falta información fidedigna sobre el tipo

de contacto con pacientes sospechosos y las medidas de protección personal que se utilizaron en cada caso.

A pesar de que se ha demostrado que las pruebas de quimioluminiscencia muestran una mejor sensibilidad y especificidad diagnóstica frente a otros ensayos inmunológicos como las inmunocromatografías. Los datos precisos de estos dos parámetros (sensibilidad y especificidad) se desconocen, ya que no se dispone de un "Gold standard" para la determinación de anticuerpos contra la infección por SARS-CoV2. Además, la prueba Abbott SARS-CoV-2 IgG disponible en el momento del estudio transversal era limitada, ya que solo detectaba anticuerpos IgG contra la nucleocápside. No se analizaron otros isotipos de inmunoglobulinas y no se puede descartar que algunos individuos pudieran ser positivos para IgA o IgM en el momento de la extracción de sangre.

Por último, se desconoce el tiempo exacto transcurrido entre la exposición y las pruebas de anticuerpos, por lo que es posible que se haya perdido la seropositividad si la prueba se realizó demasiado pronto.

Evolución del estado inmunológico en pacientes IgG positivo

2.2. Estudio prospectivo (evolución del estado inmunológico en pacientes IgG positivos)

Una de las principales limitaciones de la segunda parte de nuestro estudio ha sido el tiempo de seguimiento limitado; si bien el estudio recoge la experiencia durante nueve meses, no se pudo alargar el tiempo que se pretendía (2 años) debido al inicio de la vacunación del personal sanitario. Además, el número de participantes incluidos en este trabajo ha sido limitado debido a la pérdida en el reclutamiento de los participantes: se perdieron 39 (23%) durante el seguimiento.

El aumentar el tamaño muestral nos hubiera permitido quizás encontrar diferencias significativas en determinadas variables, que no se ha podido obtener por ser demasiado pequeña la muestra. Además, algunas variables incluidas en otras series como las comorbilidades, factores de riesgo, o tiempo exacto después de la infección no fueron incluidas en el análisis. Se necesitan más estudios con un mayor número de participantes para lograr una mejor comprensión del papel del huésped y los factores clínicos en los niveles de anticuerpos y su cambio a lo largo del tiempo.

Otro aspecto que reseñar es que en nuestra cohorte, la mayoría de los participantes tuvieron una enfermedad leve. Por lo tanto, la cinética de los anticuerpos puede diferir en pacientes con un cuadro clínico grave. Sin embargo, como las infecciones leves representan la gran mayoría de los casos, su contribución a la protección de la comunidad es la más importante.

Otra limitación de nuestro estudio fue que nuestra cohorte de individuos estaba formada por adultos en edad laboral (18 a 65 años); Se requerirán más estudios longitudinales para investigar los grupos de edades más jóvenes y mayores.

Respecto al diagnóstico serológico, a nivel mundial se utilizan múltiples ensayos diferentes para caracterizar las respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2. Aquí solo evaluamos el impacto de los anticuerpos anti-nucleocápside en la respuesta al SARS-CoV-2; sin embargo, otras clases de anticuerpos y dianas, y aspectos de la inmunidad, incluidas las respuestas innatas y celulares, son importantes para conferir inmunidad postinfección.

2.3. Estudio de cohortes (evolución del estado inmunológico tras la vacunación)

Una de las limitaciones de la última parte de la presente investigación como sucede en las anteriores es que nuestra cohorte representa solo a los

profesionales sanitarios, que suelen ser poblaciones más jóvenes y saludables, nuestro enfoque en un grupo definido es a la vez una fortaleza y una debilidad, no incluimos grupos de alto riesgo ni población pediátrica, sin embargo los profesionales sanitarios son un grupo importante en la población que está en alto riesgo (alta exposición a la COVID-19); además nuestro estudio es un estudio de un solo centro y el número de sujetos incluidos en el estudio fue limitado.

Otra limitación es el uso de un único ensayo para cuantificar los niveles de anticuerpos anti-spike posteriores a la vacuna; sin embargo, dicho ensayo está disponible comercialmente y está bien calibrado, por lo que los resultados deben ser generalizables.

Cabe reseñar que no se evaluaron los efectos adversos a la vacuna, esto podría habernos dado información importante acerca de las diferencias entre los dos grupos analizados, por ejemplo aquellos que habían sufrido la infección frente a los sujetos “naive”, en otros estudios se ha observado que los pacientes previamente infectados desarrollan más efectos secundarios a raíz de la inoculación de la vacuna y además aparecen con más frecuencia después de la segunda dosis.

Aun estando en una población teóricamente saludable, otra limitación a considerar es que no se recogieron datos de comorbilidades.

Otro aspecto a señalar es que nuestra cohorte fue mayoritariamente femenina (76%) y predominantemente de etnia blanca; un sesgo a tener en cuenta.

Por la falta de recursos disponibles, no evaluamos los anticuerpos neutralizantes o las respuestas de las células T, las cuales reflejan la respuesta a la vacuna y pueden variar según la vacuna. Sería ideal poder completar nuestros hallazgos mediante la evaluación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-Spike y mediante la investigación de la respuesta inmune celular. Otro aspecto importante es que realmente en el grupo de pacientes con

infección previa no se puede discernir si los anticuerpos anti-spike detectados se deben únicamente a la vacunación o a la inmunidad natural post-infección.

El tiempo de seguimiento puede ser limitado, sin embargo en la actualidad ya se está inoculando una tercera dosis a algunos grupos de población (inmunodeprimidos), nos ha parecido necesario finalizar el seguimiento para poder informar de los resultados obtenidos que pueden ser de gran utilidad y además así evitar posibles interferencias si ésta tercera dosis de vacuna se llevara a cabo e implicara a la población de nuestro estudio.

Por último, los datos presentados aquí no abordan si la vacunación previene la infección asintomática.

3. Aplicaciones prácticas

A pesar de sus limitaciones, creemos que nuestro estudio podría contribuir a contestar algunas de las preguntas planteadas desde el comienzo de la pandemia: ¿Cuál ha sido la prevalencia del SARS-CoV-2 entre los profesionales sanitarios? ¿Cuál es la duración a largo plazo de la inmunidad después de la infección por SARS-CoV-2? ¿Cuál es la duración de la inmunidad generada por la vacuna frente a la COVID-19?

Los resultados del estudio actual sugieren un papel importante para la detección y el seguimiento serológico y pueden ayudar a comprender la respuesta humoral en los profesionales sanitarios expuestos al SARS-CoV-2.

En esta época de incertidumbre creemos que es importante hacer un seguimiento del título de anticuerpos post-vacunales a los profesionales sanitarios, especialmente por los resultados posiblemente prometedores, lo que supondría un refuerzo positivo para ellos.

Caracterizar la amplitud y la persistencia de las respuestas humorales a lo largo del tiempo frente al SARS-CoV-2 en individuos no hospitalizada es de suma

importancia en términos de salud pública, para evaluar el beneficio potencial de la inmunidad y diseñar futuras intervenciones preventivas.

X. CONCLUSIONES

1. Los datos de seroprevalencia del SARS-CoV-2 entre los profesionales sanitarios de nuestro hospital se encuentran dentro de los límites esperados (16,3%); un porcentaje significativo de nuestros sujetos sufrieron la infección de forma pauci-sintomática o asintomática. El porcentaje de sujetos infectados en el momento del estudio fue bajo (1,1%).
2. La detección de IgG fue mayor en el grupo de Alto riesgo en comparación con el grupo de riesgo moderado y riesgo bajo, además aquellos que recibieron formación específica frente a la COVID-19 tuvieron una tasa de seroprevalencia más baja que los que no recibieron dicha formación, especialmente entre el personal militar.
3. Un alto porcentaje de los profesionales sanitarios no mantuvieron niveles de anticuerpos (IgG anti-nucleocápside) al finalizar el seguimiento. Casi la mitad perdieron los anticuerpos a los 6 meses. La inmunidad frente a SARS-CoV-2 se mantiene durante menos tiempo que el que se demuestra en otros coronavirus como el SARS-CoV y el MERS-CoV.
4. Debido a que los niveles de anticuerpos del SARS-CoV-2 pueden disminuir después de una infección, una prueba serológica negativa no excluye de manera fiable una infección previa, sobretodo en función del ensayo serológico utilizado.
5. Tanto la infección sintomática como el mayor grado de exposición, se asociaron a una mayor persistencia de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2.
6. Todos los profesionales sanitarios de nuestra cohorte desarrollaron inmunidad tras la vacunación y la mantuvieron hasta finalizar el estudio, con disminución de los títulos de anticuerpos IgG anti-spike a lo largo de los 7 meses.
7. Dicha disminución fue más pronunciada en los sujetos sin evidencia de infección previa, independientemente de la edad y el sexo.

8. Los sujetos que habían padecido previamente la enfermedad presentaban concentraciones de Ac muy superiores a los pacientes naive con independencia del sexo y de la edad.
9. Es importante hacer un seguimiento a largo plazo de la inmunidad desarrollada por la vacuna por la posible implicación en las estrategias futuras de prevención y salud pública.

XI. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Piret J, Boivin G. Pandemics Throughout History. *Front Microbiol.* 2021 Jan 15; 11:631736.
- ² Grandes pandemias de la historia [Internet]. *españa.nacionalgeographic*. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: https://historia.nationalgeographic.com.es/a/grandes-pandemias-historia_15178
- ³ Grennan D. What Is a Pandemic? *JAMA.* 2019 Mar 5; 321(9):910.
- ⁴ Cunha, C. B., and Cunha, B. A. (2008). "Great plagues of the past and remaining questions," in *Paleomicrobiology*, (eds) D. Raoult and M. Drancourt (Berlin: Springer), 1–20.
- ⁵ Zietz BP, Dunkelberg H. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *Int J Hyg Environ Health.* 2004 Feb; 207(2):165-78.
- ⁶ Rizzo G, Caroli G. La peste ab antiquo ad oggi e le sue ultime incursioni nell'Italia meridionale [The plague from antiquity to today and its final incursions into southern Italy]. *Ann Ig.* 2002 Jan-Feb; 14(1 Suppl 1):141-52.
- ⁷ Seifert L, Wiechmann I, Harbeck M, Thomas A, Grupe G, Projahn M, et al. Genotyping *Yersinia pestis* in Historical Plague: Evidence for Long-Term Persistence of *Y. pestis* in Europe from the 14th to the 17th Century. *PLoS One.* 2016 Jan 13; 11(1):e0145194.
- ⁸ Spyrou MA, Tukhbatova RI, Feldman M, Drath J, Kacki S, Beltrán de Heredia J, et al. *Y. pestis* Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016 Jun 8; 19(6):874-81.
- ⁹ *Bramanti B, Stenseth NC, Walløe L, Lei X Adv Exp Med Biol.* 2016; 918 (): 1-26.
- ¹⁰ Voigt EA, Kennedy RB, Poland GA. Defending against smallpox: a focus on vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2016 Sep; 15(9):1197-211.

-
- ¹¹ Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Nov; 2(11):909-14.
- ¹² Mills CE, Robins JM, Lipsitch M. Transmissibility of 1918 pandemic influenza. *Nature*. 2004 Dec 16; 432(7019):904-6.
- ¹³ Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 2002 Spring; 76(1):105-15.
- ¹⁴ Morens DM, Taubenberger JK. The Mother of All Pandemics Is 100 Years Old (and Going Strong)! *Am J Public Health*. 2018 Nov; 108(11):1449-1454.
- ¹⁵ Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*. 1989 Nov; 63(11):4603-8.
- ¹⁶ Housworth J, Langmuir AD. Excess mortality from epidemic influenza, 1957-1966. *Am J Epidemiol*. 1974 Jul; 100(1):40-8.
- ¹⁷ Serfling RE, Sherman IL, Houseworth WJ. Excess pneumonia-influenza mortality by age and sex in three major influenza A2 epidemics, United States, 1957-58, 1960 and 1963. *Am J Epidemiol*. 1967 Sep; 86(2):433-41.
- ¹⁸ Robertson I, Caley Jp, Moore J. importance of staphylococcus aureus in pneumonia in the 1957 epidemic of influenza a. *lancet*. 1958 aug 2; 2(7040):233-6.
- ¹⁹ Henderson DA, Courtney B, Inglesby TV, Toner E, Nuzzo JB. Public health and medical responses to the 1957-58 influenza pandemic. *Biosecur Bioterror*. 2009 Sep; 7(3):265-73.

-
- ²⁰ Saunders-Hastings PR, Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens*. 2016 Dec 6; 5(4):66.
- ²¹ Barré-Sinoussi F. L'infection VIH/sida: l'histoire exemplaire d'une épidémie qui résiste [HIV/Aids: the exemplary history of an epidemic which resists]. *Med Sci (Paris)*. 2018 Jun-Jul; 34(6-7):499-500.
- ²² Williams B, Ghosh M, Boucher C, Bushman F, Carrington-Lawrence S, Collman RG, et al. A Summary of the Fourth Annual Virology Education HIV Microbiome Workshop. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2020 May; 36 (5):349-356.
- ²³https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_360_COVID-19.pdf
- ²⁴ Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr 30; 382 (18):1708-1720.
- ²⁵ Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. 23 de enero de 2020; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3>
- ²⁶ Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports [Internet]. [citado 23 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
- ²⁷ Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar; 579(7798):270-273.
- ²⁸ Yu X, Wei D, Chen Y, Zhang D, Zhang X. Retrospective detection of SARS-CoV-2 in hospitalized patients with influenza-like illness. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec; 9(1):1470-1473.

-
- ²⁹ Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200314-sitrep-54-covid-19.pdf?sfvrsn=dcd46351_8
- ³⁰ Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-april-2021>
- ³¹https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Informe_GIV_comunicacion_20210423.pdf
- ³² Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Nov; 24(11 Suppl):S223-7, discussion S226.
- ³³ Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8; 367(19):1814-20.
- ³⁴ Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. *JAMA*. 2020 Feb 25; 323.
- ³⁵ World health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
- ³⁶ Cyranoski D. Mystery deepens over animal source of coronavirus. *Nature*. 2020 Mar; 579(7797):18-19.
- ³⁷ Lam TT, Jia N, Zhang YW, Shum MH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020 Jul; 583(7815):282-285.
- ³⁸ Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382:727-733.

-
- ³⁹ Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May; 581(7809):465-469.
- ⁴⁰ Wang Y, Tong J, Qin Y, et al. Characterization of an asymptomatic cohort of SARS-CoV-2 infected individuals outside of Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 May 22.
- ⁴¹ Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020 Aug 6; 383(6):590-592.
- ⁴² Matson MJ, Yinda CK, Seifert SN, et al. Effect of Environmental Conditions on SARS-CoV-2 Stability in Human Nasal Mucus and Sputum. *Emerg Infect Dis*. 2020 Jun 8; 26(9).
- ⁴³ Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020 Mar 17.
- ⁴⁴ Bin SY, Heo JY, Song MS, et al. Environmental Contamination and Viral Shedding in MERS Patients During MERS-CoV Outbreak in South Korea. *Clin Infect Dis*. 2016 Mar 15; 62(6):755-60.
- ⁴⁵ Ong SWX, Tan YK, Chia PY, et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*. 2020 Mar 4.
- ⁴⁶ Fennelly KP. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. *Lancet Respir Med*. 2020 Sep; 8(9):914-924.
- ⁴⁷ 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*. 2020 May 15; 69(19):606-610.
- ⁴⁸ Miller SL, Nazaroff WW, Jimenez JL, Boerstra A, Buonanno G, Dancer SJ, et al. Transmission of SARS-CoV-2 by inhalation of respiratory aerosol in the Skagit Valley Chorale superspreading event. *Indoor Air*. 2021 Mar; 31(2):314-323.

-
- ⁴⁹ Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020 Mar 12; 26(6).
- ⁵⁰ Ma J, Qi X, Chen H, Li X, Zhang Z, Wang H, et al. COVID-19 patients in earlier stages exhaled millions of SARS-CoV-2 per hour. *Clin Infect Dis.* 2020 Aug 28:ciaa1283.
- ⁵¹ Milton DK. A Rosetta Stone for Understanding Infectious Drops and Aerosols. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2020 Sep 17; 9(4):413-415.
- ⁵² Jones RM, Brosseau LM. Aerosol transmission of infectious disease. *J Occup Environ Med.* 2015 May; 57(5):501-8.
- ⁵³ Fears AC, Klimstra WB, Duprex P, Hartman A, Weaver SC, Plante KS, et al. Persistence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Aerosol Suspensions. *Emerg Infect Dis.* 2020 Sep; 26(9):2168–71.
- ⁵⁴ Shen Y, Li C, Dong H, Wang Z, Martinez L, Sun Z, Handel A, et al. Community Outbreak Investigation of SARS-CoV-2 Transmission Among Bus Riders in Eastern China. *JAMA Intern Med.* 2020 Dec 1; 180(12):1665-1671.
- ⁵⁵ Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 2020 May 18; 39(10):e105114.
- ⁵⁶ Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul; 26(7):1583-1591.
- ⁵⁷ Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, Morwitzer MJ, Creager HM, Santarpia GW, et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep.* 2020 Jul 29; 10(1):12732.

-
- ⁵⁸ Colaneri M, Seminari E, Piralla A, Zuccaro V, Filippo AD, Baldanti F, et al. Lack of SARS-CoV-2 RNA environmental contamination in a tertiary referral hospital for infectious diseases in Northern Italy. *J Hosp Infect.* 2020 Mar 19; 105(3):474–6.
- ⁵⁹ Mondelli MU, Colaneri M, Seminari EM, Baldanti F, Bruno R. Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. *Lancet Infect Dis.* 2021 May; 21(5):e112.
- ⁶⁰ Facchetti F, Bugatti M, Drera E, Tripodo C, Sartori E, Cancila V, et al. SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *EBioMedicine.* 2020 Sep; 59:102951.
- ⁶¹ Schwartz DA, Thomas KM. Characterizing COVID-19 maternal-fetal transmission and placental infection using comprehensive molecular pathology. *EBioMedicine.* 2020 Oct; 60:102983.
- ⁶² Marín Gabriel MA, Cuadrado I, Álvarez Fernández B, et al. Multicentre Spanish study found no incidences of viral transmission in infants born to mothers with COVID-19. *Acta Paediatr.* 2020 Jul 10:10.1111/apa.15474.
- ⁶³ Parasa S, Desai M, Thoguluva Chandrasekar V, et al. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Fecal Viral Shedding in Patients with Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta- analysis. *JAMA Netw Open.* 2020 Jun 1; 3(6):e2011335.
- ⁶⁴ Pan F, Xiao X, Guo J, Song Y, Li H, Patel DP, et al. No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. *Fertil Steril.* 2020 Jun; 113(6):1135-1139.
- ⁶⁵ Scorzolini L, Corpolongo A, Castilletti C, Lalle E, Mariano A, Nicastri E. Comment on the Potential Risks of Sexual and Vertical Transmission of COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19; 71(16):2298.

-
- ⁶⁶ Prazuck T, Giaché S, Gubavu C, et al. Investigation of a family outbreak of COVID-19 using systematic rapid diagnostic tests raises new questions about transmission. *J Infect.* 2020 Oct; 81(4):647-679.
- ⁶⁷ Chang S, Pierson E, Koh PW, et al. Mobility network models of COVID-19 explain inequities and inform reopening. *Nature.* 2020 Nov 10.
- ⁶⁸ Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020 May 29; 368(6494):1016-1020.
- ⁶⁹ Knipe, D.M. Coronaviridae. In: et al. (eds.) *IELDS Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2013. p. 825-858.
- ⁷⁰ Killerby ME, Biggs HM, Haynes A, Dahl RM, Mustaqim D, Gerber SI, et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. *J Clin Virol off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2018; 101:52-6.
- ⁷¹ Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020 Mar 13; 367(6483):1260-1263.
- ⁷² Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020 Apr; 176:104742.
- ⁷³ Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020 May; 581(7807):215-220.
- ⁷⁴ Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res.* 2020 Aug; 51(6):482-491.
- ⁷⁵ 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.* 2020 Apr 16; 181(2):271-280.e8.

-
- ⁷⁶ Gao Y, Yan L, Huang Y, Liu F, Zhao Y, Cao L, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020 May 15; 368(6492):779-782.
- ⁷⁷ Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020 Apr 24; 368(6489):409-412.
- ⁷⁸ Leung K, Shum MH, Leung GM, Lam TT, Wu JT. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill*. 2021 Jan; 26(1).
- ⁷⁹ Volz E, Hill V, McCrone JT, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*. 2021a Jan 7; 184(1):64-75.e11.
- ⁸⁰ Fujino T, Nomoto H, Kutsuna S, Ujiie M, Suzuki T, Sato R, et al. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg Infect Dis*. 2021 Apr; 27(4):1243–5.
- ⁸¹ Tikellis C, Thomas MC. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int J Pept*. 2012; 2012:256294.
- ⁸² Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci*. marzo de 2020; 63(3):364-74.
- ⁸³ Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020 Mar 28; 395(10229):1033-1034.

-
- ⁸⁴ Van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jul; 17(7):407-420.
- ⁸⁵ Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19-26; 420(6917):885-91.
- ⁸⁶ Mei H, Hu Y. [Characteristics, causes, diagnosis and treatment of coagulation dysfunction in patients with COVID-19]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2020 Mar 14; 41(3):185-191. Chinese.
- ⁸⁷ Han H, Yang L, Liu R, Liu F, Wu KL, Li J, Liu XH, Zhu CL. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25; 58(7):1116-1120.
- ⁸⁸ Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020 May 5; 172(9):577-582.
- ⁸⁹ 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 May; 26(5):672-675.
- ⁹⁰ World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
- ⁹¹ Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19; 382(12):1177-1179.
- ⁹² Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr; 20(4):411-412.

-
- ⁹³ Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun; 20(6):656-657.
- ⁹⁴ La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jun; 39(6):1059-1061.
- ⁹⁵ Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jul; 26(7):1017-1032.
- ⁹⁶ Grant MC, Geoghegan L, Arbyn M, Mohammed Z, McGuinness L, Clarke EL, et al. The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. *PLoS One*. 2020 Jun 23; 15(6):e0234765.
- ⁹⁷ 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*. 2020 May 26; 323(20):2052-2059.
- ⁹⁸ Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*. 2020 May 22; 369:m1985.
- ⁹⁹ Argenziano MG, Bruce SL, Slater CL, Tiao JR, Baldwin MR, Barr RG, et al. Characterization and clinical course of 1000 patients with coronavirus disease 2019 in New York: retrospective case series. *BMJ*. 2020 May 29; 369:m1996.
- ¹⁰⁰ Bolay H, Gül A, Baykan B. COVID-19 is a Real Headache! *Headache*. 2020 Jul; 60(7):1415-1421.

-
- ¹⁰¹ Effenberger M, Grabherr F, Mayr L, Schwaerzler J, Nairz M, Seifert M, et al. Faecal calprotectin indicates intestinal inflammation in COVID-19. *Gut*. 2020 Aug; 69(8):1543-1544.
- ¹⁰² Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, Schenck EJ, Chen R, Jabri A, Satlin MJ, et al. Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *N Engl J Med*. 2020 Jun 11; 382(24):2372-2374.
- ¹⁰³ El Moheb M, Naar L, Christensen MA, et al. Gastrointestinal Complications in Critically Ill Patients with and Without COVID-19. *JAMA*. 2020 Sep 24; 324(18):1899-901.
- ¹⁰⁴ Lüers JC, Klußmann JP, Guntinas-Lichius O. Die COVID-19-Pandemie und das HNO-Fachgebiet: Worauf kommt es aktuell an? [The COVID-19 pandemic and otolaryngology: What it comes down to?]. *Laryngorhinootologie*. 2020 May; 99(5):287-291. German.
- ¹⁰⁵ Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Hans S, Barillari MR, Jouffe L, Saussez S. Loss of Smell and Taste in 2013 European Patients With Mild to Moderate COVID-19. *Ann Intern Med*. 2020 Oct 20; 173(8):672-675.
- ¹⁰⁶ Kirschenbaum D, Imbach LL, Ulrich S, Rushing EJ, Keller E, Reimann RR, et al. Inflammatory olfactory neuropathy in two patients with COVID-19. *Lancet*. 2020 Jul 18; 396(10245):166.
- ¹⁰⁷ Fodoulian L, Tuberosa J, Rossier D, et al. SARS-CoV-2 Receptors and Entry Genes Are Expressed in the Human Olfactory Neuroepithelium and Brain. *iScience*. 2020 Dec 18; 23(12):101839.
- ¹⁰⁸ Bonow RO, Fonarow GC, O'Gara PT, Yancy CW. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol*. 2020 Jul 1; 5(7):751-753.

-
- ¹⁰⁹ Hendren NS, Drazner MH, Bozkurt B, Cooper LT Jr. Description and Proposed Management of the Acute COVID-19 Cardiovascular Syndrome. *Circulation*. 2020 Jun 9; 141(23):1903-1914.
- ¹¹⁰ Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020 May 2; 395(10234):1417-1418.
- ¹¹¹ Mei H, Hu Y. [Characteristics, causes, diagnosis and treatment of coagulation dysfunction in patients with COVID-19]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2020 Mar 14; 41(3):185-191. Chinese.
- ¹¹² Roncon L, Zuin M, Barco S, et al. Incidence of acute pulmonary embolism in COVID-19 patients: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med*. 2020 Sep 17:S0953-6205(20)30349-6.
- ¹¹³ Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol*. 2020 Aug 1; 77(8):1018-1027.
- ¹¹⁴ Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020 May; 17(5):259-260.
- ¹¹⁵ Fernandez-Nieto D, Jimenez-Cauhe J, Suarez-Valle A, Moreno-Arrones OM, Saceda-Corralo D, Arana-Raja A, et al. Comment on "Characterization of acute acro-ischemic lesions in non-hospitalized patients: A case series of 132 patients during the COVID-19 outbreak". *J Am Acad Dermatol*. 2020 Sep; 83(3):e241.
- ¹¹⁶ Meduri A, Oliverio GW, Mancuso G, Giuffrida A, Guarneri C, Venanzi Rullo E, Nunnari G, Aragona P. Ocular surface manifestation of COVID-19 and tear film analysis. *Sci Rep*. 2020 Nov 19; 10(1):20178.
- ¹¹⁷ Chen L, Deng C, Chen X, Zhang X, Chen B, Yu H, Qin Y, Xiao K, Zhang H, Sun X. Ocular manifestations and clinical characteristics of 535 cases of COVID-19 in

Wuhan, China: a cross-sectional study. *Acta Ophthalmol.* 2020 Dec; 98(8):e951-e959.

¹¹⁸ Amenta EM, Spallone A, Rodriguez-Barradas MC, El Sahly HM, Atmar RL, Kulkarni PA. Postacute COVID-19: An Overview and Approach to Classification. *Open Forum Infect Dis.* 2020 Oct 21; 7(12):ofaa509.

¹¹⁹ Mahase E. Long covid could be four different syndromes, review suggests. *BMJ.* 2020 Oct 14; 371:m3981.

¹²⁰ Cramer GAG, Bielecki M, Züst R, Buehrer TW, Stanga Z, Deuel JW. Reduced maximal aerobic capacity after COVID-19 in young adult recruits, Switzerland, May 2020. *Euro Surveill.* 2020 Sep; 25(36):2001542.

¹²¹ Sonnweber T, Sahanic S, Pizzini A, Luger A, Schwabl C, Sonnweber B, et al. Cardiopulmonary recovery after COVID-19: an observational prospective multicentre trial. *Eur Respir J.* 2021 Apr 29; 57(4):2003481.

¹²² INFORME TÉCNICO. Información clínica COVID-19. Actualización; 25 de marzo 2021. Ministerio de Sanidad. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Documento_CLINICA.pdf

¹²³ Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2020 Sep 22; 17(9):e1003346.

¹²⁴ Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020 Mar; 25(10):2000180.

-
- ¹²⁵ Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, Hu JL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020 Aug; 26(8):1200-1204.
- ¹²⁶ Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med.* 2020 Nov; 26(11):1691-1693.
- ¹²⁷ Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, Xu H. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *JAMA.* 2020 Apr 21; 323(15):1502-1503.
- ¹²⁸ Yuan J, Kou S, Liang Y, Zeng J, Pan Y, Liu L. Polymerase Chain Reaction Assays Reverted to Positive in 25 Discharged Patients With COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19; 71(16):2230-2232.
- ¹²⁹ To KK, Hung IF, Ip JD, Chu AW, Chan WM, Tam AR, Fong CH, et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin Infect Dis.* 2020 Aug 25:ciaa1275.
- ¹³⁰ COVID-19 reinfection tracker [Internet]. 2020 [citado 21 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://bnonews.com/index.php/2020/08/covid-19-reinfection-tracker/>
- ¹³¹ Larson D, Brodniak SL, Voegtly LJ, Cer RZ, Glang LA, Malagon FJ, et al. A Case of Early Re-infection with SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis.* 2020 Sep 19:ciaa1436.
- ¹³² Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020 Aug; 81(2):266-275.
- ¹³³ Davis B, Rothrock AN, Swetland S, Andris H, Davis P, Rothrock SG. Viral and atypical respiratory co-infections in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Emerg Physicians Open.* 2020 Jun 19; 1(4):533–48.
- ¹³⁴ Ma S, Lai X, Chen Z, Tu S, Qin K. Clinical characteristics of critically ill patients co-infected with SARS-CoV-2 and the influenza virus in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020 Jul; 96:683-687.

¹³⁵ INFORME TÉCNICO. Información microbiológica acerca de SARS-CoV-2. Actualización; 25 de marzo 2021. Ministerio de Sanidad. Disponible en: https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV/documentos/Documento_MICROBIOLOGIA.pdf

¹³⁶ Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020.

¹³⁷ Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. <https://www.who.int/publicationsdetail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

¹³⁸ INFORME TÉCNICO. Una visión global de la pandemia. Septiembre 2020. Ministerio de ciencia e innovación. Disponible en: https://coma.es/wp-content/plugins/pdf-viewer/stable/web/viewer.html?file=https://coma.es/wpcontent/uploads/2020/09/informe_cov19_pti_salud_global_csic_v2_1.pdf

¹³⁹ Bhusal L, Amgain K, Dangal G, Tamang PD, Shahi P, Budhathoki P, Paudel AK. Virology, Clinical Features and Diagnosis of COVID 19: Review Analysis. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*. 2020 COVID-19 SPECIAL ISSUE; 18(70):75-79.

¹⁴⁰ Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020 Jul; 38(7):870-874.

¹⁴¹ Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt Chem.* 2018 Jan; 98:19-35.

¹⁴² Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ.* 2020 Apr 21; 369:m1443.

-
- ¹⁴³ Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020 Jun 9; 323(22):2249-2251.
- ¹⁴⁴ World Health Organization. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. Scientific brief. 8 April 2020. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/sb-2020-1-poc-immunodiagnosics-2020-04-08-e.pdf?sfvrsn=4c26ac39_2
- ¹⁴⁵ Venter M, Richter K. Towards effective diagnostic assays for COVID-19: a review. *J Clin Pathol*. 2020 Jul; 73(7):370-377.
- ¹⁴⁶ 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 Nov 19; 71(16):2027-2034.
- ¹⁴⁷ Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez 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 Jun 11; 5(48):eabc8413.
- ¹⁴⁸ Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020 Sep; 92(9):1518-1524.
- ¹⁴⁹ Ghaffari H, Tavakoli A, Moradi A, Tabarraei A, Bokharaei-Salim F, Zahmatkeshan M, et al. Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. *J Biomed Sci*. 2019 Sep 10; 26(1):70.
- ¹⁵⁰ Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, Cray C. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 Aug 5; 154(3):293-304.
- ¹⁵¹ Nicol T, Lefevre C, Serri O, Pivert A, Joubaud F, Dubée V, et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the

evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol.* 2020 Aug; 129:104511.

¹⁵² Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. AEMPS. Tratamientos disponibles sujetos a condiciones especiales de acceso para el manejo de la infección respiratoria por SARS-CoV-2. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%9119/tratamientos-disponibles-para-el-manejo-de-la-infeccion-respiratoria-por-sars-cov-2/>

¹⁵³ Altay O, Mohammadi E, Lam S, Turkez H, Boren J, Nielsen J, Uhlen M, Mardinoglu A. Current Status of COVID-19 Therapies and Drug Repositioning Applications. *iScience.* 2020 Jul 24; 23(7):101303.

¹⁵⁴ Colson P, Rolain JM, Lagier JC, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 Apr; 55(4):105932.

¹⁵⁵ Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel Med Infect Dis.* 2020 Mar-Apr; 34:101663.

¹⁵⁶ Universidad de Oxford. Comunicado de prensa: State-ment from the Chief Investigators of RECOVERY Trial on hy-droxychloroquine, 5 June 2020. No clinical benefit from use of hydroxychloroquine in hospitalised patients with COVID-19. Dis-ponible en: <https://www.recoverytrial.net/files/hcq-recovery-statement-050620-final-002.pdf>.

¹⁵⁷ WHO Solidarity Trial Consortium, Pan H, Peto R, Henao-Restrepo AM, Preziosi MP, Sathiyamoorthy V, et al. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med.* 2021 Feb 11; 384(6):497-511.

¹⁵⁸ Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7; 382(19):1787-1799.

¹⁵⁹ Universidad de Oxford. Comunicado de prensa: State-ment from the Chief Investigators of RECOVERY Trial on lop-inavir-ritonavir, 29 June 2020. No clinical benefit from use of lopi-navir-ritonavir in hospitalised COVID-19 patients studied in RECOVERY. Disponible en: https://www.recoverytrial.net/files/lo-pinavir-ritonavir-recovery-statement-29062020_final.pdf

¹⁶⁰ Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul; 39(5):529-539.

¹⁶¹ Universidad de Oxford. Comunicado de prensa: Dexametasona reduce la mortalidad hasta un tercio en pacientes hospitalizados con complicaciones severas por COVID-19. 16 de junio. Disponible en: https://www.recoverytrial.net/files/dexamethasone-press-re-lease-spanish-translation_190620-final.pdf.

¹⁶² Angus DC, Derde L, Al-Beidh F, Annane D, Arabi Y, Beane A, et al. Effect of Hydrocortisone on Mortality and Organ Support in Patients With Severe COVID-19: The REMAP-CAP COVID-19 Corticosteroid Domain Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020 Oct 6; 324(13):1317-1329.

¹⁶³ WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Sterne JAC, Murthy S, Diaz JV, Slutsky AS, Villar J, et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 2020 Oct 6; 324(13):1330-1341.

¹⁶⁴ Alegre-Del Rey EJ, Gil-Sierra MD, Alarcón de la Lastra-Romero C, Sánchez-Hidalgo M. Remdesivir and mortality reduction in COVID-19 patients: a

systematized subgroup analysis of clinical trials. *Farm Hosp.* 2021 Jan 13; 45(1):28-31.

¹⁶⁵ Mulangu S, Dodd LE, Davey RT Jr, Tshiani Mbaya O, Proschan M, Mukadi D, et al. A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics. *N Engl J Med.* 2019 Dec 12; 381(24):2293-2303.

¹⁶⁶ Contini C, Enrica Gallenga C, Neri G, Maritati M, Conti P. A new pharmacological approach based on remdesivir aerosolized administration on SARS-CoV-2 pulmonary inflammation: A possible and rational therapeutic application. *Med Hypotheses.* 2020 Nov; 144:109876.

¹⁶⁷ Chavis S, Ganesh N. Respiratory Hygiene and Cough Etiquette. *Infection Control in the Dental Office* 2019; 91-103.

¹⁶⁸ Kwok YL, Gralton J, McLaws ML. Face touching: a frequent habit that has implications for hand hygiene. *Am J Infect Control.* 2015 Feb; 43(2):112-4.

¹⁶⁹ Kratzel A, Todt D, V'kovski P, Steiner S, Gultom M, Thao TTN, et al. Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 by WHO-Recommended Hand Rub Formulations and Alcohols. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul; 26(7):1592-1595.

¹⁷⁰ Meselson M. Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020 May 21; 382(21):2063.

¹⁷¹ Howard J, Huang A, Li Z, Tufekci Z, Zdimal V, Van der Westhuizen HM, et al. An evidence review of face masks against COVID-19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jan 26; 118(4):e2014564118.

¹⁷² Zhang J, Litvinova M, Liang Y, Wang Y, Wang W, Zhao S, Wu Q, Merler S, Viboud C, Vespignani A, Ajelli M, Yu H. Changes in contact patterns shape the dynamics of the COVID-19 outbreak in China. *Science.* 2020 Jun 26; 368(6498):1481-1486.

-
- ¹⁷³ Du Z, Xu X, Wang L, Fox SJ, Cowling BJ, Galvani AP, Meyers LA. Effects of Proactive Social Distancing on COVID-19 Outbreaks in 58 Cities, China. *Emerg Infect Dis.* 2020 Sep; 26(9):2267–9.
- ¹⁷⁴ Chu DK, Akl EA, Duda S, Solo K, Yaacoub S, Schünemann HJ, et al. COVID-19 Systematic Urgent Review Group Effort (SURGE) study authors. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2020 Jun 27; 395(10242):1973-1987.
- ¹⁷⁵ Alagoz O, Sethi AK, Patterson BW, Churpek M, Safdar N. Effect of Timing of and Adherence to Social Distancing Measures on COVID-19 Burden in the United States : A Simulation Modeling Approach. *Ann Intern Med.* 2021 Jan; 174(1):50-57.
- ¹⁷⁶ Jones NR, Qureshi ZU, Temple RJ, Larwood JPJ, Greenhalgh T, Bourouiba L. Two metres or one: what is the evidence for physical distancing in covid-19? *BMJ.* 2020 Aug 25; 370:m3223.
- ¹⁷⁷ Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, Peiris M, Poon LLM. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe.* 2020 May; 1(1):e10.
- ¹⁷⁸ Discontinuation of Isolation for Persons with COVID-19 Not in Healthcare Settings. US CDC Interim Guidance Updated February 13, 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
- ¹⁷⁹ Little P, Read RC, Amlôt R, et al. Reducing risks from coronavirus transmission in the home—the role of viral load. *BMJ.* 2020 May 6; 369:m1728.
- ¹⁸⁰ Bi Q, Wu Y, Mei S, et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 Apr 27:S1473-3099(20)30287-5.

¹⁸¹ Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation WHO Scientific Brief, 17 June 2020 <https://www.who.int/publications/i/item/criteria-forreleasing-covid-19-patients-from-isolation>.

¹⁸² Muge Cevik, Matthew Tate, Oliver Lloyd, Alberto Enrico Maraolo, Jenna Schafers, Antonia Ho SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERSCoV viral load dynamics, duration of viral shedding and infectiousness: a living systematic review and meta-analysis medRxiv 2020.07.25.20162107.

¹⁸³ Steinbrook R. Contact Tracing, Testing, and Control of COVID-19-Learning From Taiwan. JAMA Intern Med. 2020 Sep 1; 180(9):1163-1164.

¹⁸⁴ Cheng HY, Jian SW, Liu DP, Ng TC, Huang WT, Lin HH; Taiwan COVID-19 Outbreak Investigation Team. Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods before and After Symptom Onset. JAMA Intern Med. 2020 Sep 1; 180(9):1156-1163.

¹⁸⁵ McCloskey B, Zumla A, Ippolito G, Blumberg L, Arbon P, Cicero A, et al. WHO Novel Coronavirus-19 Mass Gatherings Expert Group. Mass gathering events and reducing further global spread of COVID-19: a political and public health dilemma. Lancet. 2020 Apr 4; 395(10230):1096-1099.

¹⁸⁶ Hufnagel L, Brockmann D, Geisel T. Forecast and control of epidemics in a globalized world. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 19; 101(42):15124-9.

¹⁸⁷ WHO International Health Regulations, WHA 58.3, 2nd edn. World Health Organization, Geneva 2005 <https://www.who.int/ihr/9789241596664/en/>

¹⁸⁸ Devi S. Travel restrictions hampering COVID-19 response. Lancet. 2020 Apr 25; 395(10233):1331-1332.

¹⁸⁹ INFORME TÉCNICO. Información sobre inmunidad y desarrollo de vacunas. Actualización; 30 de abril 2021. Ministerio de Sanidad. Disponible en: https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV/documentos/20210430_INMUNIDAD_Y_VACUNAS.pdf

-
- ¹⁹⁰ Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021 Feb 18; 184(4):861-880.
- ¹⁹¹ Amor S, Fernández Blanco L, Baker D. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clin Exp Immunol*. 2020 Nov; 202(2):193-209.
- ¹⁹² Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021 Feb; 21(2):73-82.
- ¹⁹³ Porter KR, Raviprakash K. DNA Vaccine Delivery and Improved Immunogenicity. *Curr Issues Mol Biol*. 2017; 22:129-138.
- ¹⁹⁴ Morris SJ, Turner AV, Green N, Warimwe GM. Laboratory-Scale Production of Replication-Deficient Adenovirus Vected Vaccines. *Methods Mol Biol*. 2016; 1349:121-35.
- ¹⁹⁵ Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2018 Mar; 48(2):231-241.
- ¹⁹⁶ Jain NK, Sahni N, Kumru OS, Joshi SB, Volkin DB, Russell Middaugh C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Oct 1; 93:42-55.
- ¹⁹⁷ Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 31; 383(27):2603-2615.
- ¹⁹⁸ European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
- ¹⁹⁹ Blumenthal KG, Robinson LB, Camargo CA Jr, Shenoy ES, Banerji A, Landman AB, Wickner P. Acute Allergic Reactions to mRNA COVID-19 Vaccines. *JAMA*. 2021 Apr 20; 325(15):1562-1565.

-
- ²⁰⁰ Amit S, Regev-Yochay G, Afek A, Kreiss Y, Leshem E. Early rate reductions of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 in BNT162b2 vaccine recipients. *Lancet*. 2021 Mar 6; 397(10277):875-877.
- ²⁰¹ Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, Hernán MA, Lipsitch M, Reis B, Balicer RD. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N Engl J Med*. 2021 Apr 15; 384(15):1412-1423.
- ²⁰² PHE monitoring of the effectiveness of COVID-19 vaccination [Internet]. GOV.UK. [citado 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/phe-monitoring-of-the-effectiveness-of-covid-19-vaccination>
- ²⁰³ Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med*. 2020 Oct 15; 383(16):1544-1555.
- ²⁰⁴ Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020 Nov 12; 383(20):1920-1931.
- ²⁰⁵ Forni G, Mantovani A; COVID-19 Commission of Accademia Nazionale dei Lincei, Rome. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ*. 2021 Feb; 28(2):626-639.
- ²⁰⁶ Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Oxford COVID Vaccine Trial Group. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet*. 2021 Mar 6; 397(10277):881-891.
- ²⁰⁷ Emary KRW, Golubchik T, Aley PK, Ariani CV, Angus B, Bibi S, et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2021 Apr 10; 397(10282):1351-1362.

-
- ²⁰⁸ PINHO AC. EMA recommends COVID-19 Vaccine Janssen for authorisation in the EU [Internet]. European Medicines Agency. 2021 [citado 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-covid-19-vaccine-janssen-authorisation-eu>
- ²⁰⁹ Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, et al. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 10; 383(24):2320-2332.
- ²¹⁰ Baraniuk C. Covid-19: What do we know about Sputnik V and other Russian vaccines? *BMJ*. 2021 Mar 19; 372:n743.
- ²¹¹ Wu Z, Hu Y, Xu M, Chen Z, Yang W, Jiang Z, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 2021 Feb 3:S1473-3099(20)30987-7.
- ²¹² Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, Wu SP, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020 Jun 13; 395(10240):1845-1854.
- ²¹³ 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*. 2020 Jun 25; 6(6):CD013652.
- ²¹⁴ Observatorio de resultados del Servicio Madrileño de Salud. <https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/observatorio-resultados-servicio-madrileno-salud>. Accessed May 27, 2021.
- ²¹⁵ Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, Plotkin S, Knezevic I. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *Lancet*. 2021 Apr 10; 397(10282):1347-1348.

-
- ²¹⁶ Auerswald H, Yann S, Dul S, In S, Dussart P, Martin NJ, Karlsson EA, Garcia-Rivera JA. Assessment of inactivation procedures for SARS-CoV-2. *J Gen Virol.* 2021 Mar;102(3)
- ²¹⁷ Pastorino B, Touret F, Gilles M, Luciani L, de Lamballerie X, Charrel RN. Evaluation of Chemical Protocols for Inactivating SARS-CoV-2 Infectious Samples. *Viruses.* 2020 Jun 8; 12(6):624.
- ²¹⁸ Farfour E, Lesprit P, Visseaux B, Pascreau T, Jolly E, Houhou N, Mazaux L, Asso-Bonnet M, Vasse M; SARS-CoV-2 Foch Hospital study group. The Allplex 2019-nCoV (Seegene) assay: which performances are for SARS-CoV-2 infection diagnosis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Oct; 39(10):1997-2000.
- ²¹⁹ Sacristan MS, Collazos-Blanco A, Cintas MIZ, García AS, de Villavicencio CY, Maestre MM. Comparison of various serological assays for novel SARS-COV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 May; 40(5):963-968.
- ²²⁰ Ng DL, Goldgof GM, Shy BR, Levine AG, Balcerek J, Bapat SP, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood. *Nat Commun.* 2020 Sep 17; 11(1):4698.
- ²²¹ Luchsinger LL, Ransegnola BP, Jin DK, Muecksch F, Weisblum Y, Bao W, George PJ, Rodriguez M, et al. Serological Assays Estimate Highly Variable SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Activity in Recovered COVID-19 Patients. *J Clin Microbiol.* 2020 Nov 18; 58(12):e02005-20.
- ²²² Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet.* 2020 Aug 22; 396(10250):535-544.
- ²²³ <https://www.comunidad.madrid/comunicado/2020/04/08/comunidad-madrid-elabora-mapa-interactivo-coronavirus-distritos-municipios-region>

-
- ²²⁴ Galan I, Velasco M, Casas ML, Goyanes MJ, Rodriguez-Caravaca G, Losa JE, et al. SARS CoV-2 seroprevalence among all workers in a teaching hospital in Spain: unmasking the risk. medRxiv 2020. 05.29.20116731.
- ²²⁵ Garcia-Basteiro AL, Moncunill G, Tortajada M, Vidal M, Guinovart C, Jiménez A, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among health care workers in a large Spanish reference hospital. Nat Commun. 2020 Jul 8; 11(1):3500.
- ²²⁶ Zhou Q, Gao Y, Wang X, Liu R, Du P, Wang X, et al. COVID-19 Evidence and Recommendations Working Group. Nosocomial infections among patients with COVID-19, SARS and MERS: a rapid review and meta-analysis. Ann Transl Med. 2020 May; 8(10):629.
- ²²⁷ Evans S, Agnew E, Vynnycky E, Stimson J, Bhattacharya A, Rooney C, et al. The impact of testing and infection prevention and control strategies on within-hospital transmission dynamics of COVID-19 in English hospitals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2021 Jul 19; 376(1829):20200268.
- ²²⁸ Galanis P, Vraka I, Fragkou D, Bilali A, Kaitelidou D. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and associated factors in healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. J Hosp Infect. 2021 Feb; 108:120-134.
- ²²⁹ Fernandez-Rivas G, Quirant-Sanchez B, Gonzalez V, Dolade M, Martinez-Caceres E, Piña M, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 IgG specific antibodies among healthcare workers in the northern metropolitan area of Barcelona, Spain, after the first pandemic wave. medRxiv 2020. 06.24.20135673.
- ²³⁰ Olalla J, Correa AM, Martín-Escalante MD, Hortas ML, Martín-Sendarrubias MJ, Fuentes V, et al. Search for asymptomatic carriers of SARS-CoV-2 in healthcare workers during the pandemic: a Spanish experience. QJM 2020; 10:hcaa238.

-
- ²³¹ Sahu AK, Amrithanand VT, Mathew R, Aggarwal P, Nayer J, Bhoi S. COVID-19 in health care workers - A systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2020 Sep; 38(9):1727-1731.
- ²³² Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020 Apr 7; 323(13):1239-1242.
- ²³³ Versen K, Bundgaard H, Hasselbalch RB, Kristensen JH, Nielsen PB, Pries-Heje M, et al. Risk of COVID-19 in health-care workers in Denmark: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 Dec;20(12):1401-1408
- ²³⁴ Ran L, Chen X, Wang Y, Wu W, Zhang L, Tan X. Risk Factors of Healthcare Workers With Coronavirus Disease 2019: A Retrospective Cohort Study in a Designated Hospital of Wuhan in China. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19; 71(16):2218-2221.
- ²³⁵ Keeley AJ, Evans C, Colton H, Ankcorn M, Cope A, State A, Bennett T, Giri P, de Silva TI, Raza M. Roll-out of SARS-CoV-2 testing for healthcare workers at a large NHS Foundation Trust in the United Kingdom, March 2020. *Euro Surveill.* 2020 Apr; 25(14):2000433.
- ²³⁶ 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.* 2020 Nov 27; 69(47):1762-1766.
- ²³⁷ Lumley SF, Wei J, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, et al. The duration, dynamics and determinants of SARS-CoV-2 antibody responses in individual healthcare workers. *Clin Infect Dis.* 2021 Jan 6:ciab004.
- ²³⁸ Muecksch F, Wise H, Batchelor B, Squires M, Semple E, Richardson C, et al. Longitudinal Serological Analysis and Neutralizing Antibody Levels in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Patients. *J Infect Dis.* 2021 Feb 13; 223(3):389-398.

-
- ²³⁹ Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020 Oct 29; 383(18):1724-1734.
- ²⁴⁰ 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 among hospital workers: a prospective longitudinal study. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jan 20; 27(5):784.e1–8.
- ²⁴¹ Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol*. 1996 Feb; 26(2):444-8.
- ²⁴² Varona JF, Madurga R, Peñalver F, Abarca E, Almirall C, Cruz M, Ramos E, Castellano-Vazquez JM. Kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibodies over time. Results of 10 month follow up in over 300 seropositive Health Care Workers. *Eur J Intern Med*. 2021 Jul; 89:97-103.
- ²⁴³ Pradenas E, Trinité B, Urrea V, Marfil S, Ávila-Nieto C, Rodríguez de la Concepción ML, et al. Stable neutralizing antibody levels 6 months after mild and severe COVID-19 episodes. *Med (N Y)*. 2021 Mar 12; 2(3):313-320.e4.
- ²⁴⁴ Whitcombe AL, McGregor R, Craigie A, James A, Charlewood R, Lorenz N, et al. Comprehensive analysis of SARS-CoV-2 antibody dynamics in New Zealand. *Clin Transl Immunology*. 2021 Mar 14; 10(3):e1261.
- ²⁴⁵ Ortega, N., Ribes, M., Vidal, M. *et al*. Seven-month kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and role of pre-existing antibodies to human coronaviruses. *Nat Commun* 12, 4740 (2021).
- ²⁴⁶ Sherina N, Piralla A, Du L, Wan H, Kumagai-Braesch M, Andréll J, et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med (N Y)*. 2021 Mar 12; 2(3):281-295.e4.

-
- ²⁴⁷ Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, Nakao C, Rayaprolu V, Rawlings SA, Peters B, Krammer F, Simon V, Saphire EO, Smith DM, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021 Feb 5; 371(6529):eabf4063.
- ²⁴⁸ Lin Q, Zhu L, Ni Z, Meng H, You L. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020 Oct; 53(5):821-822.
- ²⁴⁹ O Murchu E, Byrne P, Walsh KA, Carty PG, Connolly M, De Gascun C, Jordan K, Keoghan M, O'Brien KK, O'Neill M, Smith SM, Teljeur C, Ryan M, Harrington P. Immune response following infection with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A rapid review. *Rev Med Virol*. 2021 Mar; 31(2):e2162.
- ²⁵⁰ Anichini G, Gandolfo C, Terrosi C, Fabrizi S, Miceli GB, Gori Savellini G, Prathyumnann S, Franchi F, Cusi MG. Antibody response to SARS-CoV-2 in infected patients with different clinical outcome. *J Med Virol*. 2021 Apr; 93(4):2548-2552.
- ²⁵¹ Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, Hu JL, Xu W, Zhang Y, Lv FJ, Su K, Zhang F, Gong J, Wu B, Liu XM, Li JJ, Qiu JF, Chen J, Huang AL. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020 Aug; 26(8):1200-1204.
- ²⁵² 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 Sep 17; 11(1):4704.
- ²⁵³ Ward, H., G. Cooke, C. Atchison, M. Whitaker, J. Elliott, M. Moshe, J. Brown, B. Flower, A. Daunt, K. Ainslie, D. Ashby, C. Donnelly, S. Riley, A. Darzi, W. Barclay and P. Elliott. "Declining prevalence of antibody positivity to SARS-CoV-2: a community study of 365,000 adults." *medRxiv* (2020): n. pag.

²⁵⁴ 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*. 2020 Dec 4; 370(6521):1227-1230.

²⁵⁵ Favresse J, Bayart JL, Mullier F, Dogné JM, Closset M, Douxfils J. Early antibody response in health-care professionals after two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine (BNT162b2). *Clin Microbiol Infect*. 2021 May 8:S1198-743X (21)00224-X.

²⁵⁶ Stephen J. Thomas, Edson D. Moreira Jr., Nicholas Kitchin, Judith Absalon, Alejandra Gurtman, Stephen Lockhart, et al. Six Month Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. medRxiv [Internet]. 28 de julio de 2021. doi.org/10.1101/2021.07.28.21261159 doi.org/10.1101/2021.03.17.20200246.

²⁵⁷ Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021 May 15; 397(10287):1819-1829.

²⁵⁸ Manistry C, Otter AD, Treibel TA, McKnight Á, Altmann DM, Brooks T, Noursadeghi M, Boyton RJ, Semper A, Moon JC. Antibody response to first BNT162b2 dose in previously SARS-CoV-2-infected individuals. *Lancet*. 2021 Mar 20; 397(10279):1057-1058.

²⁵⁹ Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O'Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Jun 10; 384(23):2259-2261.

²⁶⁰ Lustig Y, Sapir E, Regev-Yochay G, Cohen C, Fluss R, Olmer L, et al. BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal cohort study in health-care workers. *Lancet Respir Med*. 2021 Jul 2:S2213-2600(21)00220-4.

²⁶¹ Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F, Abril E, Blandino G, Campo F, et al. Early Onset of SARS-COV-2 Antibodies after First Dose of BNT162b2: Correlation with Age, Gender and BMI. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 22; 9(7):685.

²⁶² Department of Health and Social Care (DHSC). Public assessment report authorisation for temporary supply. COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2.

https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/944544/COVID19_mRNA_Vaccine_BNT162b2__UKPAR__PFIZER_BIONTECH__15Dec2020.pdf

²⁶³ Eyre DW, Lumley SF, Wei J, Cox S, James T, Justice A, et al. Quantitative SARS-CoV-2 anti-spike responses to Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines by previous infection status. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jun 7:S1198-743X (21)00289-5.

²⁶⁴ Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. Personalized vaccinology: A review. *Vaccine*. 2018 Aug 28;36(36):5350-5357

²⁶⁵ Nipper AJ, Smithey MJ, Shah RC, Canaday DH, Landay AL. Diminished antibody response to influenza vaccination is characterized by expansion of an age-associated B-cell population with low PAX5. *Clin Immunol*. 2018 Aug; 193:80-87.

²⁶⁶ Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F, Abril E, Blandino G, Campo F, et al. Initial observations on age, gender, BMI and hypertension in antibody responses to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine. *EClinicalMedicine*. 2021 Jun; 36:100928.

²⁶⁷ Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, Rosser EC, Webb K, Deakin CT. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun*. 2020 Dec 9; 11(1):6317.

²⁶⁸ Voigt EA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Grill DE, Goergen KM, Schaid DJ, Poland GA. Sex Differences in Older Adults' Immune Responses to Seasonal Influenza Vaccination. *Front Immunol*. 2019 Feb 27;10:180

-
- ²⁶⁹ Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017 Oct 6; 33:577-599.
- ²⁷⁰ Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jojic V, Dekker CL, Thiébaud R, Tibshirani RJ, Davis MM. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 14; 111(2):869-74.
- ²⁷¹ 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.* 2021 Apr 8; 384(14):1372-1374.
- ²⁷² Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature.* 2021 Jul; 595(7867):426-431.
- ²⁷³ Monin-Aldama, L. et al. Interim results of the safety and immune-efficacy of 1 versus 2 doses of COVID-19 vaccine BNT162b2 for cancer patients in the context of the UK vaccine priority guidelines. *bioRxiv* 2021.03.17.21253131(2021) doi:10.1101/2021.03.17.21253131.
- ²⁷⁴ Wang X, Tan L, Wang X, Liu W, Lu Y, Cheng L, Sun Z. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for SARS-CoV-2 detection in 353 patients received tests with both specimens simultaneously. *Int J Infect Dis.* 2020 May; 94:107-109.

XII.ANEXOS

Anexo 1. Encuesta IMPDEF



USO OFICIAL

SUBSECRETARÍA DE DEFENSA
INSPECCIÓN GENERAL SANIDAD
INSTITUTO MEDICINA
PREVENTIVA DE LA DEFENSA

**SARS-CoV-2 FORMULARIO DE RECOGIDA DE INFORMACIÓN PERSONAL RED
SANITARIA MILITAR (Actualizado a 27/04/2020)**

Nombre _____ DNI _____
Teléfono _____

-----Cortar por la línea de puntos para IMPDEF-----

Número de muestra

Categoría Profesional _____ Destino _____

Fecha realización de prueba (dd/mm/aaaa) _____ Sexo: H M

Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa) _____ P. CIVIL ___ P. MILITAR ___

Descripción Puesto de trabajo _____

¿Ha sido diagnosticado de COVID-19 con anterioridad? SI NO

Fecha de diagnóstico (dd/mm/aaaa)

¿Qué equipo de protección ha utilizado durante el estado de alarma?

	Mascarilla	Guantes	Gafas	Bata impermeable
SI	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

¿Ha realizado maniobras de riesgo? : aerosoles intubación otras _____

Pruebas diagnósticas

¿Le han realizado PCR en las últimas semanas? SI NO ¿Cuántas veces? _____

PCR. Última realizada

Fechas

Resultados

+ -

Test diagnóstico rápido de detección de Antígeno

+ -

Test diagnóstico rápido de detección de Anticuerpos

IgM + - IgG + -

Otras PCRs

Fechas

Resultados

+ -

<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Contacto estrecho con enfermo + (positivo)

Trabajo Atención a enfermos Convivencia

Los datos personales de esta comunicación están sujetos al RGPD y sólo pueden emplearse para el fin que se comunican, y sólo mantenerse durante no más tiempo del necesario para los fines de su tratamiento.



Antecedentes Personales

¿Tiene síntomas actualmente? SI NO

Ha presentado en algún momento clínica

- | | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|
| <input type="checkbox"/> Fiebre | <input type="checkbox"/> Tos | <input type="checkbox"/> Cefalea | <input type="checkbox"/> Oftalmológica |
| <input type="checkbox"/> Neumonía | <input type="checkbox"/> Diarrea | <input type="checkbox"/> Anosmia | <input type="checkbox"/> Ageusia |
| <input type="checkbox"/> Dolor de garganta | <input type="checkbox"/> Escalofríos | <input type="checkbox"/> Artralgia | <input type="checkbox"/> Mialgia |
| <input type="checkbox"/> Dificultad respiratoria | <input type="checkbox"/> MEG | <input type="checkbox"/> Dermatológica | |

Otros. Especificar _____

Ingreso Hospitalario: SI No En caso afirmativo:

Fecha de ingreso: _____ Hospital de ingreso: _____ Ingreso en UCI SI NO

Fecha alta hospitalaria: _____

OBSERVACIONES. Otra información de interés

A cumplimentar por el IMPDEF

Resultados de las pruebas serológicas objeto de este estudio, realizada el día _____

. ELISA. IgM + - IgG + -

Los datos personales de esta comunicación están sujetos al RGPD y sólo pueden emplearse para el fin que se comunican, y sólo mantenerse durante no más tiempo del necesario para los fines de su tratamiento.

Anexo 2. Producción científica

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases
https://doi.org/10.1007/s10096-020-04091-4

ORIGINAL ARTICLE



Comparison of various serological assays for novel SARS-COV-2

María Simón Sacristan¹ · Ana Collazos-Blanco¹ · María Isabel Zamora Cintas¹ · Alicia Serrano García¹ · Carmen Ybarra de Villavicencio¹ · María Mateo Maestre¹

Received: 2 June 2020 / Accepted: 28 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Coronavirus disease-19 (COVID19), the novel respiratory illness caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2), is associated with severe morbidity and mortality. The aim of our study was to compare different immunoassays. We evaluated three immunochromatographic test (The StrongStep®SARS-CoV-2 IgG/IgM kit, AllTest COVID-19 IgG/IgM kit, and Wondfo® SARS-CoV-2 Antibody) and two chemiluminescence immunoassays (CMIA) (Covid-19 VIRCLIA® IgM+IgA/IgG monostest and the Abbott SARS-CoV-2 IgG assay) in COVID-19 patients. The assays were performed using serum samples of three group patients, i.e., healthy controls, patients with SARS-CoV-2 PCR positive, and patients with SARS-CoV-2 PCR negative clinically diagnosed of COVID-19 infection. The detection percentages of IgG with the StrongStep® SARS-CoV-2 IgG/IgM kit and AllTest COVID-19 IgG/IgM kit were similar in both groups (83.3% and 80.6%, respectively in group 2, $p = 0.766$) and (42.9% and 50.0%, respectively in group 3, $p = 0.706$). There were some differences on IgM detection between StrongStep® SARS-CoV-2 IgG/IgM kit and AllTest COVID-19 IgG/IgM kit (11.1% and 30.6%, respectively in group 2, $p = 0.042$ and 0.0% and 28.6%, respectively in group 3, $p = 0.031$). The positive rate of IgG in group 2 is higher compared to group 3 with the two immunoassays tested. We observe the same positive rates of IgG with the two CMIA. Our study shows excellent performance of CMIA compared to immunochromatographic test and confirms its potential use in the diagnosis of the new SARS-CoV-2.

Keywords Antibodies · Chemiluminescence immunoassays · IgG · IgM · Immunochromatographic tests · SARS-CoV-2

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) [1] was discovered in December 2019 in the city of Wuhan, China. It soon spread to other cities and countries, and on 11 March 2020 was proclaimed a pandemic by WHO. The clinical symptoms of most patients are fever, sore throat, cough, and shortness of breath [2].

RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) remained the gold standard for the diagnosis of infection due to SARS-CoV-2, which has led to 974,449 coronavirus disease-19 (COVID19) cases and 33,992 deaths by 19 October 2020 in Spain. Its sensitivity did not reach 100% but it remained better than that of methods based on the detection of antigens. However, RT-PCR takes a long time to get results and qualified personnel is necessary. In several cases, RT-PCR has shown false negatives in patients with pneumonia, showing clinical and radiographic evidence compatible with COVID19; these patients were considered as clinically diagnosed of SARS-CoV-2 according to the 5th edition of guideline on diagnosis and treatment of the novel coronavirus pneumonia.

María Simón Sacristan, Ana Collazos Blanco and Maria Isabel Zamora Cintas contributed equally to this work.

✉ María Simón Sacristan
msimsac@cc.mde.es
✉ Ana Collazos-Blanco
acollazosblanco@gmail.com

María Isabel Zamora Cintas
maribel.zamora.cintas@gmail.com

Alicia Serrano García
alicia_sg@hotmail.com

Carmen Ybarra de Villavicencio
cybarrav@gmail.com

María Mateo Maestre
mariamateo@hotmail.com

¹ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, Spain

Published online: 25 November 2020

Springer



SARS-COV-2 Infection and Specific Antibody Detection on Health Care Workers from a Military Hospital in Madrid, Spain

María Simón Sacristán¹ · Carmen Ybarra de Villavicencio¹ · Ana Collazos Blanco¹ · María Elga Mayo Montero² · María del Carmen Ariñez Fernández² · Adolfo Suárez Prieto² · María Isabel Zamora Cintas¹ · María Mateo Maestre¹

Received: 9 November 2020 / Accepted: 12 May 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

This study aims to assess the COVID-19 seroprevalence in HCW at the Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (HCDGU) (Madrid). From 27 April to 10 June 2020 nasopharyngeal swab and serum samples from employees were processed in order to evaluate their seroprevalence and infective situation. Employees were classified according to their exposure to SARS-CoV-2 infection as high, moderate, and low exposure groups (level 1, level 2, and level 3, respectively). A specific real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was run to diagnose each patient, whereas the qualitative detection of IgG antibodies to SARS-CoV-2 was performed by means of an immunoassay. In total, 2781 HCW were screened. From this sample, 30 employees (1.1%) were infected with SARS-CoV-2 and 450 (16.2%) were positive to SARS-CoV-2-IgG antibodies. The seroprevalence was higher in the high exposure group. The seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among employees without any COVID-19 training was higher than in those who received COVID-19 training (14.5% vs 18.6%, $P=0.035$). The seroprevalence in military and civilian personnel in level 1 was 18.2% and 20.0%, respectively ($P=0.4616$), while in level 2 it was 6.0% and 16.0% ($P=0.0008$) and in level 3 it was 16.7% and 10.2% ($P=0.0315$). The results from the present study have shown that the high exposure group and HCW not receiving specific training against COVID-19 showed higher seroprevalence. Furthermore, the military employees from this hospital presented low percentage of seroprevalence.

Introduction

On December 2019, a new virus called SARS-CoV-2 emerged in the city of Wuhan, China [1]. This virus has since spread to many other countries and throughout the world [2] and on 11 March 2020 was declared a pandemic by the World Health Organization. It represents a great challenge for health care systems; so far 123,216,178 cases have been reported and 2,714,517 persons have died worldwide. Spain, with 3,234,319 cases and 73,744 deaths by 23 March 2021, is considered one of the most affected countries in the European Union [3]. In order to avoid the disease spreading, hospitals in Spain have implemented capacities by canceling elective admissions.

The most frequent clinical symptoms of COVID-19 are fever, sore throat, cough, and shortness of breath [4]. The main route of transmission is person-to-person spread. Health care workers represent a vulnerable cohort for infection due to frequent and close contact with COVID-19 patients [5]. The principal microbiological diagnostic test to prove the presence of virus is the Polymerase Chain Reaction (PCR), a molecular technique that detects the RNA of

✉ María Simón Sacristán
marysaymon@hotmail.com

✉ María Mateo Maestre
mmatmae@oc.mde

Carmen Ybarra de Villavicencio
cybarrav@gmail.com

Ana Collazos Blanco
acollazosblanco@gmail.com

María Elga Mayo Montero
mmaymon1@oc.mde.es

María del Carmen Ariñez Fernández
marifer@oc.mde.es

Adolfo Suárez Prieto
abie@oc.mde.es

María Isabel Zamora Cintas
maribel.zamora.cintas@gmail.com

¹ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, Spain

² Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa, Madrid, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio



Original Article

Coinfections among hospitalized patients with covid-19 in the first pandemic wave



María Isabel Zamora-Cintas*, Diana Jiménez López, Ana Collazos Blanco, Tamara Martín Rodríguez, Javier Mombiedro Segarra, Javier Membrillo Novales, María Francisca Ramos Ferriol, María Mateo Maestre, María Simón Sacristán

Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2020
Revised in revised form 19 April 2021
Accepted 24 April 2021
Available online 7 May 2021

Keywords:

microorganisms
coinfection
hospitalized patients
COVID-19

ABSTRACT

Background: COVID19 is the novel respiratory illness caused by SARS-CoV-2. The presence of other potentially pathogenic microorganisms could worsen the prognosis of these patients. Aim: The study aims to describe coinfections in COVID-19 patients and contrast it between standard ward and critical care patients at Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (HCDGU).

Methods: A retrospective study was carried out of patients with COVID-19 confirmed with RTPCR admitted to the HCDGU from March 5, 2020 to May 7 of 2020.

Findings: Of a total of 703 patients with COVID-19, 75(10.7%) had other microbiologically confirmed infections: 9% (58/648) in standard ward patients and 31.5%(17/54) in critical care patients. In total 86 samples of the 75 patients presented some microorganism; clinically relevant bacteraemias, 50%, respiratory cultures, 32.6% and pneumococcal positive antigens, 17.4%.

Conclusions: We found a low frequency of microorganism coinfection in COVID-19 patients, however in critical care these coinfections increased considerably.

Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

On December 2019, a novel coronavirus was discovered in the city of Wuhan, Hubei Province, China (Guan et al., 2020). It soon spread to other cities and countries and on 11 March 2020 was declared a pandemic by the World Health Organization. This novel virus, Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) caused a novel illness called coronavirus disease 2019 (COVID-19). Spain, with 3,387,022 cases and 76,756 deaths by 14 April 2021 (<Actualizacion_353_COVID-19.pdf> 2000), is considered one of the most affected countries in the European Union.

The clinical symptoms of most patients are a fever, sore throat, dry cough and shortness of breath (Jin et al., 2020). The principal microbiology diagnosis tends to be RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), a molecular technique which detects the RNA of the virus (Jin et al., 2020, Liu et al., 2020).

Bacterial, viral, or fungal coinfections are common complications in patients with different types of pneumonia, especially in the most critical patients (Cawcutt & Kalil, 2017, Zhou et al., 2020). Therefore, the presence of other potentially pathogenic microorganisms could induce a more severe inflammatory and

may worsen (Ruuskanen et al., 2011) the prognosis of patients infected by SARS-CoV-2, for this reason most COVID-19 patients were empirically treated with antibiotics.

Previous studies have shown that patients with COVID-19 can be coinfecting with other microorganisms (Hazra et al., 2020, Hughes et al., 2020, Antinori et al., 2020, Lansbury et al., 2020, Zhang et al., 2020). The types of pathogen coinfections and the proportion of coinfection in SARS-CoV-2 positive hospitalized patients remain unclear. In this study we compare and describe coinfections in COVID-19 patients admitted to the standard ward and intensive care units (ICU).

2. Materials & methods

2.1. Study design

This study was carried out at HCDGU, a Spanish military tertiary hospital located in Madrid that is fully integrated in the Public Health System.

A retrospective observational study was carried out in all patients diagnosed with COVID-19 from 5 March 2020 to 7 May 2020 at the HCDGU. COVID-19 infection was confirmed in all patients by real-time reverse transcription RT-PCR (Allplex 2019-nCoV assay, Seegene, Seoul, South Korea) testing performed on nasopharyngeal swabs and

* Corresponding author. Tel: 673868036.
E-mail address: maribel.zamora.cintas@gmail.com (M.I. Zamora-Cintas).

microbial biotechnology

Open Access

A multiplex antigen microarray for simultaneous IgG and IgM detection against SARS-CoV-2 reveals higher seroprevalence than reported

David Ruano-Gallego¹  Miriam García-Villadangos,¹  Mercedes Moreno-Paz,¹  Javier Gómez-Elvira,²  Marina Postigo,¹  María Simón-Sacristán,³  Hugh T. Reyburn,⁴  Carlo Carolis,⁵  Natalia Rodrigo,⁵  Yaiza B. Codeseira,⁶  Paloma Rueda,⁷  Sonia Zúñiga,⁸  Luis Enjuanes⁸  and Victor Parro¹ 

¹Department of Molecular Evolution, Centro de Astrobiología (INTA-CSIC), Carretera de Ajalvir km 4, Torrejón de Ardoz, Madrid 28850, Spain.

²Space Payload Department, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Carretera de Ajalvir km 4, Torrejón de Ardoz, Madrid 28850, Spain.

³Microbiology and Parasitology Unit, Hospital Central de la Defensa 'Gómez Ulla', Glorieta del Ejército 1, Madrid, 28050, Spain.

⁴Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), C/ Darwin 3, Madrid, 28049, Spain.

⁵CRG-Centre for Genomic Regulation, Dr. Aiguader 88, Barcelona, 08003, Spain.

⁶CIMUS Biomedical Research Institute, University of Santiago de Compostela-IDIS, Avenida de Barcelona s/n, Santiago de Compostela, 15782, Spain.

⁷Eurofins-INGENASA, Avenida Institución Libre de Enseñanza 41, Madrid, Spain.

⁸Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), C/ Darwin 3, Madrid, 28049, Spain.

Summary

The surge of SARS-CoV-2 has challenged health systems worldwide and efficient tests to detect viral particles, as well as antibodies generated against them, are needed. Specificity, sensitivity, promptness or scalability are the main parameters to estimate the final performance, but rarely all of them match in a single test. We have developed SCOVAM, a protein

microarray with several viral antigens (spike, nucleocapsid, main protease Nsp5) as capturing probes in a fluorescence immunoassay for COVID-19 serological testing. SCOVAM depicts IgG and IgM antibody responses against each of these proteins of 22 individuals in a single microscope slide. It detects specific IgM (0.094 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and IgG (-0.017 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and is scalable and cost-effective. We validated SCOVAM by comparing with a widely used chemiluminescent commercial serological test ($n = 742$). SCOVAM showed twice the sensitivity and allowed following seroconversion in a single assay. By analysing the prevalence 4 months later in a subset of 76 positive sera, we still detected 93.42% of positives, almost doubling the detection of the commercial assay. The higher sensitivity of SCOVAM is especially relevant to screen sera for convalescent plasma-based treatments, high-throughput antibody response monitoring after vaccination or evaluation of vaccine efficiency.

Introduction

The newly arisen severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causing COVID-19 infections in humans, has triggered a worldwide pandemic in 2020. Most patients display mild symptoms (fever, cough, shortness of breath), typically starting around five days after the infection, but some cases show the acute respiratory distress syndrome due to the event of a so-called cytokine storm; a dysregulated secretion of proinflammatory cytokines that leads to multi-organ failure, septic shock and blood clots (Song *et al.*, 2020).

The antibody response plays an important role in the neutralization of the virus (Zost *et al.*, 2020) and the recovery from the disease (García, 2020). Virus specific immunoglobulin M (IgM) antibodies can be detected around day 7 after the onset of the symptoms, while specific IgG antibodies are detected at day 10 (Zhang *et al.*, 2020a). Though the duration of the antibody responses has not yet fully established, it has been recently demonstrated that neutralizing antibodies could be detectable 7 months after the infection (Ripperger *et al.*, 2020).

SARS-CoV-2 genome encodes, like all coronaviruses (Zumla *et al.*, 2016), structural spike (S), envelope (E),

Received 2 March, 2021; accepted 6 March, 2021.
For correspondence: E-mail: David Ruano-Gallego, druano@cab.inta-csic.es; Victor Parro, parro@cab.inta-csic.es.
Microbial Biotechnology (2021) 14(3), 1228–1236
doi:10.1111/1751-7915.13801

© 2021 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

