

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN PACIENTES
TRAS INFECCIÓN POR SARS-COV-2. ESTUDIO
DE NEUTRALIZACIÓN EN PROFESIONALES
SANITARIOS TRAS VACUNACIÓN.**

TESIS DOCTORAL

Esther Serrano-Conde Sánchez.

Granada, 2024.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN PACIENTES TRAS INFECCIÓN POR SARS-
COV-2. ESTUDIO DE NEUTRALIZACIÓN EN PROFESIONALES SANITARIOS
TRAS VACUNACIÓN.**

Director de tesis:

Dr. Federico García García.

Memoria presentada por D.^ª Esther Serrano-Conde Sánchez para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada en el Programa de Doctorado en Biomedicina.

Granada, 2024.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Esther Serrano Conde Sánchez
ISBN: 978-84-1195-366-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92836>

La doctoranda **Esther Serrano-Conde Sánchez** y el director de tesis D. **Federico García García** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 14 de febrero de 2024.

Director de la tesis

Doctoranda

Fdo. Federico García García

Fdo. Esther Serrano-Conde Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecerle a Federico el haberme facilitado y dirigido esta tesis. Sin su trabajo y apoyo, esto nunca hubiera salido adelante.

En segundo lugar y de manera muy especial, quisiera agradecer a todos los compañeros sanitarios que han participado en el segundo estudio procedentes de los servicios de UCI, Rehabilitación, Análisis Clínicos, Psiquiatría, Anatomía Patológica, Nefrología, Otorrino y Enfermedades Infecciosas del Hospital San Cecilio de Granada, profesionales del Hospital Virgen de las Nieves y participantes que, a pesar de la distancia (Motril o Huelva), han hecho posible que hoy pueda publicar esta tesis. Una mención especial merecen mis compañeros de Microbiología, que se han dejado “desangrar” muestra tras muestra con menos quejas de las que cabría esperar y toda la disponibilidad que un investigador pudiera desear. También a las enfermeras de Enfermedades Infecciosas, Marisol y Carmen, por la enorme paciencia que han tenido ayudando siempre con amabilidad y una sonrisa.

A los compañeros de Vircell Joaquín, Almudena y José por todo su trabajo y principalmente a Alba, por tantas horas de esfuerzo y dedicación que han hecho posible la publicación de estos artículos y, con ello, de esta tesis.

A los administrativos José Luis, Mari Carmen “Supersecre” y, aunque su presencia fue breve, Baldomero y a todos los técnicos del laboratorio de Microbiología del Hospital San Cecilio: Mari Dolo, Paqui López, Feli, Toñi, Carmen Pérez, Lola Sánchez, José Antonio, Mari Ángeles, Carmen Martínez, etc., por haberme acompañado durante los cuatro años de residencia y haber hecho del laboratorio un lugar en el que sentirme como en casa, aunque me separasen 400 kilómetros de la mía.

A Marta y Natalia por estar tan pendientes y disponibles siempre, y al resto de adjuntos, Fernando, Laura R, Cristina, Violeta, Mabel, Paco y Recio por haber dedicado parte de su tiempo a enseñarme lo bonita e increíble que es la microbiología y haberme ayudado a crecer como profesional.

A mis residentes pequeños, los “minipipis”, Marta, Lucía C, Lucía P, Ana, Alberto, Laura G, Luis y Marco, por todos los momentos que hemos vivido dentro y fuera del laboratorio y por haber sido una parte fundamental de mi residencia. No podría haber tenido mejores resis pequeños y habéis hecho de este tiempo una experiencia inolvidable.

A Adolfo, quien más me ha perseguido para publicar esta tesis y al que le debo todos los conocimientos adquiridos de excel que, aunque no son muchos, son muy valiosos.

A Ana (“Pipii”) y a Laura Viñuela (“Viñu”), por haberos convertido en mis mejores amigas y en dos personas imprescindibles en mi vida tanto en Granada como fuera de ella. No sé qué hubiera sido de mí sin vosotras. Os debo una parte importante de quien soy ahora.

A mis CoRs y amigos Vanesa, Óscar, Laura (sin cuya ayuda para el papeleo del doctorado quizá no tendría hecha ni la matrícula), Alejandra, Fati (Otorrino), Fati (Familia) y Alex, por haber sido mi familia y mi apoyo estos cuatro años. Por muy lejos que nos lleve la vida a cada uno siempre tendremos un rinconcito de Granada para nosotros.

Por último, no habría llegado tan lejos en mi vida personal ni profesional si no hubiese sido por mi familia: mis padres Carlos y Asunción y mi hermana Laura. Han sido los que más confianza incondicional han depositado siempre en mí y con este trabajo espero transmitirles un poquito del gran orgullo que siento hacia ellos. Porque lo son todo para mí. Gracias.

ÍNDICE

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	15
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	17
RESUMEN	25
SUMMARY	27
INTRODUCCIÓN	31
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	31
1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SARS-COV-2	33
1.2.1 Estructura	33
1.2.2 Ciclo biológico.....	42
1.2.3 Epidemiología	48
1.2.4 Transmisión	48
1.2.5 Síntomas.....	52
1.2.5.1 Tormenta de citoquinas	54
1.2.6 Tratamiento.....	56
1.2.6.1 Antivirales.....	57
1.2.6.2 Anticuerpos monoclonales	62
1.2.6.3 Inmunomoduladores	68
1.2.6.4 Otras opciones.....	73
1.2.7 Diagnóstico y seguimiento epidemiológico	75
1.2.7.1 Muestras	76
1.2.7.2 Métodos serológicos.....	78
1.2.7.3 Métodos moleculares	81
1.2.7.4 Secuenciación	82

1.2.7.5	Otros métodos.....	86
1.2.8	Variantes	89
1.3.	RESPUESTA INMUNE.....	107
1.3.1	Respuesta innata	107
1.3.2	Respuesta adaptativa.....	108
1.3.2.1	Respuesta celular.....	110
1.3.2.2	Respuesta humoral.....	113
1.3.3	Inmunidad híbrida	119
1.4.	NEUTRALIZACIÓN	122
1.5.	VACUNAS.....	135
1.5.1	Desarrollo y tecnología	139
1.5.2	Tipos de vacunas.....	148
	PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	163
	CAPÍTULO 1. Respuesta de anticuerpos en pacientes ingresados en el hospital con sospecha de infección por SARS-CoV-2: resultados de un estudio multicéntrico en España.....	167
1.1.	CONTEXO HISTÓRICO.....	169
1.2.	OBJETIVOS.....	170
1.3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	171
1.3.1	Pacientes	171
1.3.2	Muestras de suero	171
1.3.3	ELISA.....	172
1.3.4	RT-PCR.....	172
1.3.5	Análisis estadístico.....	172
1.4.	RESULTADOS.....	174
1.4.1	Cinética de anticuerpos anti-SARS-CoV-2	174

1.4.2	Edad y sexo en la respuesta de Ac frente a SARS-CoV-2	177
1.5.	DISCUSIÓN	180
CAPÍTULO 2. Actividad neutralizante in vitro de anticuerpos inducidos por la vacuna de ARNm BNT162b2 contra la variante B.1.351 completa de SARS-CoV-2.....		185
2.1	CONTEXTO HISTÓRICO	187
2.2	OBJETIVOS	188
2.3	MATERIAL Y MÉTODOS	189
2.3.1	Participantes.....	189
2.3.2	Ensayo de neutralización	189
2.3.2.1	Virus	189
2.3.2.2	Línea celular	190
2.3.2.3	Ensayo	190
2.3.3	Análisis estadístico.....	193
2.3.4	Comité ético	193
2.4.	RESULTADOS	194
2.5.	DISCUSIÓN	201
CONCLUSIONES		209
BIBLIOGRAFÍA		213
ÍNDICE DE TABLAS		242
ÍNDICE DE FIGURAS		244
ÍNDICE DE IMÁGENES		246
ÍNDICE DE ESQUEMAS		248
ANEXOS		249

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de esta tesis doctoral han sido presentados y defendidos en congresos nacionales e internacionales y publicados en revistas científicas internacionales de alto impacto. Finalmente, el capítulo 2 ha sido galardonado con el premio RAMAO otorgado por la Real Academia de Medicina y Cirugía de Andalucía Oriental con el consiguiente nombramiento de la doctoranda como Académica Correspondiente (anexos 4 y 5).

Congresos nacionales:

- Anticuerpos IgG anti-S y anti-RBD frente al SARS-CoV-2: estudio tras vacunación. Comunicación póster online. 2º congreso nacional multidisciplinar COVID-19 de las Sociedades Científicas de España. Online. 12/04/2021.
- Estudio de neutralización y desarrollo de anticuerpos IgG anti-N+S frente al SARS-CoV-2 tras la vacunación. Comunicación póster. **XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Online. 06/06/2021.**

Congresos internacionales:

- Comirnaty® immune response can neutralize SARS-CoV-2 VOC 202012/01 (lineage B.1.1.7). Comunicación póster. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). Online. 09/07/2021.

Publicaciones:

- Fuentes A, **Serrano-Conde E**, Roldán C, Benito-Ruesca R, Mejías G, Sampedro A, et al. *Antibody response in patients admitted to the hospital with suspected SARS-CoV-2 infection: results from a multicenter study*

across Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021 Jun;40(6):1343-1349.
doi: 10.1007/s10096-020-04139-5.

- **Serrano-Conde E**, Leyva A, Fuentes A, de Salazar A, Chueca N, Pérez-Castro S, et al. *In vitro neutralizing activity of BNT162b2 mRNA-induced antibodies against full B.1.351 SARS-CoV-2 variant*. Transboundary and Emerging Diseases. 2021 Dec;69(5):2649-2655.
doi: 10.1111/tbed.14417.

Premios:

- *In vitro neutralizing activity of BNT162b2mRNA-induced antibodies against full B.1.351 SARS-CoV-2 variant*. Premio RAMAO. 27/01/2023.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3CLpro	Proteasa tipo 3C.
Ac	Anticuerpos.
ACE-2	Enzima convertidora de angiotensina 2.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
APC	Célula presentadora de antígeno.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNmc-/+	Ácido ribonucleico monocatenario de polaridad negativa/positiva.
ARNsg	Ácido ribonucleico subgenómico.
BAL	Lavado broncoalveolar.
BARDA	Autoridad de Investigación Biomédica Avanzada y de Desarrollo.
BLA	Solicitud de licencia biológica.
BTK	Tirosina cinasa de Bruton.
CBNAAT	Amplificación de ácidos nucleicos basada en cartuchos.
CD	Célula dendrítica.
CD	Dominio conector.
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades.
CH	Hélice central.
CID	Coagulación intravascular diseminada.
CLIA	Inmunoensayo de quimioluminiscencia.

COVID-19	<i>Coronavirus disease</i> 2019. Enfermedad producida por el SARS-CoV-2.
CPE	Efecto citopático.
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> .
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
CSR	Recombinación de cambio de clase.
CT	Cola citoplasmática.
Ct	Umbral de número de ciclos.
CTACK	Quimiocina atrayente de células T cutáneas.
CTD	Dominio C-terminal.
CTL	Linfocito T citotóxico.
DAMP	Patrón molecular asociado a lesiones.
DoD	Departamento de Defensa.
E	Envuelta.
ECDC	Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades.
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped.
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción.
ELISpot	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos.
EMA	Agencia Europea de Medicamentos.
ERGIC	Compartimento intermedio del retículo endoplásmico-aparato de Golgi.
ESPII	Emergencia de salud pública de importancia internacional.
EUA	Autorización de uso de emergencia.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

FDC	Célula dendrítica folicular presentadora de antígeno.
FFP2 y 3	Mascarilla de filtro de partículas nivel 2 y 3.
FP	Péptido de fusión.
FPPR	Región proximal del péptido de fusión.
GGO	Opacidad en vidrio deslustrado.
GM-CSF	Factor estimulante de granulocitos.
HCoV	Coronavirus causante de resfriado común.
hCoV	Coronavirus humanos.
HCQ	Hidroxicloroquina.
HE	Hemaglutinina esterasa.
HEL-1	Helicasa de la superfamilia 1.
HHS	Departamento de Salud y Servicios Humanos.
HLH	Linfocitosis hemofagocítica.
HR1	Repetición heptada 1.
HR2	Repetición heptada 2.
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus.
IFN	Interferón.
IFN-β-1a	Interferón beta 1a.
IgA, G, M	Inmunoglobulinas A, G, M.
IGRA	Ensayo de liberación de interferón gamma.
IL	Interleukina.
JAK	Janus quinasa.
LES	Lupus eritematoso sistémico.

LFA	Ensayo de flujo lateral.
LL-PC	Célula plasmática secretora de anticuerpos de vida larga.
M	Membrana.
mAb	Anticuerpo monoclonal.
MBC	Célula B de memoria.
MCP-1 y 3	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 y 3.
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
MIP-1A	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa.
Mpro	Proteasa principal.
N	Nucleocápside.
NAb	Anticuerpo neutralizante.
NALT	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe.
NGS	Secuenciación de siguiente generación.
NIH	Institutos Nacionales de la Salud.
NiRAN	ARN-polimerasa dependiente de ARN de nidovirus asociada a una nucleotidiltransferasa.
NK	Célula <i>natural killer</i> .
NKT	Célula T <i>natural killer</i> .
NSP	Proteína no estructural.
NT	Título de neutralización.
NTD	Dominio N-terminal.
NTS	Secuenciación de objetivos de nanoporos.

OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORF	Marco de lectura abierto.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa / Proteína C reactiva.
PLpro	Proteasa tipo papaína.
PP1a y PP1b	Poliproteínas de la replicasa 1a y 1b.
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones.
RBD	Dominio de unión al receptor.
RBM	Motivo de unión al receptor.
RdRp	ARN-polimerasa dependiente de ARN.
RE	Retículo endoplásmico.
RIG-1	Gen I inducible por ácido retinoico.
RLR	Receptor similares a RIG-1.
RTC	Complejo replicasa-transcriptasa.
RT-LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle en tiempo real.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.
S	Espícula.
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV-2	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo.
SARSr-CoV	Coronavirus relacionado con los SARS.
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo.
SGTF	Déficit de gen S.

SHERLOCK	<i>Specific high sensitivity enzyme reporter unlocking.</i>
SHM	Hipermutación somática.
SIG	Grupo interagencial para el SARS-CoV-2.
SIgA	Inmunoglobulina A secretora.
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia.
SL-PC	Célula plasmática secretora de anticuerpos de vida corta.
SPIA	Amplificación isotérmica con cebador único.
SPR	Resonancia de plasmones superficiales.
SR	Receptor tipo <i>Scavenger</i> .
TAAN	Técnica de amplificación de ácidos nucleicos.
TC	Tomografía computarizada.
TCID ₅₀	Dosis infecciosas al 50 % de cultivo de tejido.
Tfh	Célula auxiliar folicular T.
Th	Célula T <i>helper</i> .
TLR	Receptor tipo Toll.
TM	Segmento transmembrana.
TMPRSS2	Serin-proteasa transmembrana 2.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
TRI	Tracto respiratorio inferior.
TRS	Tracto respiratorio superior.
UTM	Medio de transporte universal.
UTR	Región no traducida de la secuencia genómica.
VBM	Variante bajo monitoreo.

VH	Fragmento variable.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.
VIPIT	Trombocitopenia inmunitaria protrombótica inducida por vacuna.
VOC	Variante de preocupación.
VOHC	Variante de gran consecuencia.
VOI	Variante de interés.
VTM	Medio de transporte de virus.
ZBD	Dominio de unión a zinc.

RESUMEN

Desde diciembre de 2019 el mundo ha vivido una situación sin precedentes en la historia reciente. Desde China, se propagó un virus hasta el momento desconocido. Gracias a la secuenciación de su genoma, pronto se pudo relacionar con la familia de los coronavirus y recibió el nombre de SARS-CoV-2, y la enfermedad que producía, COVID-19. Causó una pandemia con graves consecuencias para la economía y la salud en todo el mundo. Durante ese tiempo, se han destinado cuantiosos recursos, no solo al diagnóstico de la población y al tratamiento de los enfermos, sino también a recoger la mayor información posible sobre el virus para poder combatirlo. Con el fin de frenar la expansión, se ha reforzado la producción de medicamentos contra la enfermedad, personal sanitario cualificado y el desarrollo en un tiempo récord de vacunas efectivas y con tecnologías aprobadas por primera vez en la historia, como las vacunas de ARN mensajero.

El objetivo de esta tesis es recoger la información más relevante sobre el SARS-CoV-2 y la COVID-19 y dar a conocer los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada (España) sobre la inmunidad humoral inducida por el virus.

En el primer capítulo, se caracterizó la producción de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 a través de muestras de suero en 1.236 pacientes ingresados por COVID-19 y con infección por SARS-CoV-2 confirmada por RT-PCR entre abril y julio de 2020 (primera ola en España) en 18 centros de España y se determinó su producción en función de la edad y el sexo. La determinación de anticuerpos IgM + IgA e IgG se realizó por técnicas de ELISA y demostró que IgM + IgA tenían mayor reactividad que IgG al inicio de la enfermedad y hasta 16 días después, siendo estadísticamente significativa un día después del ingreso. La aparición de IgG se hizo presente a partir del séptimo día tras el resultado positivo de la PCR y continuó aumentando hasta las tres semanas, cuando IgM + IgA e IgG alcanzaron valores similares, y un mes después, cuando IgG se hizo la más prevalente. No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres, pero sí se observó una mayor producción de anticuerpos al inicio de la enfermedad en pacientes menores

de 75 años, aunque en las muestras siguientes, los resultados se igualaron en todos los grupos de edad.

En el segundo capítulo se evaluó la capacidad *in vitro* de los anticuerpos generados contra la cepa salvaje del SARS-CoV-2 y las variantes B.1, B.1.1.7 y B.1.351 después de la vacunación de personal sanitario del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada (España) con BNT162b2 utilizando un ensayo de neutralización de virus completo. Para ello, se recogieron muestras de suero de 99 trabajadores de la salud (76 mujeres, 23 hombres, con una media de edad de 44 años) que recibieron dos dosis de la vacuna BNT162b2 entre enero y febrero de 2021 (tercera ola en España), de los cuales, solo 11 habían estado previamente expuestos al SARS-CoV-2. Se recogieron muestras de suero coincidentes con el día de la administración de cada dosis y 14 días después. Se utilizaron virus vivos completos de la cepa salvaje y las variantes B.1, B.1.1.7 y B.1.351 y células Vero E6. Los resultados se obtuvieron tras la observación al microscopio del efecto citopático (CPE). Tras el análisis de las muestras, se observó que el grupo de los preexpuestos demostró altos títulos de neutralización tras la primera dosis y un aumento menor tras la segunda, siendo al revés en el grupo de los no preexpuestos. En ambos grupos, la neutralización contra la variante B.1.1.7 alcanzó valores similares a los de la cepa salvaje, pero en el caso de la variante B.1.351, los títulos de neutralización fueron menores.

SUMMARY

Since December 2019, the world has experienced an unprecedented situation in recent history. From China, a hitherto unknown virus was spread. Sequencing its genome, it was soon related to the coronavirus family and received the name of SARS-CoV-2, and the disease it produced, COVID-19. It caused a pandemic with serious consequences for the economy and health around the world. During this time, considerable resources have been devoted, not only to diagnosing the population and treating the sick, but also to gathering as much information as possible about the virus in order to combat it. At this point, the production of anti-disease drugs, qualified health personnel and the development in record time of effective vaccines with technologies approved for the first time in history, such as messenger RNA vaccines, have been strengthened to stop the expansion of the virus.

The aim of this thesis is to collect the most relevant information about SARS-CoV-2 and COVID-19 and to present the results obtained in the studies carried out at the San Cecilio Clinical University Hospital in Granada (Spain) on humoral immunity induced by the virus.

In the first chapter, the production of anti-SARS-CoV-2 antibodies was characterised using serum samples from 1,236 patients admitted for COVID-19 and with SARS-CoV-2 infection confirmed by RT-PCR between April and July 2020 (first wave in Spain) in 18 healthcare centres in Spain and their production was determined based on age and sex. The determination of IgM + IgA and IgG antibodies was performed by ELISA techniques and showed that IgM + IgA had higher reactivity than IgG at the onset of the disease and up to 16 days later, being statistically significant one day after admission. The appearance of IgG was present from the seventh day after the positive PCR result and continued to increase three weeks later, when IgM + IgA and IgG reached similar values, and one month later, when IgG became the most prevalent. No significant differences were observed between men and women, but higher antibody production was observed at the beginning of the disease in patients under 75 years, although in subsequent samples, the results were equal in all age groups.

In the second chapter, the in vitro capacity of antibodies generated against the SARS-CoV-2 wild-type strain and B.1, B.1.1.7 and B.1.351 variants after vaccination of healthcare workers at the San Cecilio Clinical University Hospital in Granada (Spain) with BNT162b2 was evaluated using a whole virus neutralisation assay. For this purpose, serum samples were collected from 99 healthcare workers (76 women, 23 men, with a mean age of 44 years) who received two doses of BNT162b2 vaccine between January and February 2021 (third wave in Spain), of whom only 11 had been previously exposed to SARS-CoV-2. Serum samples were collected coincident with the day of administration of each dose and 14 days later. Live whole virus of the wild-type strain and of B.1, B.1.1.7 and B.1.351 variants and Vero E6 cells were used. Results were obtained after microscopic observation of the cytopathic effect (CPE). After analysing the samples, it was observed that the pre-exposed group showed higher neutralisation titers after the first dose and a lower increase after the second dose, while the opposite was true for the non-pre-exposed group. In both groups, neutralisation against the B.1.1.7 variant reached values similar to those of the wild-type strain, but in the case of the B.1.351 variant, the neutralisation titers were lower.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El 31 de diciembre de 2019 se declararon en la ciudad de Wuhan, (provincia de Hubei, China) 27 casos de neumonía de etiología desconocida y como supuesto foco principal de contagio, un mercado de alimentación de marisco, pescado y animales vivos de esta ciudad en el que todos los pacientes referían haber estado. El primer caso fue un trabajador de dicho mercado quien manifestó los primeros síntomas el 8 de diciembre de 2019 (1), entre ellos neumonía grave e insuficiencia respiratoria (2).

El 12 de enero, China publicó por primera vez la secuencia genética del virus (1,3). En ese momento se identificó el agente causal como un virus ARN perteneciente a la familia *Coronaviridae* (1).

El 30 de enero de 2020 el director General de la OMS, siguiendo las recomendaciones del Comité de Emergencias, declaró el brote como una emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) después de haber quedado demostrada la transmisión entre seres humanos y haber aumentado el número de casos, tanto dentro de China como fuera de ella, hasta un total de 7.818 en dicha fecha. El riesgo de transmisión en China fue declarado por la OMS como muy alto y en el resto del mundo, alto (3).

El 11 de febrero, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) lo denomina “SARS-CoV-2” y, a su vez, la OMS, en conjunto con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), acordó que el nombre de la nueva enfermedad que provocaba este virus sería “COVID-19” (*coronavirus disease 2019*) (4).

El 11 de marzo, tras aumentar los casos de propagación a nivel mundial y su gravedad, la COVID-19 se declaró pandemia mundial (3).

El 2 de abril de 2020 se superó el millón de contagiados por SARS-CoV-2 en todo el

mundo, con más de 51.000 fallecidos, según datos de la Universidad estadounidense Johns Hopkins (5). Más tarde, este mismo mes, la OMS emitió un comunicado en apoyo al desarrollo de una vacuna eficaz frente a la COVID-19 y el 21 de diciembre de 2020 se aprobó la autorización y comercialización condicional concedida por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (6). El 31 de diciembre de 2020, un año después del primer anuncio de casos en China, la OMS validó el uso e implementación de la primera vacuna contra la COVID-19, con ARN mensajero, llamada “Comirnaty” o “BNT162b2” y desarrollada por los laboratorios Pfizer y BioNTech (7,8).

A principios de 2021 se llevó a cabo el primer programa de vacunación colectiva a nivel mundial.

El 5 de mayo de 2023, el director general de la OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus, declaró el fin de la fase de emergencia de la pandemia en el mundo (9).

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SARS-COV-2

1.2.1 Estructura

El SARS-CoV-2, como ya se ha dicho anteriormente, pertenece a la familia de los *Coronaviridae* (que pueden, a su vez, dividirse en cuatro géneros: *Alfa*, *Beta*, *Delta* y *Gammacoronavirus*) (10), en concreto al género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus* (11), linaje 2B (12). Comparte el 70% de su secuencia genómica con el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y un 50% con el coronavirus el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) (tabla 1) (10,13). Se trata de un virus ARN monocatenario de polaridad positiva y de casi 30 kilobases (kb) (29.903 nucleótidos) de longitud que codifican para 9.860 aminoácidos (14–16). Contiene una polimerasa con actividad 3'-5' exorribonucleasa para la corrección de errores en la copia de su genoma, lo que le otorga cierta estabilidad genética (11). Contiene 6 marcos de lectura abiertos (*open reading frame* (ORF)) en posición 5'-3': una replicasa (ORF1a/ORF1ab), la espícula (S), la envuelta (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N) (figura 1), además de 9 ORF que codifican proteínas accesorias (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c, and ORF10) (10) y que se intercalan entre los genes estructurales (figura 2). Finalmente, el ARN y las proteínas estructurales se ensamblan en la progenie viral madura, que se libera por exocitosis para infectar al huésped (10). De los 4 genes estructurales, el 90% de los aminoácidos se encuentran tanto en SARS-CoV-2 como en SARS-CoV, excepto el gen S (13).

Características	SARS-CoV ^a	MERS-CoV ^{b,c}	SARS-CoV-2^{a,d}
Mes de inicio de la emergencia sanitaria	Noviembre 2002	Septiembre 2012	Diciembre 2019
Zona origen de la emergencia	Guangdong, China	Arabia Saudita	Wuhan, China
Mes de control total de la emergencia	Julio 2003	Sin información	No controlado hasta la fecha
Número de países infectados	26	27	109
Enfermedad causada	Síndrome respiratorio agudo grave	Síndrome respiratorio de Oriente Medio	COVID-19
Receptor de entrada en humanos	Receptor ACE2	Receptor DPP4	Receptor ACE2
Total pacientes infectados	8.098	2.428	7.085.894
Total pacientes recuperados	7.322	1.590	-
Total pacientes fallecidos	776	838	405.169
Tasa de mortalidad (%)	9,58	34,51	5,72

• Información recopilada de Shereen et al. (2020), • Wang et al. (2013), • de Groot et al. (2013), • Reporte de casos obtenido de [Coronavirus Case Tracker](#) de la Universidad Johns Hopkins al 13 de Mayo 2020

Tabla 1. Características epidemiológicas de SARS-CoV, MERS y SARS-CoV-2 y comparación entre ellos (17).

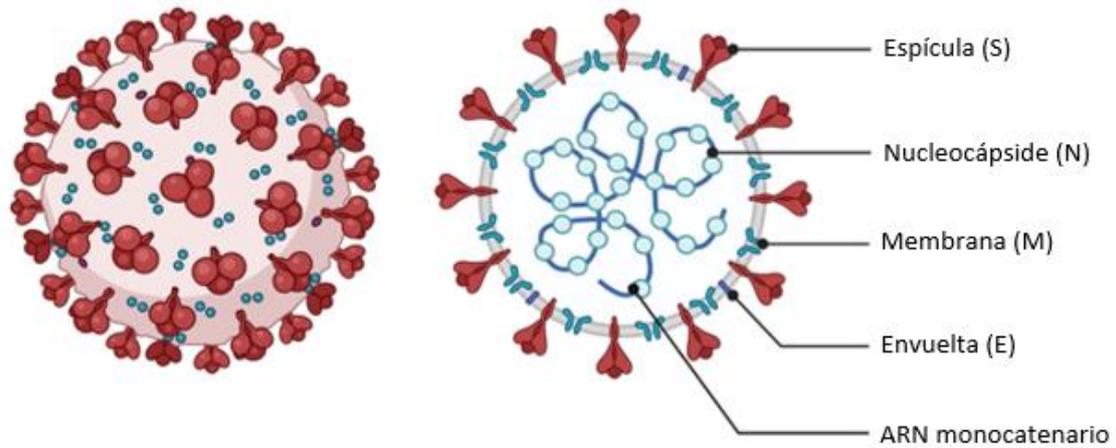


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. Elementos estructurales del virus: espícula (S), nucleocápside (N), membrana (M), envuelta (E) y cadena simple de ARN. Adaptado de Jamison Jr. et al., 2022 (18).

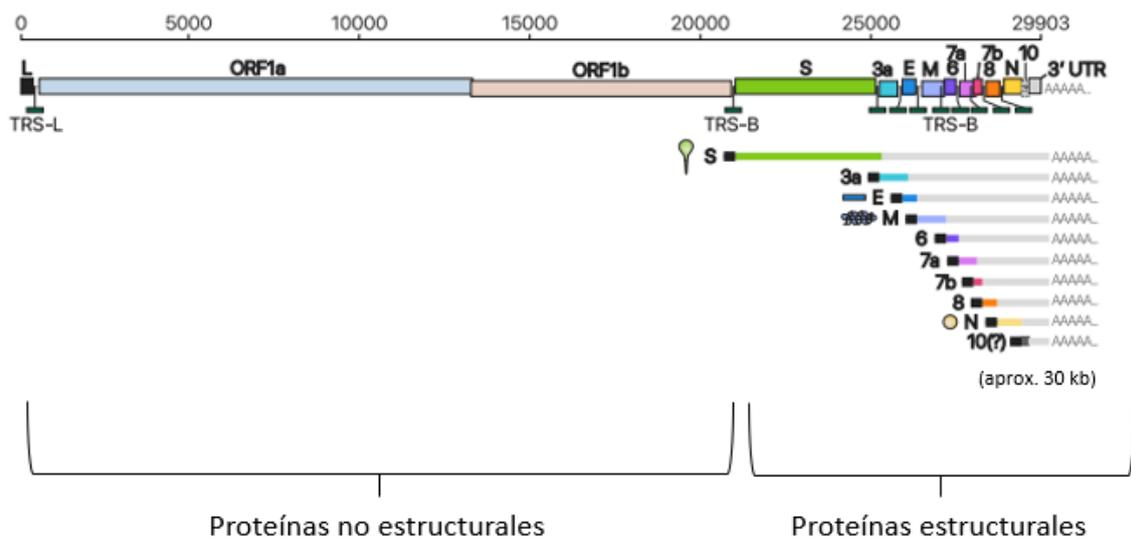


Figura 2. Estructura genómica del SARS-CoV-2. Adaptado de Kim et al., 2020 (19).

Las primeras 20 kb desde el extremo 5' corresponden con los ORF1a y ORF1ab. Estos codifican dos proteínas no estructurales, las poliproteínas de la replicasa pp1a y pp1ab respectivamente. Estas, a su vez, son divididas por dos proteasas virales esenciales, la proteasa tipo papaína (PLpro) y la proteasa tipo 3C (3CLpro), en 16 proteínas no

estructurales que incluyen la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (figura 3). Además, al inicio de este extremo 5' se localiza una región genómica que cuenta con dos dominios diferentes, la secuencia líder y la región no traducida (UTR), que tienen la capacidad de formar estructuras en bucle para la posterior replicación y transcripción del virus (20).

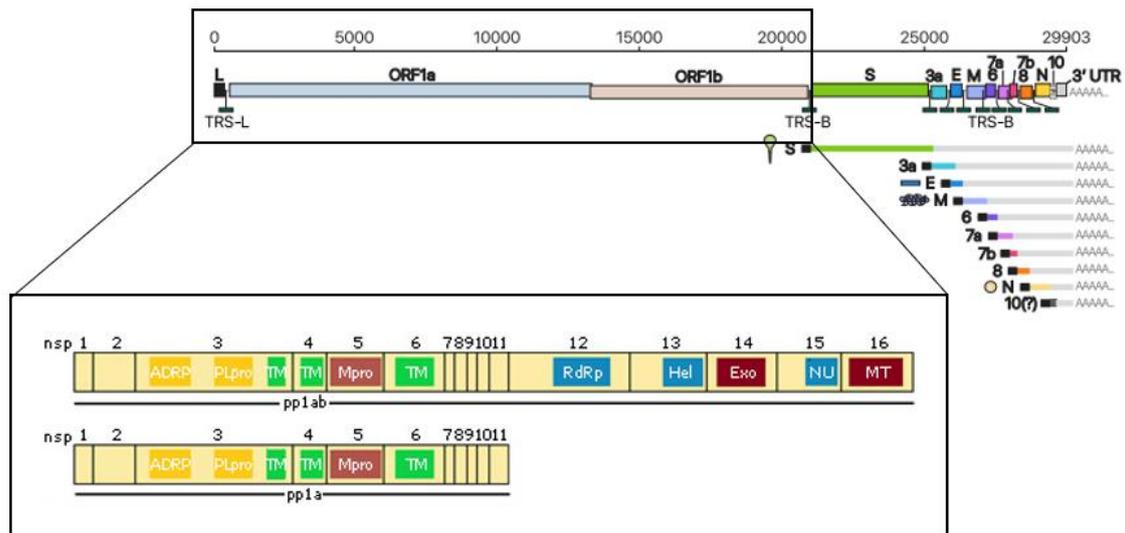


Figura 3. Esquema de las poliproteínas pp1a y pp1ab codificadas por los genes ORF1a y ORF1ab respectivamente. PLpro: proteasas tipo papaína; TM: transmembrana; Mpro: proteasa tipo quimotripsina; RdRp: ARN-polimerasa dependiente de ARN; Hel: helicasa; Exo: 3'-5' exonucleasa; NU: endorribonucleasa específica de uridilato; MT: ribosa-2'-O-metiltransferasa; nsp: proteína no estructural. Adaptado de Kim et al. (2020) y Sotomayor Lugo et al., 2020 (19,21).

El análisis filogenético de todo el genoma del SARS-CoV-2 indica que está relacionado con el SARS-CoV y el SARSr-CoV encontrado en murciélagos. Dentro de este clado, el SARS-CoV-2 se incluye en un linaje similar a cuatro coronavirus relacionados con el murciélago (RaTG13, RmYN02, ZC45 y ZXC21) y con uno encontrado en el pangolín (Pangolin-CoV) (13,22).

El Comité Internacional de Taxonomía de los Virus le dio el nombre a este virus después de analizar la secuencia de cinco dominios replicativos conservados en pp1ab (la proteasa similar a 3C (3CLpro), una ARN-polimerasa dependiente de ARN de nidovirus asociada a una nucleotidiltransferasa (NiRAN), la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp), un dominio de unión a zinc (ZBD) y una helicasa de la superfamilia 1 (HEL-1)) (13).

El gen S del SARS-CoV-2 es el más largo dentro de los que codifican las proteínas estructurales (15). Contiene 1.273 aminoácidos frente a los 1.255 del SARS-CoV y a los 1.245-1.269 del SARSr-CoV de murciélago. También se diferencia entre los virus pertenecientes al subgénero *Sarbecovirus*, compartiendo similitudes de secuencia de aminoácidos de 76,7 a 77% con SARS-CoV de humanos (12,13), de 75 a 97,7% con coronavirus de murciélago y de 90,7 a 92,6 % con coronavirus de pangolín. En el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S, la similitud de aminoácidos entre el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV es del 73% (13).

La proteína S cuenta con una inserción de 4 residuos de aminoácidos entre la unión de las subunidades S1 y S2, donde se genera un sitio de escisión que permite la separación eficaz por furina y otras proteasas (13).

Replicasa:

El gen que codifica para la replicasa ocupa dos tercios del genoma 5' y codifica dos poliproteínas (pp1a y pp1ab) que, como ya se ha mencionado, se escinden proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales implicadas en la replicación y transcripción del virus. La mayoría de estas proteínas no estructurales comparten más de un 85% del genoma con las del SARS-CoV (13,20).

Espícula:

La partícula vírica del SARS-CoV-2 tiene forma esférica de 60-140 nm de diámetro. Al microscopio electrónico, se pueden observar unas ramificaciones en su superficie llamadas espículas y que le dan el aspecto de “corona” por el cual recibe su nombre esta familia de virus (23).

La proteína de la espícula (S), que forma un trímero y tiene una densidad de aproximadamente 24-30 trímeros por superficie viriónica (24), es la responsable de la unión del virus al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2) localizado en la superficie de la célula humana (25). Consta de dos subunidades: S1, cuya función es la unión al receptor, y S2, que se encarga de la fusión del virus. La subunidad S1 contiene un dominio N-terminal (NTD, residuos 14-306), un dominio de unión al receptor (RBD, residuos 331-528) que incluye el motivo de unión al receptor (RBM, residuos 436-506) y el dominio C-terminal (CTD), dividido en CTD1 (residuos 529-591) y CTD2 (residuos 592-686) (figura 4). Por otro lado, la subunidad S2 cuenta con el péptido de fusión (FP, residuos 816-836), la región proximal del péptido de fusión (FPPR, residuos 837-857), la repetición heptada 1 (HR1, residuos 911-985), la hélice central (CH, residuos 986-1.036), el dominio conector (CD, residuos 1.037-1.068), la repetición heptada 2 (HR2, residuos 1.164-1.211), el segmento transmembrana (TM, residuos 1.212-1.234) y la cola citoplasmática (CT, residuos 1.235-1.273) y su función es mediar en la fusión entre el virus y la célula huésped (10,26).

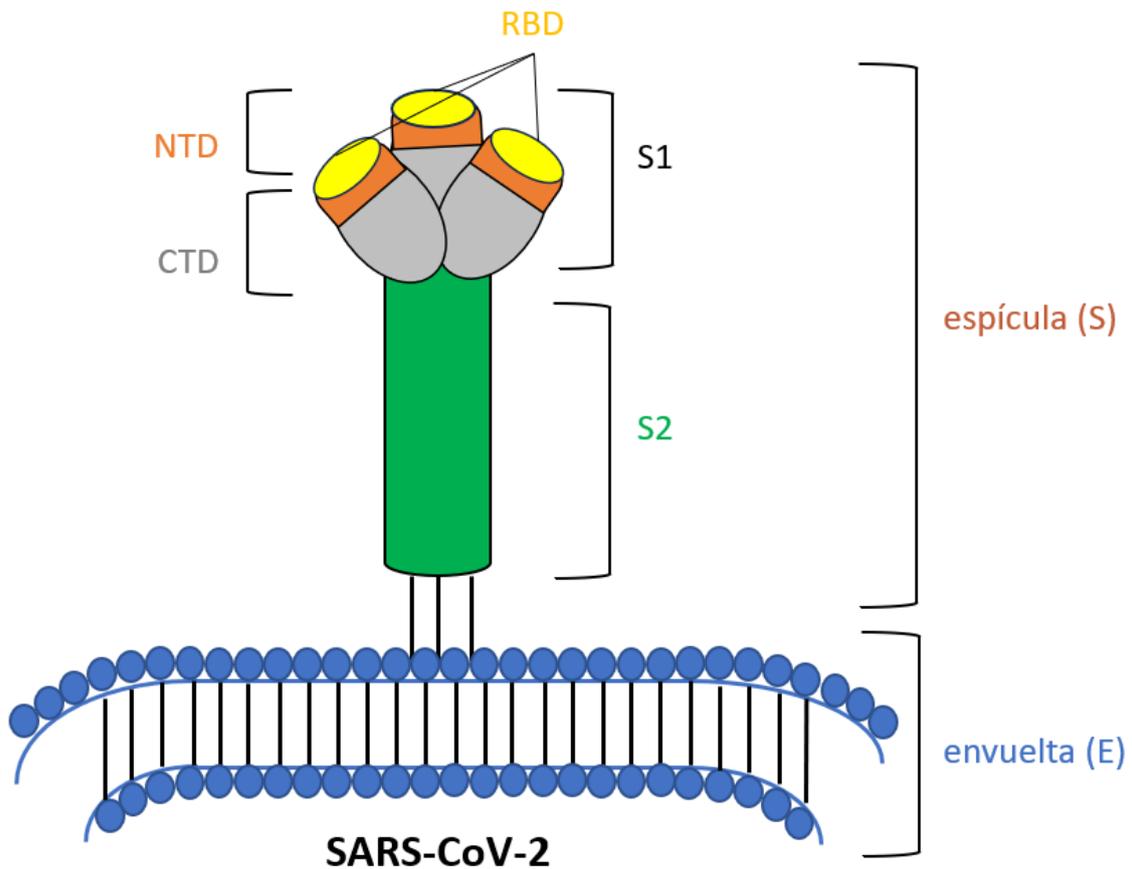


Figura 4. Estructura de la espícula de SARS-CoV-2.

El dominio de unión al receptor (RBD) es el lugar por el que el virus se pondrá en contacto con las células humanas a través del receptor de ACE-2 y entrará en ellas. Cuando esto ocurre, el RBD sufre un cambio conformacional y pasa del estado abierto (o “arriba”) al cerrado (o “abajo”) (10).

Llama la atención la estructura ORF8 que codifica una proteína que solo comparte un 40% de la secuencia de aminoácidos con el ORF8 del SARS-CoV. Según estudios llevados a cabo en Singapur, la eliminación de este ORF podría correlacionarse con la transmisión y adaptación del virus de animales a humanos (13).

La proteína S, además de adoptar un papel fundamental en la entrada del virus a la célula huésped, es la principal inductora de la producción de anticuerpos neutralizantes (27). Por tanto, es considerada como pieza clave en el desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2 (26).

A pesar de su importancia en la interacción del virus y la célula, esta región puede sufrir mutaciones. La mayoría de los cambios afectan negativamente a la expansión del virus, pero algunos pueden lograr aumentar su infectividad o su transmisibilidad y, con ello, favorecer su difusión, como se ha visto con la mutación D614G, que fomenta la unión del virus al receptor, o la H655Y, que mejora la escisión de la proteína S. Otras mutaciones en esta proteína pueden inducir resistencia a los anticuerpos, lo que le confiere al virus una ventaja en cuanto a la evasión del sistema inmune (24).

Envuelta:

Esta proteína codifica un péptido de 75 residuos (28).

Aquí se localizan la mayoría de las proteínas estructurales: la proteína de la espícula, la proteína de la membrana y la proteína de la envuelta, además de otras como la hemaglutinina esterasa (HE), la proteína 3 o la proteína 7a, por mencionar algunas (23).

Su papel fundamental lo juega facilitando el ensamblaje y liberación del virus (23). Se le considera una viroporina que interviene en la conducción iónica del virus actuando como un canal selectivo de cationes a través de la membrana ERGIC (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*) (25,29). Las mutaciones que afectan a esta región atenúan la actividad del canal ocasionando una disminución de la patogenicidad del virus (29).

Membrana:

La membrana (M) es la proteína estructural más abundante y se considera la llave principal para el ensamblaje del virus y para la gemación de la membrana. Esta proteína se localiza en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi y constituye un lugar donde atraer a otras proteínas estructurales (25).

Contiene tres segmentos estructurales: tres hélices externas transmembrana N-terminal (NH₂-) incrustadas en la envuelta viral, un dominio de sándwich de hoja β C-terminal (-COOH) dentro del virión dividido en una hoja externa (β1, β2, β6, and β7) y otra interna (β3, β4, β5 y β8) y una bisagra de unión entre ambas estructuras que adopta una estructura de giro helicoidal (figura 5) (25,27).

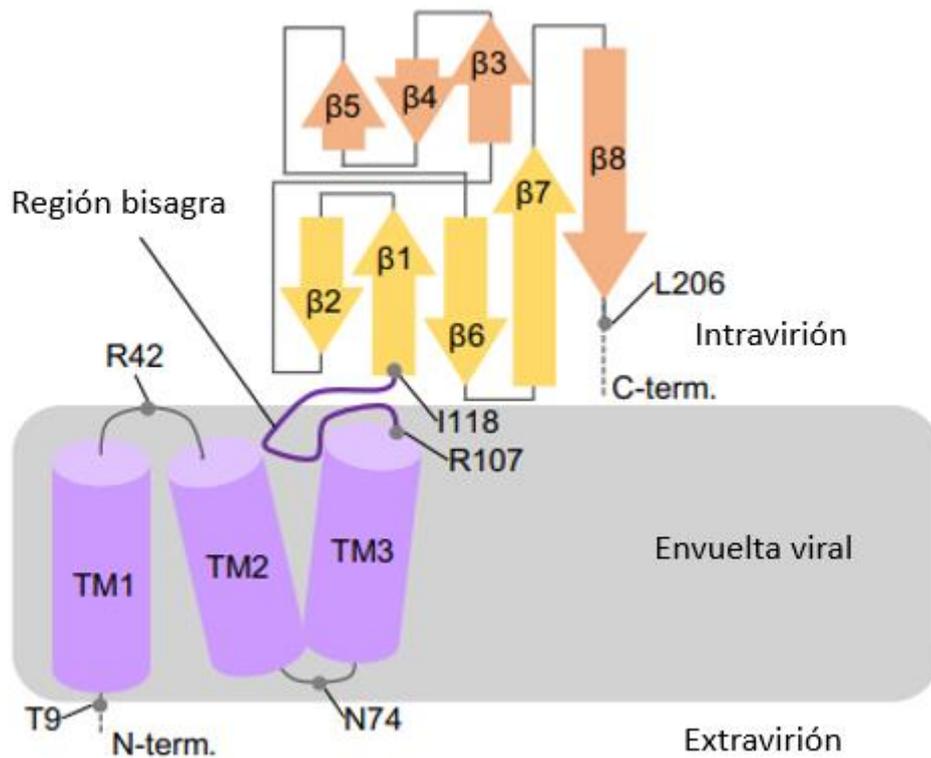


Figura 5. Estructura de la proteína M, donde se indican los elementos de la estructura secundaria (N-terminal y C-terminal) y las regiones bisagras. Adaptado de Zhang et al., 2022 (25).

Evolutivamente, se ha comprobado que está relacionada filogenéticamente con las estructuras ORF3a en *Sarbecovirus*, ORF5 en el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y las proteínas M de algunos *Torovirus* (25).

Nucleocápside:

La nucleocápside (N) es la responsable del empaquetamiento y protección de la hebra sencilla de ARN (23,25).

El material genético se encuentra asociado a la proteína de la nucleocápside, que se encuentra fosforilada y dentro de la bicapa de fosfolípidos de la envuelta exterior (23).

1.2.2 Ciclo biológico

Para que haya infección en la célula huésped una vez el virus ha entrado en el organismo, se debe dar la unión entre la proteína S y el receptor de ACE-2 en el neumocito (figura 6). Este receptor se encarga de regular la presión arterial al convertir la angiotensina I en angiotensina II y se localiza, principalmente, en el pulmón (tracto respiratorio bajo, en concreto en las células alveolares tipo 2 (23)), aunque también se puede encontrar en el corazón, riñón, estómago, vejiga, esófago, intestino (30) y en la boca (en las células epiteliales de la lengua) (23). La unión del SARS-CoV-2 y el receptor de ACE-2 de la célula huésped a través del RBD (en la subunidad S1) se lleva a cabo mediante 4 pares de enlaces disulfuro (C336-C361, C379-C432, C391-C525 y C480-C488) que estabilizan la unión. A su vez, el motivo de unión al receptor (RBM), forma una estructura cóncava para acoger la hélice N-terminal de la ACE-2. Se dan 13 enlaces de hidrógeno, 2 puentes salinos (entre K417 del RBD y el D30 del receptor de ACE-2) y varias interacciones hidrofóbicas (entre F486 del RBD y L79, M82 e Y83 del receptor de ACE-2) que contribuyen al acoplamiento del receptor de ACE-2. El SARS-CoV-2 tiene una particularidad frente al SARS-CoV y es que en el primero se dan interacciones de puente salino entre K417 (fuera de la región RBM) de la proteína S y D30 de ACE-2 que no se dan en el segundo (10). Por su parte, la región CTD envuelve a la subunidad S2 a través de CTD1 y CTD2 (10).

Existen dos enzimas (la serin-proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) y una proteína transmembrana, la furina) con actividad proteasa que se encargan de cortar, por la posición S2' y la inserción de cuatro residuos (PRRA) (31) respectivamente (figura 7), la proteína S en sus dos subunidades, S1 y S2, una vez llevada a cabo la unión del RBD con el receptor de ACE-2 para que el virus pueda entrar en la célula (32,33). La proteína S cambia, entonces, de su conformación prefusión (durante la cual se da la unión entre el RBD y el receptor ACE-2) a su conformación postfusión. Los estudios han descubierto que la conformación prefusión de la proteína S induce una mejor inmunogenicidad y, por lo tanto, puede considerarse un antígeno diana ideal (figura 8) (26).

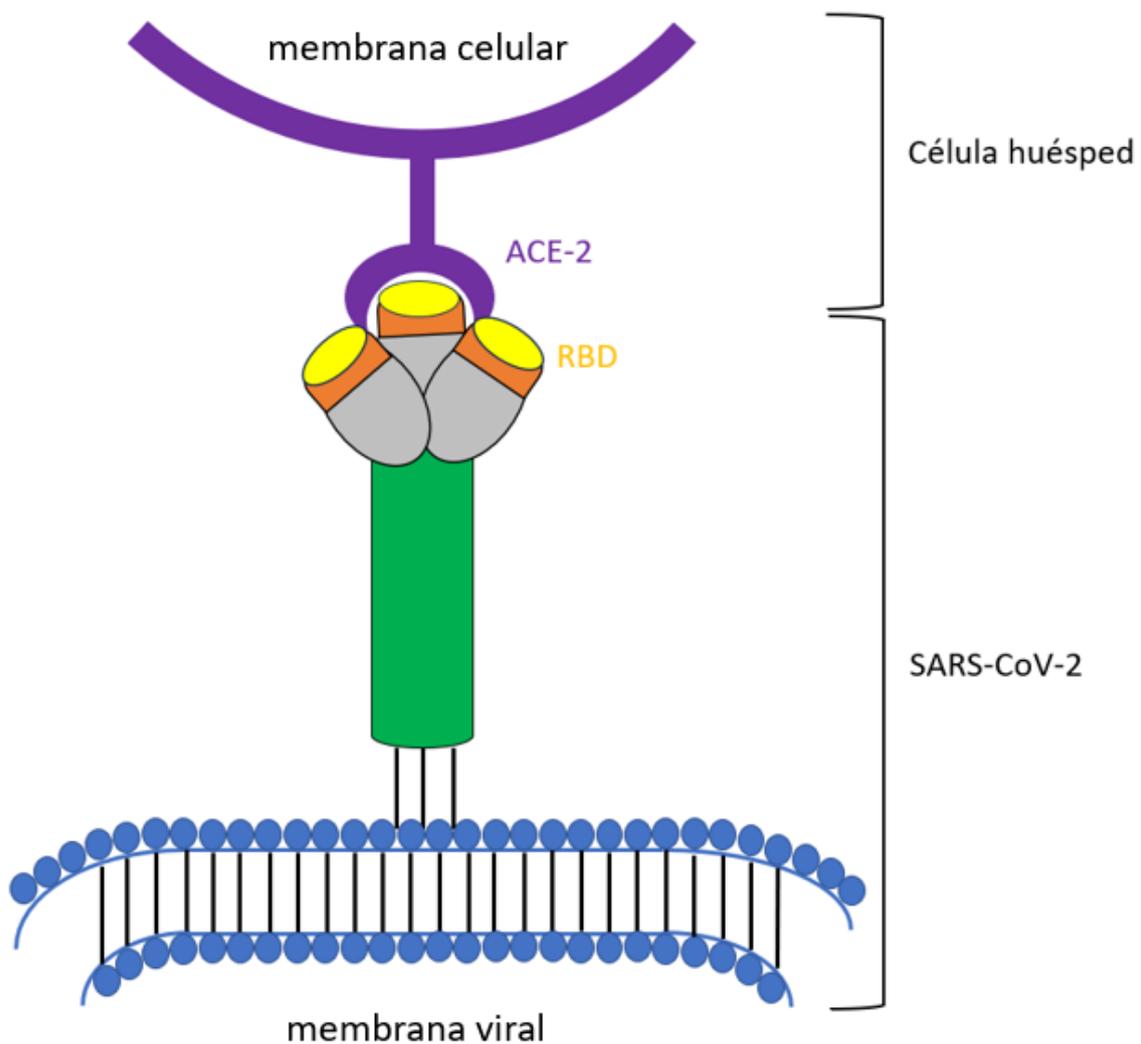


Figura 6. Unión de RBD al receptor ACE-2 en la célula huésped.



Figura 7. Escisión de los dominios S1 y S2 por acción de la furina. Adaptado de Jackson et al., 2021 (34).

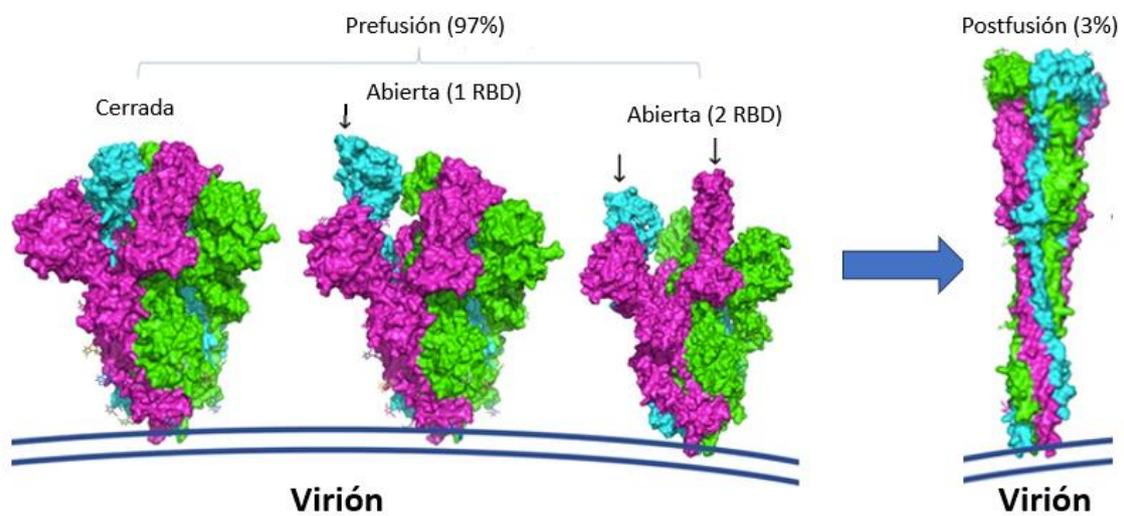


Figura 8. Conformación pre y postfusión de la espícula del SARS-CoV-2. Adaptado de Alaa y Abdo, 2020 (35).

La subunidad S2 queda, en ese momento, descubierta y procederá a unir la membrana viral con la de la célula infectada a través de enlaces hidrófobos. Posteriormente, ambas membranas se fusionarán y el virus entrará por endocitosis (figura 9) (32,36).

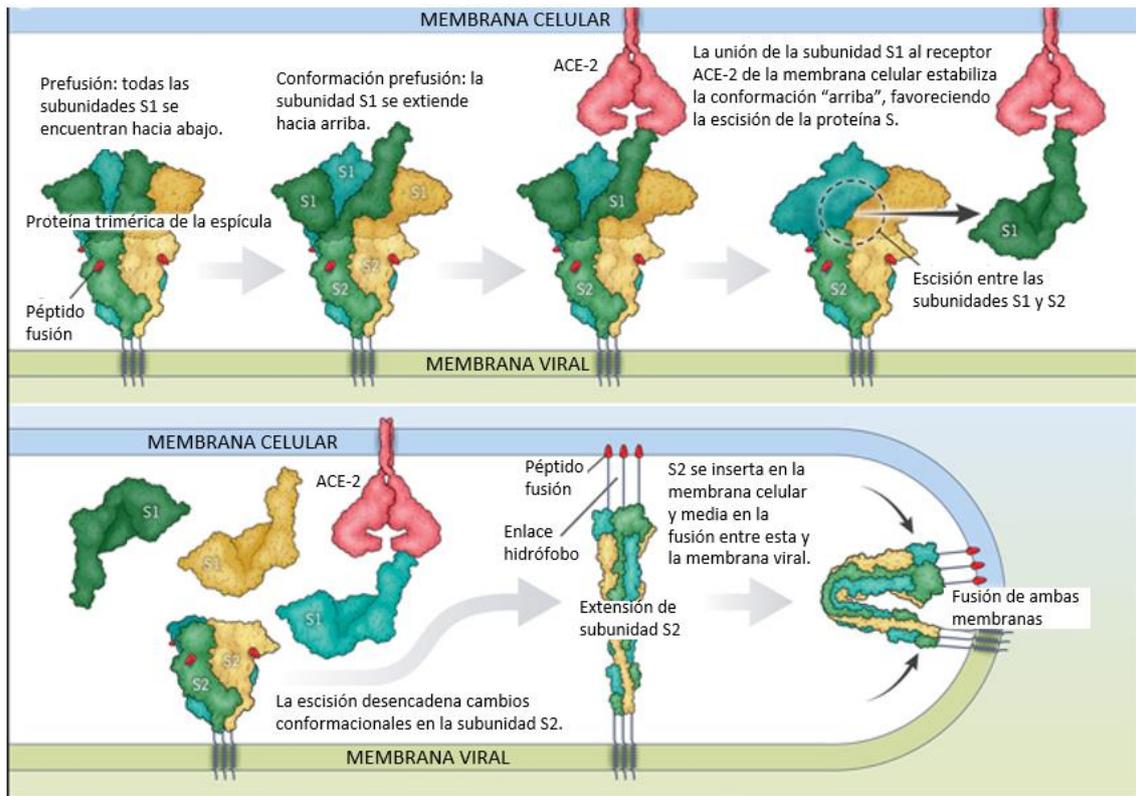


Figura 9. Entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped. La subunidad S se encuentra en conformación de prefusión. Un trímero S1 sobresale hacia arriba. Las tres regiones RBD en la subunidad S1 de la espícula entran en contacto con tres receptores ACE-2 de la membrana celular. Tras la acción de las proteasas TMPRSS2 y furina, se escinde la subunidad S en S1 y S2. Los receptores ACE-2 desplazan la subunidad S1 para dejar al descubierto la subunidad S2. Esta subunidad se extiende hasta unirse a los péptidos de fusión en la membrana celular mediante enlaces hidrófobos. Posteriormente, se pliega sobre sí misma para fusionar ambas membranas. El virus entrará por endocitosis en la célula y podrá liberar su material genético y multiplicarse. Adaptado de SAVALnet: *nanocuerpos para la COVID-19, 2023* (37).

Una vez dentro, la nucleocápside se libera y permite la salida al exterior del ARN genómico del virus. Un ARN mensajero (ARNm) transcribe directamente la proteína de la replicasa viral hacia el extremo 5' gracias a la acción de ORF1a y ORF1ab, seguido de la traducción de las poliproteínas pp1a y pp1ab (27).

Posteriormente, se forma el complejo replicasa-transcriptasa (RTC). Para ello, se deben romper las proteínas pp1a y pp1ab a través de enzimas proteasas como quimiotripsina tipo 3C (3CLpro), proteasa principal (Mpro) y una o dos proteasas similares a la papaína (38). Este proceso da lugar a 16 proteínas no estructurales (nsp1 – nsp16), necesarias para la formación del RTC. A su vez, este se introduce en las vesículas de doble membrana formadas a partir del retículo endoplásmico (RE) (39). Estas proteínas no estructurales se dedican, la mayoría de ellas, a la replicación y transcripción del genoma, aunque también pueden tener actividad enzimática tipo proteasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), helicasa, exo y endorribonucleasa y metiltransferasa (40). Las proteínas nsp6, nsp7 y nsp8 pueden jugar un papel importante en la desregulación de la respuesta inmune, aunque no se conoce exactamente su función, al contrario que las otras (38). Para terminar, el RTC replica y sintetiza una serie de ARNm subgenómicos (ARNsg) (40), que codifican para las proteínas estructurales S, E, M y N y para las proteínas accesorias (hacia el extremo 3') (39).

El ARN viral sintetiza, inicialmente, una copia de ARN monocatenario de polaridad negativa (ARNmc-) a partir de la cual se forman las poliproteínas pp1a y pp1ab, que generan, como ya se ha dicho anteriormente, el RTC. Este, a su vez, produce una nueva copia del ARN monocatenario de polaridad positiva propio del virus a partir del molde de la hebra de polaridad negativa. Este nuevo ARN se asocia con la proteína N formando la nucleocápside (23). Las demás proteínas estructurales y las accesorias son elaboradas en el RE y, posteriormente, transportadas al complejo de Golgi donde producirán, junto con la nucleocápside, nuevas partículas víricas que se liberarán a través de la membrana plasmática mediante la formación de vesículas (figura 10) (39).

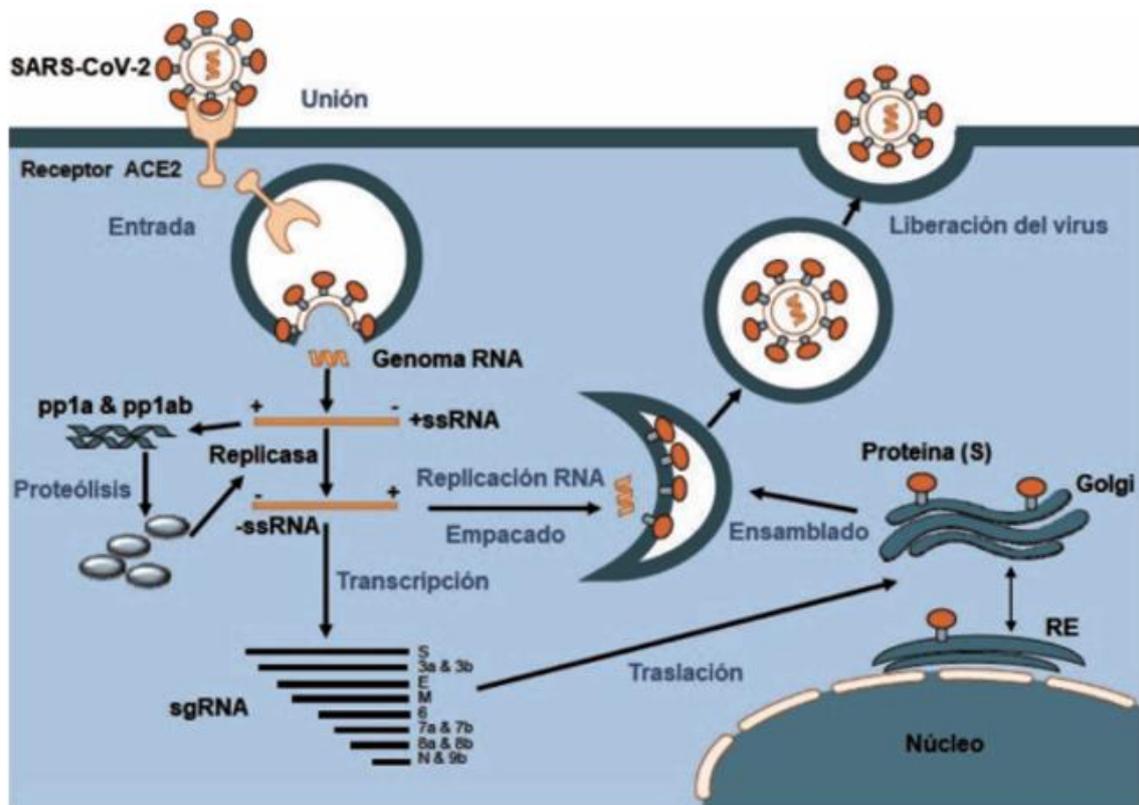


Figura 10. Mecanismo de patogénesis de SARS-CoV-2. La infección empieza con la unión de la proteína S al receptor ACE-2 de la célula huésped. La partícula viral se introduce en esta célula por endocitosis, liberando su material genético, el ARN monocatenario de polaridad positiva (ARNmc+; +ssRNA en inglés), que se replica a ARN monocatenario de polaridad negativa (ARNmc-; -ssRNA en inglés) y luego se traduce en las poliproteínas pp1a y pp1ab. Estas proteínas sufren una proteólisis enzimática, tras la cual generan las 16 proteínas no estructurales (nsp) del complejo replicasa-transcriptasa (RTC). Dicho complejo replica y sintetiza un conjunto de ARNm subgenómicos (ARNsg; sgRNA en inglés) que codifican para la producción de las proteínas estructurales principales: S, M, E y N, así como las proteínas accesorias. Todas estas proteínas se ensamblan en el complejo de Golgi para formar las nuevas partículas víricas en el retículo endoplásmico y ser liberadas de la célula infectada como nuevos viriones (23).

1.2.3 Epidemiología

En la actualidad, el SARS-CoV-2 supone una de las mayores pandemias de los últimos tiempos, después del cólera (1816-1826, 1865-1917), la gripe española (1918-1920) o el SIDA (1980-actualidad) (41).

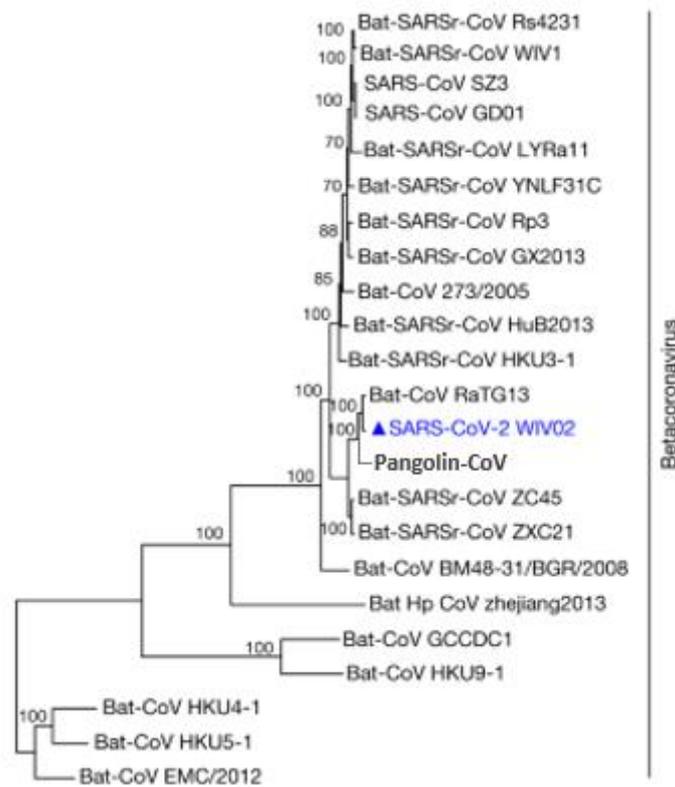
A día 14/02/2024, los datos de incidencia de COVID-19 facilitados por la OMS eran de 774.469.939 casos confirmados y 7.026.465 fallecimientos a nivel mundial, 13.980.340 y 121.852 respectivamente en España (42).

La COVID-19 se ha considerado una enfermedad inmune autolimitada, ya que la mayoría de los pacientes no requiere tratamientos ni soportes adicionales y resuelve la enfermedad en 1-2 semanas (30). Se han dado casos de pacientes asintomáticos (1,2% de los casos), leves (80,9%), graves (13,8%), críticos (4,7%) y casos que han terminado en fallecimiento (2,3%) (30). En la población pediátrica de menos de 10 años, los casos asintomáticos suponen un 16%, por lo que debería tenerse en cuenta como una importante fuente de contagio (43).

1.2.4 Transmisión

La hipótesis principal del desarrollo de la pandemia es que el SARS-CoV-2 tiene un origen zoonótico (44). Mediante el análisis de la secuencia genómica viral, se observó que una de las fuentes del virus podrían ser los murciélagos: la secuencia genómica del SARS-CoV-2 comparte un 96,2% con RaTG13 (45), 93,3% con RmYN02 (46) y 92,6% con RshSTT200 y RshSTT182 (47), cepas derivadas de coronavirus encontrados en murciélagos. También se han encontrado similitudes del 90,1% con coronavirus de pangolines malayos (*Manis javanica*) y chinos (*M. pentadactyla*) (esquema 1) (48). El SARS-CoV-2 humano tiene una única inserción de cuatro aminoácidos entre los dominios S1 y S2 de la proteína S, que genera un sitio de unión para la enzima furina. Esta unión aumenta la eficiencia de la infección viral de las células (49). A pesar de que el SARS-CoV-2 está estrechamente relacionado con RaTG13 de los murciélagos, solamente uno de los cuatro aminoácidos

críticos es idéntico entre los 2 virus. Sin embargo, entre el SARS-CoV-2 y el pangolin-CoV-GDC todos los aminoácidos críticos son idénticos (48). Esto puede significar que el SARS-CoV-2 pudo haber surgido de la recombinación de un virus similar a pangolin-CoV con uno similar a RaTG13 (50,51) o bien que los sitios funcionales idénticos en SARS-CoV-2 y pangolin-CoV-GDC son resultado de una evolución convergente coincidente (figura 11) (48,52).



Esquema 1. Relación filogenética entre los coronavirus de murciélagos (*bat*), pangolín y SARS-CoV-2. Adaptado de Xiao et al., 2020 (51).

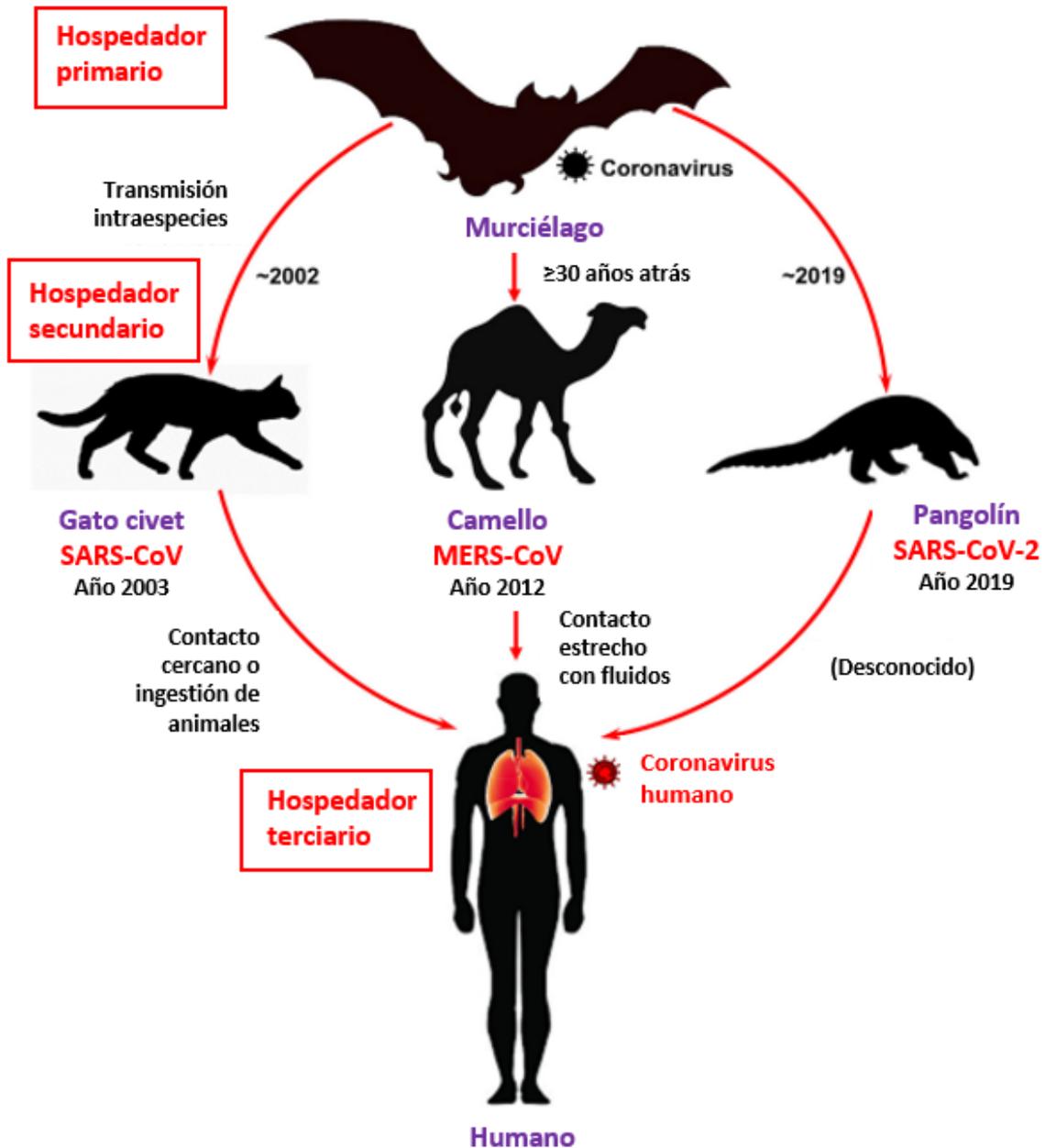


Figura 11. Representación esquemática de transmisión zoonótica de SARS-CoV-1, MERS y SARS-CoV-2. Adaptado de Kirtipal, Bharadwaj y Kang, 2020 (53).

La principal vía de transmisión entre personas se da a través de las secreciones de una persona infectada, sobre todo por contacto directo de gotículas respiratorias de un tamaño de 5-10 μm liberadas al estornudar, toser o hablar y a una distancia aproximada de un metro de una persona sana (54). Este contagio se da porque la cavidad oral y la saliva constituyen un reservorio de ARN (entre $7,03 \times 10^3$ y $6,38 \times 10^8$ copias/ml) que

provocan que estas gotículas actúen como vectores del virus (17). Además, este contagio puede darse desde algunos días antes del inicio de los síntomas. La generación de aerosoles mediante nebulización de un fármaco, la intubación endotraqueal, la broncoscopia, la traqueotomía o la reanimación cardiopulmonar, entre otros procedimientos (55), pueden favorecer el contagio entre personas y este depende directamente de la concentración del virus (56).

Por otra parte, la carga viral en la región nasofaríngea está estrechamente relacionada con la posibilidad de transmisión del SARS-CoV-2. Se ha observado que, en aquellos pacientes con síntomas más leves se detecta una carga viral mayor en la primera semana de la enfermedad y va disminuyendo con los días (57), llegando hasta el día 8 desde el inicio de los síntomas sin que se pueda aislar el virus viable en la orofaringe (58). En cuanto a los pacientes asintomáticos, se ha visto que estos también pueden ser contagiosos (59).

Así mismo puede existir transmisión a través de manos o fómites contaminados con estas secreciones que, posteriormente, entren en contacto con la boca, nariz u ojos (55). El tiempo de supervivencia de las partículas infectivas es variable y depende de la humedad, el tipo de superficie sobre el que se deposite y las características del propio virus (60). Según distintos estudios, tiene mayor capacidad de propagación en madera, papel (61), superficies húmedas (62) y mucosas, así como en agua y alimentos (63).

En el estudio llevado a cabo por Van Doremalen et al. se analizó el distinto tiempo de permanencia del virus en las diferentes superficies (cobre, cartón, acero inoxidable, plástico y aerosol) en comparación con el virus SARS-CoV (tabla 2) (64).

También se ha determinado que puede haber transmisión fecal-oral (65) con una clínica de diarrea, vómitos y náuseas. Sin embargo, no está del todo claro esta vía de transmisión y deben continuar los estudios (55).

No se tiene evidencia de transmisión por vía sanguínea, orina, semen ni secreción vaginal (66). Tampoco se ha observado transmisión vertical, transplacentaria, a través de líquido amniótico o leche materna, a pesar de que haya recién nacidos con anticuerpos frente a SARS-CoV-2 procedentes de la madre infectada (67,68).

Virus	Parámetro Observado	Material				
		Cobre	Cartón	Acero inoxidable	Plástico	Aerosol
SARS-CoV-1	Tiempo de permanencia [h]	8	8	48	72	3
	Observación después del tiempo de permanencia	No hay muestra viable	No hay muestra viable	Reducción de $10^{3.4}$ a $10^{0.7}$ TCID ₅₀ por mL	Reducción de $10^{3.6}$ a $10^{0.6}$ TCID ₅₀ por mL	Reducción de $10^{4.3}$ a $10^{3.5}$ TCID ₅₀ por mL
SARS-CoV-2	Tiempo de permanencia [h]	4	24	48	72	3
	Observación después del tiempo de permanencia	No hay muestra viable	No hay muestra viable	Reducción de $10^{3.7}$ a $10^{0.6}$ TCID ₅₀ por ml	Reducción de $10^{3.7}$ a $10^{0.6}$ TCID ₅₀ por ml	Reducción de $10^{3.5}$ a $10^{2.7}$ TCID ₅₀ por litro de aire

Tabla 2. Comparación del tiempo de permanencia entre el SARS-CoV o SARS-CoV-1 y el SARS-CoV-2 sobre ciertas superficies a temperatura de 21-23°C y 40% de humedad relativa durante 7 días (64).

Las medidas de prevención son, principalmente, la higiene de manos con jabón o gel hidroalcohólico, el uso de mascarillas higiénicas, con filtro de partículas (FFP2 o FFP3) que cubran nariz y boca y mantener una distancia física de seguridad que evite el contacto con personas con síntomas respiratorios o fiebre (55). Hay estudios que sugieren que el etanol al 30% (p/p) (36,2% (v/v)) es eficaz para inactivar el SARS-CoV-2 (69).

1.2.5 Síntomas

La enfermedad de la COVID-19, causada por el SARS-CoV-2 ha contagiado, en la actualidad, a más de 750 millones de personas en todo el mundo desde 2019. Alrededor

del 80% de los pacientes se recuperan espontáneamente de la enfermedad sin necesidad de tratamiento ni ingreso hospitalario. El 15% pueden llegar a sufrir una forma grave de la enfermedad y con requerimiento de oxigenoterapia y el 5% puede llegar a un estado crítico y precisar cuidados intensivos hospitalarios (70).

Los síntomas han sido distintos según las variantes que han ido surgiendo, pero en general la mayoría de pacientes han sufrido fiebre, tos, congestión, cefalea, dolor de garganta, debilidad, fatiga o dolor muscular (71). Otros síntomas frecuentes han sido anosmia (pérdida del olfato) y ageusia (pérdida del gusto (esto podría explicarse por la alta concentración del SARS-CoV-2 en la garganta (72))), erupciones cutáneas, diarrea, náuseas y vómitos y menos frecuentes, trastornos del sueño, estado delirante o lesiones neuronales (71).

En los casos más graves se han descrito disnea, pérdida de apetito, confusión, dolor en pecho (70), neumonía, síndrome de distrés respiratorio, trombosis o coagulación intravascular diseminada (CID) . En algunos casos, esta enfermedad ha terminado en el fallecimiento del paciente (71).

El tiempo que tardan los síntomas en manifestarse es entre 5-6 días de media, si bien es cierto que puede haber casos en los que se amplíe ese intervalo a 1-14 días. Por eso, las personas que hayan estado en contacto con el virus deben permanecer aisladas y evitar el contacto con el resto de la gente para frenar, en la medida de lo posible, la propagación del virus (70).

También se han descrito grupos de riesgo y situaciones basales que pueden hacer a una persona más propensa a sufrir la forma grave de la enfermedad. Tener una edad mayor a 60 años, además de padecer algún tipo de afección cardíaca, pulmonar, de hipertensión arterial, diabetes, cáncer u obesidad, puede suponer un factor de riesgo. No obstante, cualquier persona puede desarrollar el cuadro más grave de la enfermedad e incluso morir sin tener ninguna de estas patologías previamente.

Todavía se desconocen los efectos de la enfermedad a largo plazo, aunque sí se han descrito casos en los que algunos pacientes han desarrollado fatiga y distintos síntomas respiratorios y neurológicos (por ejemplo, pérdida de memoria). La Organización

Mundial de la Salud (OMS) está desarrollando una red para llevar a cabo diversos estudios con el fin de determinar el porcentaje de pacientes que sufren efectos a largo plazo, durante cuánto tiempo y la causa (70). Cada vez hay una evidencia más clara de que las personas vacunadas tienen menos probabilidad de sufrir una COVID-19 prolongada que las no vacunadas, aunque se necesitan más estudios (73).

1.2.5.1 Tormenta de citoquinas

Existe un subgrupo de pacientes con infección grave de COVID-19 en el que se ha observado una característica tormenta de citoquinas con afectación principalmente a nivel pulmonar mediante la formación de una membrana hialina y la infiltración de linfocitos intersticiales (74). La tormenta de citoquinas de la COVID-19 se caracteriza por una elevada expresión de interleukina (IL) 6 y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (75). La gravedad de esta tormenta de citoquinas radica en que estos pacientes terminan desarrollando un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (75) y posteriormente fallecen. Según algunos autores, esta tormenta se divide en dos etapas: la primera es una inmunodeficiencia temporal similar a una linfocitosis hemofagocítica (HLH) primaria y la segunda es un estado inmunológico sobreactivado para compensar la no eliminación del virus (76).

Tras la entrada del virus en la célula huésped, las células epiteliales alveolares, los macrófagos y los monocitos en sangre se activan a través de receptores tipo Toll como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) por el propio virus, produciendo gran cantidad de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, que atraen, a su vez, a más células inmunitarias, en particular, monocitos y células T, lo que provoca una inflamación pulmonar generalizada (77). La interleukina 6 (IL-6) ha sido identificada como el factor predictivo más significativo en la mortalidad de estos pacientes (78). Esta tormenta de citoquinas también se ha observado en otras enfermedades víricas como en el SARS, el MERS, la gripe H5N1, la gripe H7N9 y otros virus con afectación respiratoria (79). Las citoquinas que se ven elevadas en la COVID-19 son IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-18, el factor estimulante de granulocitos (GM-CSF), la proteína IP-10, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la proteína quimioatrayente de monocitos 3

(MCP-3), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1A), la quimiocina atrayente de células T cutáneas (CTACK), el interferón gamma (IFN- γ) y el TNF- α (80). Además, se observa un descenso significativo de células T (CD4⁺, CD8⁺ y totales) que guarda gran correlación con la gravedad de la enfermedad (81). La leucopenia, en concreto la linfopenia, se ha visto como un factor típico en las tormentas de citoquinas y se ha asociado con su gravedad (82).

La IL-6 ve aumentada su producción, a su vez, por la activación de monocitos inflamatorios CD14⁺ y CD16⁺, activados por el GM-CSF, que también producen TNF- α y otras citoquinas (83).

Estado de COVID-19	No infectado	Leve-moderada	Severa
Síntomas	ninguno	fiebre, mialgia, fatiga, disnea	fiebre, mialgia, fatiga, disnea, SDRA, fallo multiorgánico
Citoquinas	ninguna	↑ IL-6, IL-10, TNF- α	↑↑ IL-6, IL-10, TNF- α , IL-2, MCP-1
Linfopenia de células T	ninguna	↓ CD4 ⁺ y CD8 ⁺	↓↓ CD4 ⁺ y CD8 ⁺

Tabla 3. Síntomas, secreción de citoquinas y linfopenia de células T relacionados con la gravedad de la COVID-19. Abreviaciones: SDRA (síndrome de distrés respiratorio agudo), IL-6 (interleukina 6), IL-10 (interleukina 10), TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-2 (interleukina 2), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1) (75).

En los pacientes graves, los niveles de IL-2 e IFN- γ en suero descienden hasta el nivel basal en los 7-9 días posteriores al inicio de la enfermedad, sin embargo, la IL-6 y la IL-10 permanecen constantemente más altos tras 13-15 días desde el inicio de la enfermedad (84). No se ha detectado ninguna diferencia significativa en los niveles séricos de IL-4 entre los pacientes leves y graves a lo largo de todo el curso de la enfermedad (85).

A nivel de laboratorio, la detección de citoquinas se complementa con la determinación de la proteína C reactiva (PCR), la ferritina, el dímero D y la procalcitonina (74). La

disminución de plaquetas y el aumento del dímero D pueden explicar los microtrombos que se forman en órganos vitales como los pulmones, cerebro, corazón, hígado o riñones y que llevan a un peor pronóstico o, incluso, a la muerte (77).

1.2.6 Tratamiento

En la actualidad, han sido numerosas las opciones terapéuticas que se han desarrollado para poder tratar los síntomas de la COVID-19, incluyendo fármacos antivirales (molnupiravir, nirmatrelvir/ritonavir, remdesivir), anticuerpos monoclonales anti-SARS-CoV-2 (bamlanivimab/etesevimab, casirivimab/imdevimab, sotrovimab, bebtelovimab), fármacos antiinflamatorios (dexametasona) y fármacos inmunomoduladores (baricitinib, tocilizumab, sarilumab), todas disponibles bajo la Autorización de Uso de Emergencia (EUA) emitida por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) o siendo evaluadas para el manejo de la COVID-19 (86). La OMS mantiene una lista actualizada de tratamientos recomendados donde también incluye el oxígeno como uno de los tratamientos más utilizados e importantes a nivel mundial para pacientes con COVID-19 muy grave (70).

Estos medicamentos han sido utilizados en base a la gravedad de la enfermedad o en situaciones donde había determinados factores de riesgo. En una primera fase, el SARS-CoV-2 se replica y aparecen los síntomas y en una segunda fase se produce un estado hiperinflamatorio por la liberación al torrente sanguíneo de citoquinas y la activación del sistema de coagulación que induce un estado protrombótico. Es probable que los antivirales y los anticuerpos monoclonales actúen más eficazmente durante la primera fase de replicación vírica y los antiinflamatorios como los corticoides, los inmunomoduladores o la combinación de ambos, durante la segunda (87).

A continuación, se incluyen los fármacos que se han propuesto a lo largo de la pandemia como opciones terapéuticas para el tratamiento clínico de la COVID-19 (86). Algunos de ellos han sido descartados después de comprobar su baja o nula acción frente a la enfermedad.

1.2.6.1 Antivirales

- **Molnupiravir**

El molnupiravir es un antivírico oral de amplio espectro que actúa directamente sobre la enzima RdRp y se desarrolló inicialmente como posible tratamiento contra la gripe y los alfavirus, incluidos los virus que producían ciertos tipos de encefalitis. Actualmente, está aprobado por la FDA bajo una EUA para su uso en pacientes que estén en alto riesgo de progresión de la enfermedad a un estadio grave incluyendo hospitalización o muerte, y para aquellos pacientes con COVID-19 para los que las otras opciones terapéuticas aprobadas no son clínicamente apropiadas o accesibles (88).

En un metaanálisis que recogía los ensayos clínicos de fase I-III disponibles se observó que el molnupiravir demostraba una reducción significativa de la hospitalización y muerte en la COVID-19 leve. Los resultados de un ensayo de fase III doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo demostraron que el tratamiento precoz inicial con molnupiravir reducía el riesgo de hospitalización o muerte en adultos de riesgo no vacunados contra SARS-CoV-2 que sufrían enfermedad leve a moderada (86,89). Por otro lado, otro ensayo de fase III doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo concluyó que el tratamiento precoz con molnupiravir redujo el riesgo de hospitalización o muerte en adultos no vacunados en situación de riesgo con COVID-19 leve a moderada confirmada por laboratorio (86,89). Además, ha demostrado tener eficacia frente a la variante actual Ómicron y sus sublinajes (90).

- **Nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid®)**

Paxlovid® es una combinación oral de dos agentes antivirales (nirmatrelvir y ritonavir) que en un análisis provisional de los datos de un ensayo clínico en fase II-III que incluyó a 1.219 pacientes, encontró que el riesgo de ingreso hospitalario relacionado con la COVID-19 o la mortalidad por cualquier causa fue 89% menor en el grupo de Paxlovid® en comparación con el grupo control cuando se inició el tratamiento dentro de los tres días de inicio de los síntomas (86,91). El 22 de

diciembre de 2021, la FDA emitió una EUA para el uso de Paxlovid® en la COVID-19 leve a moderada en adultos y niños a partir de 12 años con un peso superior a 40 kg con riesgo de progresión de la enfermedad a hospitalización o muerte (92). Este medicamento ha demostrado ser eficaz frente a la variante actual Ómicron y sus sublinajes (90).

- **Remdesivir**

Al inicio de la pandemia, no existía ningún antiviral efectivo en el mercado contra el SARS-CoV-2. Sin embargo, más tarde, el grupo de Cao et al. (93) demostró que el remdesivir (GS-5734), un profármaco antivírico análogo de nucleósidos (adenosina) y de amplio espectro, podría tener efecto sobre algunos coronavirus animales y humanos, incluyendo el SARS-CoV, además de que, después de ciertos estudios *in vitro*, este fármaco podría inhibir la replicación del SARS-CoV-2, el SARS-CoV y el MERS-CoV (86,93). Esto lo haría mediante su unión a la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) viral, consiguiendo frenar prematuramente la transcripción del ARN (94). Este fármaco fue aprobado por la FDA para su uso en perfusión intravenosa (95) en adultos y pacientes pediátricos (mayores de 12 años y con un peso igual o superior a 40 kilogramos) basándose en los resultados de tres ensayos clínicos aleatorizados y controlados que demostraron que el uso de remdesivir era superior al placebo para acortar el tiempo de recuperación en adultos hospitalizados con COVID-19 de leve a grave. No obstante, en otro ensayo, SOLIDARITY de la OMS, realizado en 405 hospitales de 40 países y en el que participaron 11.330 pacientes hospitalizados con COVID-19 asignados aleatoriamente para recibir remdesivir (2.750) o ningún fármaco (4.088), se demostró que el remdesivir tenía poco efecto o ninguno sobre la mortalidad general, el inicio de la ventilación mecánica y la duración de la estancia hospitalaria. Un ensayo diferente, llevado a cabo por el grupo de Gottlieb et al., aleatorizado doble ciego controlado con placebo publicado en enero de 2022 informó de un riesgo 87% menor de hospitalización o muerte que el grupo placebo cuando los pacientes en riesgo no hospitalizados con COVID-19 fueron tratados con un ciclo de 3 días de remdesivir (86,96). A pesar de tratarse

de un fármaco experimental, su uso combinado con baricitinib demostró una reducción de la recuperación en un día de pacientes con COVID-19 (97). Remdesivir tiene actividad neutralizante frente a las principales variantes de preocupación (VOC), incluyendo la Ómicron y sus sublinajes (90,98).

	MOLNUPIRAVIR (Lagevrio®)	NIRMATRELVIR/ RITONAVIR (Paxlovid®)	REMDESIVIR (Verklury®)
Características del estudio pivotal	1433 pacs. no hospitalizados (17% >60a; 16% DM; 73% ob.) ≤ 5 días síntomas NO vacunados	2246 pacs. no hospitalizados (9% >65a) ≤ 5 días síntomas	562 pacs. no hospitalizados (30% >60a; 60% DM; 55% ob.) ≤ 7 días síntomas
Posología	Oral, 5 días	Oral, 5 días	IV, 3 días
End-point primario	Hospitalización/muerte 29 días	Hospitalización/muerte 28 días	Hospitalización (no hubo muertes)
Resultado	Placebo 9,7% (68/699) Molnupiravir 6,8% (48/709)	Placebo 6,3% (66/1046) Nirmatrelvir/ritonavir 0,8% (8/1039)	Placebo 53% (15/283) Remdesivir 0,7% (2/279)
Eficacia /NNT	30% / 31	87% / 18	87% / 18
Inconvenientes	No en niños ni embarazadas Acceso complicado	Interacciones ritonavir En seropositivos: no diferencias	IV Elevación de transaminasas
Ventajas	No interacciones	Aprobado FDA en <12 años Ajuste de dosis en IR (no recomendado <30ml/min)	No interacciones Estudiado en embarazadas

Tabla 4. Diferencias entre remdesivir, nirmatrelvir/ritonavir y molnupiravir. Remdesivir (a través de su principal metabolito, GS-441524) y molnupiravir (a través de su forma activa, EIDD-1931) inhiben la ARN polimerasa dependiente del ARN, mientras que nirmatrelvir (PF-07321332) inhibe la proteasa. DM: diabetes mellitus; a: años; ob: obesidad; IR: insuficiencia renal. Adaptado de Alberto Romero, 2022 (99).

Subvariante	Susceptibilidad a fármacos antivíricos (μmol)*		
	<u>Molnupiravir</u>	<u>Nirmatrelvir</u>	<u>Remdesivir</u>
Cepa de referencia**	2.8	2.7	1.7
BA.1	7.5	4.8	1.9
BA.1.1	6.0	3.9	2.0
BA.2	8.7	6.9	5.9
BA.2.12.1	3.2	1.8	0.5
BA.4	3.3	2.9	1.2
BA.5	4.1	4.4	2.0

Tabla 5. Eficacia *in vitro* de fármacos antivirales frente a la variante Ómicron (BA) y sus sublinajes. *La susceptibilidad a los fármacos antivirales se midió como la concentración inhibitoria del 50% del valor micromolar (μmol) medio de las reacciones por triplicado. **La cepa de referencia fue SARS-CoV-2/UT-NC002-1T/Human/2020/Tokio. Adaptado de Takashita et al, 2022 (100).

- **Favipiravir**

El favipiravir es similar al remdesivir y estructuralmente similar a la guanina endógena, por lo que inhibe la ARN-polimerasa dependiente de ARN. Además, esta inhibición competitiva reduce la eficacia de la replicación del virus. A pesar de que no existen muchos estudios que avalen su uso en el tratamiento de la COVID-19, se ha usado junto con el interferón- α para aumentar la inmunidad y suprimir el virus. De hecho, favipiravir fue aprobado por la Administración Nacional de Productos Médicos de China en marzo de 2020 como el primer fármaco anti-SARS-CoV-2 en China debido a su probada eficacia y bajos efectos secundarios, lo que fue demostrado por un ensayo clínico (101).

- **Hidroxiclороquina y cloroquina**

La hidroxiclороquina (HCQ) y la cloroquina fueron dos de los fármacos que se plantearon como tratamiento para la COVID-19 al principio de la pandemia (86).

Estos fármacos son de sobra conocidos por su uso como tratamiento de la malaria, lupus o la artritis reumatoide, y con un buen perfil de eficacia y seguridad y cierta actividad *in vitro* frente al SARS-CoV-2, no tanto por tener actividad antivírica, sino por su capacidad para interactuar con el sistema inmunológico (102). Sí que se aprobó en Francia, China y Corea con algunas recomendaciones para que se usara en combinación con otros fármacos como lopinavir, ritonavir, IFN- α , umifenovir y, en muchos casos, con azitromicina. Se vio que era eficaz eliminando la presencia del virus en la nasofaringe y, así, disminuyendo el número de pacientes portadores en un periodo de tres a seis días (en la mayoría de los pacientes). En los primeros estudios realizados, se observó que el uso de hidroxiclороquina suponía una diferencia significativa en pacientes tratados con este fármaco al tercer día de uso con respecto al grupo control. Estos resultados fueron de gran importancia debido al estudio que ha demostrado que la duración media de la eliminación de SARS-CoV-2 en pacientes que padecen COVID-19 en China fue de 20 días (incluso 37 días para la duración más larga) y que la retinopatía es una de las principales reacciones adversas de la terapia a largo plazo con HCQ, que demostró una eficacia de alrededor del 90% (97). Sin embargo, los datos de otros ensayos controlados aleatorizados que evaluaron el uso de hidroxiclороquina con o sin azitromicina en pacientes hospitalizados demostraron que no mejoraba el estado clínico ni la mortalidad en comparación con el placebo (86). Además, según otros ensayos controlados aleatorizados, la hidroxiclороquina utilizada como profilaxis postexposición no previno la infección por SARS-CoV-2 ni la enfermedad sintomática. Más tarde, en un estudio observacional, se publicó que el uso de la HCQ estaba asociado a un aumento en la mortalidad de los pacientes los que se les había administrado. Ello llevó a que la OMS suspendiera temporalmente los ensayos en los que se administraba este fármaco (102). Ninguno de estos dos fármacos está indicado en la actualidad para el tratamiento de la COVID-19 (86).

- **Lopinavir/ritonavir**

El lopinavir/ritonavir se trata de una terapia combinada aprobada por la FDA para el tratamiento del VIH que se postuló como terapia antivírica contra el SARS-CoV-2 al inicio de la pandemia (86). No obstante, un ensayo controlado aleatorizado demostró que el tratamiento con lopinavir/ritonavir no produjo ningún beneficio con respecto al tratamiento estándar en pacientes hospitalizados con COVID-19 grave (103). Actualmente, lopinavir/ritonavir no está indicado para el tratamiento de la COVID-19 en pacientes hospitalizados y no hospitalizados (86).

- **Ivermectina**

La ivermectina es un antiparasitario aprobado por la FDA que se ha usado en todo el mundo para el tratamiento de la COVID-19 basándose en los datos arrojados por un estudio *in vitro* que concluyó que podía frenar la replicación del SARS-CoV-2 (104). Otro ensayo de control aleatorizado, doble ciego y unicéntrico en el que participaron 476 pacientes adultos con enfermedad leve por COVID-19 a los que se les asignó al azar para recibir bien ivermectina 300 µg/kg durante cinco días o bien placebo no demostró ninguna diferencia significativa en la mejoría de los pacientes ni la resolución de los síntomas (105). Actualmente, la ivermectina no está indicada para el tratamiento de la COVID-19 en pacientes hospitalizados y no hospitalizados (86).

1.2.6.2 Anticuerpos monoclonales

- **Bamlanivimab y etesevimab.**

El bamlanivimab (LY-CoV555 o LY3819253) y el etesevimab (LY-CoV016 o LY3832479) son dos potentes anticuerpos monoclonales neutralizantes. Bamlanivimab se ha obtenido de plasma de un paciente con COVID-19. Se ha observado que el etesevimab, *in vitro*, se une a un epítipo diferente del bamlanivimab y neutraliza las variantes a las que el bamlanivimab es resistente

(86). En la fase II del ensayo BLAZE-1, la combinación de ambos se asoció a una reducción significativa de la carga viral del SARS-CoV-2 en comparación con el placebo (106). Los datos preliminares de la fase III parecen indicar que el tratamiento reduce el riesgo de hospitalización y muerte en un 87% (86).

- **Casirivimab e imdevimab**

REGN-COV2 es una combinación de dos anticuerpos monoclonales anti-inmunoglobulina G1 no competidores, casirivimab e imdevimab, dirigidos contra el fragmento RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Esta combinación ha demostrado disminuir la carga viral *in vivo* en estudios testados en primates no humanos, además de prevenir las posibles complicaciones patológicas producidas por el virus cuando se administra profiláctica o terapéuticamente (86,107). Además, un ensayo doble ciego con 275 pacientes no hospitalizados con COVID-19 que fueron divididos aleatoriamente para recibir 2,4 g de REGN-COV2 (casirivimab 1,2 g e imdevimab 1,2 g), 8 g de REGN-COV2 (casirivimab 2,4 g e imdevimab 2,4 g) o placebo concluyó que la combinación de los dos anticuerpos monoclonales redujo la carga viral en comparación con el placebo, además de que su perfil de seguridad era similar al del grupo control (86,108). Los datos preliminares de otro ensayo de fase III de REGN-COV2 revelaron una reducción del 70% de las hospitalizaciones o muertes en pacientes no hospitalizados con COVID-19 (86). *In vitro*, se ha comprobado que este medicamento es eficaz frente a las VOC Alfa y Delta, pero no frente a Ómicron (109).

- **Cilgavimab y tixagevimab**

AZD7442 es el nombre que recibe la combinación de cilgavimab y tixagevimab, dos anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-espícula obtenidos a partir de anticuerpos aislados de células B de pacientes infectados con SARS-CoV-2 que han demostrado actividad neutralizante contra el virus al unirse a la región RBD

de la proteína S (86). Los resultados de un ensayo en fase II, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y controlado han demostrado la eficacia y la seguridad de este medicamento para la prevención de la COVID-19 en aquellos pacientes de alto riesgo, aquellos que tuvieron una respuesta inadecuada a la vacuna y aquellos que no la pudieron recibir (86,110). En diciembre de 2021 la FDA aprobó una EUA para esta combinación de anticuerpos monoclonales para su uso en profilaxis preexposición de SARS-CoV-2 en adultos y población pediátrica (a partir de 12 años y peso mínimo de 40 kg) sin evidencia de infección por SARS-CoV-2 en el momento de la administración y sin contacto reciente con individuos positivos con SARS-CoV-2, para aquellos que presenten una inmunosupresión moderada o severa debido a distintos tipos de afecciones y tratamientos o que estén en tratamiento con inmunosupresores y no puedan generar una respuesta inmunitaria adecuada a la vacunación con COVID-19 o en personas en las que la vacunación contra el SARS-CoV-2 esté contraindicada debido a antecedentes de reacciones adversas graves a la vacuna o a sus componentes (86).

- **Sotrovimab**

El sotrovimab (VIR-7831) es un potente anticuerpo monoclonal neutralizante frente a la espícula que demostró actividad *in vitro* contra las primeras cuatro variantes de preocupación Alfa, Beta, Gamma y Delta. Un análisis multicéntrico, doble ciego, en fase III arrojó resultados provisionales sobre la disminución del riesgo de hospitalización o muerte en un 85% en pacientes de alto riesgo con COVID-19 leve a moderada no hospitalizados a los que se les había administrado 500 mg de sotrovimab frente al grupo control (86,97).

- **Bebtelovimab**

Bebtelovimab (LY-CoV1404, 1404) es un anticuerpo monoclonal neutralizante que se une a la región RBD de la proteína S. Se usa solo o en combinación con bamlanivimab y etesevimab en pacientes ambulatorios con COVID-19 leve o

moderada. De hecho, según publicó Doughan et.al en un preprint en 2022, el uso de esta combinación demostró eliminar de manera más eficaz el virus y una mayor rapidez de la resolución de la enfermedad (111). Es el único anticuerpo monoclonal que parece tener efecto neutralizante frente a algunos sublinajes de Ómicron, pero no frente a los recombinantes (XBB), BQ.1, BQ.1.1 ni CH.1.1 (86,109).

- **Adintrevimab**

Es un anticuerpo monoclonal humano de inmunoglobulina G1 neutralizante frente a las variantes de SARS-CoV-2, que se basa tanto en la reducción de la carga viral y de la clínica pulmonares como en la inhibición de la replicación viral en el tracto respiratorio superior e inferior. Se une a un epítipo en el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 que se superpone parcialmente al sitio de unión de la ACE-2 y está altamente conservado entre los *Sarbecovirus*. Ha demostrado una gran actividad neutralizante frente a las VOC, excepto frente a Ómicron (112).

- **Regdanvimab**

Este fármaco actúa impidiendo la interacción entre la proteína S y el receptor ACE-2, por tanto, dificulta la entrada del virus en la célula. Un estudio, llevado a cabo por los investigadores Mungmunpuntipantip y Wiwanitkit (113) demostró que el uso de regdanvimab para el tratamiento de la COVID-19 de leve a moderada disminuyó en gran medida el desarrollo de la enfermedad; no obstante, este beneficio se vio comprometido frente a la variante Delta (114). Los estudios llevados a cabo en los que se ha usado este fármaco para el tratamiento de la COVID-19 con la variante Ómicron indican que no tiene efecto frente a esta variante, por tanto, se desaconseja su uso (109).

- **Amubarvimab y romlusevimab**

Amubarvimab y romlusevimab son dos anticuerpos monoclonales de administración intravenosa y que actúan contra la proteína S del SARS-CoV-2, aunque uniéndose a distintos epítomos del RBD (115,116) (en ensayos en cultivo celular, el amubarvimab bloquea la entrada del virus en la célula y neutraliza la infección activa por SARS-CoV-2, mientras que el romlusevimab tiene un efecto aditivo cuando se combina con el amubarvimab). La Administración Nacional de Productos Médicos de China aprobó su uso en diciembre de 2021, después de haber sido desarrollados por Bii Biosciences, la Universidad de Tsinghua y el Tercer Hospital Popular de Shenzhen. Se pueden usar en combinación y su uso está restringido a pacientes con COVID-19 leve a moderada de más de 12 años con un peso corporal mayor de 40 kg (aprobación condicional) con un elevado riesgo de progresar a una enfermedad grave, incluida la hospitalización o la muerte (116). En un estudio de fase III, se vio que la hospitalización o muerte de los pacientes fue menor en el grupo donde se administró este medicamento que en el grupo control (117).

Los datos *in vitro* manifiestan que la actividad neutralizante de esta combinación de fármacos se mantiene frente a las principales variantes del SARS-CoV-2, incluidas las VOC (Alfa, Beta, Gamma, Delta). En cuanto a la última VOC, Ómicron, parece tener cierta actividad frente a BA.1, XBB y BQ.1, pero muestra resistencia frente a las demás (109,116).

Test\mAb	BAM	ETE	BAM/ETE	CAS	IMD	CAS/IMD	CIL	TIX	CIL/TIX	SOT	BEB	ADI
Alpha	1 ₂₃	13 ₂₀	1.3 ₉	1 ₃₂	0.6 ₃₃	0.9 ₁₄	0.6 ₁₅	1.5 ₁₄	0.8 ₁₄	1.8 ₃₀	0.9 ₆	1.3 ₆
Beta	>1000 ₂₅	516 ₂₅	990 ₁₂	91 ₃₃	0.6 ₃₈	1.6 ₁₉	1.1 ₁₆	5.8 ₁₇	1.7 ₁₆	1 ₃₁	1 ₈	2.8 ₆
Gamma	>1000 ₁₆	348 ₁₆	404 ₄	124 ₂₄	0.4 ₂₄	1 ₉	0.5 ₁₂	3.7 ₁₁	0.9 ₁₀	1 ₂₃	1 ₅	2.2 ₆
Delta	>1000 ₂₅	0.4 ₂₅	1 ₉	0.7 ₃₃	1.5 ₃₄	1.3 ₁₄	2.4 ₁₅	1.0 ₁₆	1 ₁₇	1.1 ₃₁	1 ₁₂	1.5 ₆
Omicron/BA.1	>1000 ₄₂	459 ₄₂	980 ₁₇	>1000 ₅₀	>1000 ₅₁	>1000 ₂₃	263 ₄₈	264 ₅₀	63 ₃₅	3.8 ₆₄	1 ₂₇	108 ₂₀
Omicron/BA.2	>1000 ₂₄	515 ₂₄	744 ₁₅	>1000 ₂₄	219 ₃₃	387 ₂₃	1.8 ₃₉	928 ₃₈	8 ₃₆	21 ₆₂	1 ₃₃	>1000 ₁₅
Omicron/BA.2.12.1	>1000 ₁₂	515 ₁₂	794 ₈	>1000 ₁₃	125 ₁₂	250 ₂	2.8 ₁₅	410 ₁₅	9.1 ₁₀	20 ₁₈	1 ₁₃	968 ₆
Omicron/BA.2.75	>1000 ₉	383 ₃	554 ₅	477 ₁₁	>1000 ₁₁	>1000 ₇	14 ₁₅	29 ₁₅	24 ₁₁	12 ₁₅	3.1 ₁₅	437 ₇
Omicron/BA.2.75.2	556 ₂	489 ₂	>1000 ₁	589 ₄	588 ₄	>1000 ₃	>1000 ₇	>1000 ₇	>1000 ₇	8 ₆	2.8 ₇	509 ₂
Omicron/XBB	>1000 ₁	>1000 ₁	-	589 ₂	588 ₂	200 ₁	>1000 ₃	>1000 ₃	738 ₂	14 ₄	>1000 ₄	>1000 ₁
Omicron/XBB.1	>1000 ₁	>1000 ₁	>1000 ₁	880 ₃	>1000 ₃	887 ₃	>1000 ₆	>1000 ₆	>1000 ₆	15 ₆	900 ₆	-
Omicron/XBB.1.5	-	-	-	650 ₂	572 ₂	751 ₂	433 ₃	>1000 ₃	867 ₃	18 ₆	476 ₄	-
Omicron/XBB.1.16	-	-	-	420 ₁	143 ₁	615 ₁	127 ₁	448 ₁	488 ₁	5.3 ₁	149 ₁	-
Omicron/BA.4/5	>1000 ₁₉	504 ₁₉	588 ₁₁	>1000 ₂₆	143 ₂₆	387 ₁₇	8.1 ₁₃	>1000 ₃₃	25 ₂₇	22 ₃₉	1 ₂₉	>1000 ₁₃
Omicron/BA.4.6	556 ₂	489 ₂	>1000 ₁	589 ₄	173 ₄	738 ₃	527 ₆	819 ₆	738 ₆	44 ₆	1 ₇	509 ₂
Omicron/BQ.1	-	-	-	177 ₁	175 ₁	200 ₁	>1000 ₃	>1000 ₃	>1000 ₃	26 ₆	900 ₄	-
Omicron/BQ.1.1	>1000 ₂	97 ₂	>1000 ₁	>1000 ₄	>1000 ₄	>1000 ₃	>1000 ₇	>1000 ₇	>1000 ₆	118 ₆	>1000 ₇	>1000 ₂
Omicron/BF.7	-	-	-	>1000 ₁	383 ₁	878 ₁	>1000 ₃	>1000 ₃	>1000 ₃	48 ₆	1.3 ₄	-
Omicron/CH.1.1	-	-	-	>1000 ₁	>1000 ₁	>1000 ₁	>1000 ₂	>1000 ₂	>1000 ₂	16 ₃	>1000 ₂	-
Iota	>1000 ₁₀	1.4 ₁₁	11 ₅	9.3 ₁₁	1.4 ₁₁	1 ₅	0.8 ₅	2.9 ₄	1.0 ₆	0.8 ₅	0.9 ₄	3.5 ₁
Epsilon	>1000 ₇	1 ₇	8 ₁	1.2 ₆	1.7 ₆	0.8 ₃	2.7 ₅	2.1 ₂	1.2 ₆	0.8 ₆	0.9 ₄	1.5 ₁
Kappa	>1000 ₇	0.9 ₆	6 ₃	9.6 ₆	2.1 ₇	1 ₅	2.4 ₃	0.7 ₃	1.3 ₇	0.8 ₆	0.9 ₂	2.3 ₂
Lambda	>1000 ₁	0.4 ₃	-	0.9 ₄	2.7 ₆	1.6 ₂	-	1 ₁	0.6 ₂	1.5 ₅	1 ₁	1.3 ₂
Mu	714 ₄	8.9 ₄	40 ₄	6.2 ₄	1 ₅	1.8 ₄	27 ₂	3 ₁	7.1 ₈	1.1 ₆	5.3 ₁	5 ₃

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales usados para la COVID-19 aprobados por la FDA bajo uso en emergencias en cuanto a su efecto neutralizante frente a variantes del SARS-CoV-2. Color blanco: susceptibilidad; color azul claro: susceptibilidad intermedia; color azul oscuro: resistencia. Abreviaturas de los anticuerpos monoclonales (mAb): BAM: Bamlanivimab/LY-CoV555/LY3819253; ETE: Etesevimab/LYCoV016/JS016/CB6; CAS: Casirivimab/REGN10933; IMD: Imdevimab/REGN10987; CIL: Cilgavimab/COV2- 2130/AZD1061; TIX: Tixagevimab/COV2-2196/AZD8895; SOT: Sotrovimab/Vir-7831/S309; BEB: Bebtelovimab/LYCoV1404/LY3853113; ADI: Adintrevimab/ADG20/ADG-2 (109,118).

Test\mAb	REG	AMU	ROM	AMU/ROM	DXP-604	C135	C144	C135/C144	JMB2002	Vir-7832
Alpha	1.2 ₄	0.6 ₄	0.2 ₃	1.5 ₄	0.8 ₂	1.2 ₃	1.3 ₂	-	-	2.8 ₂
Beta	39 ₃	0.6 ₈	6 ₃	1.8 ₄	8.3 ₂	1 ₃	>1000 ₃	-	-	0.9 ₂
Gamma	61 ₃	0.6 ₂	0.7 ₁	2.5 ₁	0.6 ₂	1.4 ₁	728 ₂	-	-	0.8 ₂
Delta	28 ₇	0.3 ₃	-	2.5 ₁	1.6 ₃	0.4 ₂	1.8 ₄	-	12 ₁	0.5 ₁
Omicron/BA.1	>1000 ₁₄	134 ₁₈	0.9 ₁₀	12 ₅	18 ₄	>1000 ₆	>1000 ₁₁	-	1.2 ₁	3.1 ₁
Omicron/BA.2	>1000 ₁₀	156 ₁₄	7.3 ₁	106 ₇	20 ₃	>1000 ₃	>1000 ₃	-	0.9 ₂	-
Omicron/BA.2.12.1	>1000 ₆	143 ₇	34 ₄	88 ₃	18 ₂	>1000 ₅	>1000 ₃	-	65 ₂	-
Omicron/BA.2.75	42 ₃	81 ₇	53 ₃	41 ₄	538 ₂	>1000 ₃	>1000 ₃	-	15 ₁	-
Omicron/BA.2.75.2	90 ₁	376 ₄	40 ₅	333 ₃	91 ₁	-	-	-	>1000 ₁	-
Omicron/XBB	-	125 ₂	0.8 ₁	12 ₁	91 ₁	>1000 ₁	>1000 ₁	-	>1000 ₁	-
Omicron/XBB.1	>1000 ₁	587 ₂	51 ₁	725 ₁	-	-	-	-	-	-
Omicron/XBB.1.5	-	297 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-
Omicron/XBB.1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Omicron/BA.4/5	>1000 ₃	69 ₂	16 ₁	51 ₇	570 ₃	>1000 ₁	>1000 ₃	-	369 ₁	-
Omicron/BA.4.6	>1000 ₁	38 ₃	23 ₃	62 ₃	374 ₁	-	-	-	-	-
Omicron/BQ.1	-	158 ₂	0.8 ₁	12 ₁	91 ₁	-	-	-	-	-
Omicron/BQ.1.1	>1000 ₁	177 ₄	30 ₂	397 ₂	91 ₁	>1000 ₁	>1000 ₁	-	>1000 ₁	-
Omicron/BF.7	-	52 ₃	16 ₂	67 ₂	374 ₁	-	-	-	-	-
Omicron/CH.1.1	-	322 ₂	24 ₂	229 ₂	909 ₁	-	-	-	>1000 ₁	-
Iota	3.9 ₂	-	-	2.5 ₁	-	-	-	-	-	-
Epsilon	54 ₇	-	-	2.5 ₁	-	-	-	-	-	-
Kappa	24 ₃	-	-	2.5 ₁	-	-	-	-	-	1 ₁
Lambda	16 ₁	-	-	2.5 ₁	1 ₁	-	-	-	-	-
Mu	39 ₁	-	-	2.5 ₁	-	-	728 ₂	-	-	-

Tabla 7. Anticuerpos monoclonales usados para la COVID-19 por su efecto neutralizante frente a variantes del SARS-CoV-2 testados en otros estudios. Color blanco: susceptibilidad; color azul claro: susceptibilidad intermedia; color azul oscuro: resistencia. Abreviaturas de los anticuerpos monoclonales (mAb): REG: Regdanvimab/CT-P59; AMU: Amubarvimab/BRII-196/P2C-1f11; ROM: Romlusevimab/BRII198/P2B-1G5 (109,118).

1.2.6.3 Inmunomoduladores

- **Corticoides**

Como ya se ha explicado anteriormente, la COVID-19 se caracteriza por producir una liberación de citoquinas en el organismo asociada a una elevación de los

marcadores proinflamatorios, que genera una inflamación a nivel pulmonar y, como consecuencia, una lesión. Al inicio de la pandemia, la eficacia de estos fármacos no estaba bien clara; sin embargo, fueron publicándose estudios que demostraron, por ejemplo, que el uso de la **dexametasona** en pacientes con ventilación mecánica invasiva o soporte de oxígeno reducía la mortalidad a los 28 días, aunque no demostró diferencias significativas en aquellos pacientes que no contaban con ningún soporte respiratorio con respecto al grupo control (86,119,120). En base a estos resultados, la dexametasona se considera, a día de hoy, el corticoide *gold-standar*, sola o en combinación con remdesivir, según la gravedad de la enfermedad en pacientes hospitalizados que requieren oxígeno suplementario o ventilación mecánica invasiva o no invasiva (86).

- **Interferón-β-1a (IFN-β-1a)**

Los interferones son citoquinas esenciales que desencadenan una respuesta inmunitaria ante una infección vírica. Sin embargo, el SARS-CoV-2 puede inhibir su liberación *in vitro*. En un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado se demostró que el uso de IFN-β-1a inhalado otorgó una mejoría clínica y una recuperación mayor que el uso de placebo (86,117).

No se dispone de datos sobre la eficacia del IFN-β-1a en las cinco VOC del SARS-CoV-2 Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron. Por ello y dada la insuficiente información sobre el uso de este agente y la potencial toxicidad, no se recomienda esta terapia para tratar la infección de COVID-19 (86).

- **Antagonistas de la interleukina (anti-IL-1)**

Anakinra es un antagonista del receptor de la interleukina-1 aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis reumatoide. Su uso para la COVID-19 grave fuera de ficha técnica se evaluó en un pequeño estudio de casos y controles fundamentado en la producción de citoquinas (incluida IL-1) por el SARS-CoV-2:

52 pacientes recibieron este tratamiento frente a 44 del grupo control. Se demostró que el uso de anakinra redujo la necesidad de ventilación mecánica invasiva y la mortalidad en pacientes con COVID-19 grave (86,121). Dada la poca información de la que se consta, no se recomienda actualmente el uso de este fármaco para el tratamiento de la COVID-19 (86).

- **Anticuerpos monoclonales contra el receptor de interleukina 6 (anti-IL-6)**

La interleukina-6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria clave en el estado hiperinflamatorio característico de la COVID-19. Impedir el efecto de esta citoquina con un inhibidor de su receptor podría ralentizar el proceso de inflamación en pacientes con COVID-19 grave (122,123). Los anti-IL-6 aprobados en la actualidad por la FDA son tocilizumab, sarilumab (ambos empleados en trastornos reumatológicos) y siltuximab (usado en el síndrome de Castleman) (86).

- **Tocilizumab**

Es un anticuerpo monoclonal anti-receptor-alfa de la IL-6 indicado para diversas enfermedades reumatológicas. Se han publicado datos contradictorios con respecto al uso de este agente. En un ensayo clínico con 21.550 pacientes, 4.116 estaban incluidos en un programa de ensayo RECOVERY en el que recibían oxígeno y presentaban indicios de inflamación sistémica. De esos, 2.022 pacientes fueron tratados con tocilizumab y 2.094 permanecieron con las medidas sanitarias habituales. De este último grupo, 729 (35%) fallecieron en 28 días. El ensayo demostró que la administración de tocilizumab se asociaba a una mayor probabilidad de alta hospitalaria en 28 días (57% frente a 50%), porque el fármaco reducía la necesidad de ventilación invasiva (124). En otro estudio realizado por Gordon et al., se demostró que este fármaco había reducido la tasa de mortalidad en el grupo control de casi el 36% al 28%

(125). En contraposición, en un ensayo aleatorizado controlado con 438 pacientes hospitalizados con neumonía grave por COVID-19, 294 fueron asignados aleatoriamente a recibir tocilizumab y 144, placebo. Se demostró que el uso de tocilizumab no produjo una mejora significativa en el estado clínico de los pacientes ni redujo la mortalidad a los 28 días en comparación con el placebo (86,126). En otro estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en el que se incluyeron pacientes con COVID-19 grave confirmada, participaron 243 pacientes que recibieron aleatoriamente uno u otro tratamiento y se observó que el uso de tocilizumab no fue eficaz para prevenir la intubación o la tasa de mortalidad (86,127).

- **Sarilumab y siltuximab**

Sarilumab y siltuximab son dos antagonistas de los receptores de IL-6 que tienen un potencial efecto sobre el estado hiperinflamatorio asociado a la COVID-19 similar al tocilizumab. Un ensayo multinacional de fase III, aleatorizado, doble ciego y con grupo control de 60 días de duración y con 431 pacientes no demostró mejoría significativa en el estado clínico del paciente ni en la tasa de mortalidad (86,128). Por otro lado, no se conocen ensayos clínicos publicados que respalden el uso de siltuximab en la COVID-19 grave (86).

- **Inhibidores de las Janus quinasas (JAK)**

- **Baricitinib**

Es un inhibidor selectivo oral de las Janus quinasas (JAK) 1 y 2 indicado actualmente para pacientes con artritis reumatoide. Para la COVID-19, se consideró inicialmente como potencial tratamiento por su efecto *in vitro* inhibidor de la endocitosis del SARS-CoV-2 y de la vía de señalización

intracelular de citocinas, impidiendo, así, el estado hiperinflamatorio de la enfermedad (129,130). Este doble efecto inhibitor hace de él un fármaco terapéutico apto para todas las fases de la COVID-19. Un estudio multicéntrico observacional y retrospectivo en el que 113 pacientes hospitalizados con neumonía por COVID-19 recibieron baricitinib combinado con lopinavir/ritonavir y 78, hidroxicloroquina y lopinavir/ritonavir, concluyó que se observaba una mejora significativa de los síntomas clínicos y de la tasa de mortalidad a las 2 semanas en el brazo de baricitinib en comparación con el brazo de control (86). En el ensayo ACTT-2, un ensayo doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, se evaluó el uso de baricitinib más remdesivir en pacientes adultos hospitalizados con COVID-19, observándose que el uso de la terapia combinada fue superior a la terapia con remdesivir solo tanto en la reducción del tiempo de recuperación como en la aceleración de la mejoría clínica en pacientes hospitalizados con COVID-19, sobre todo en aquellos que recibían suplemento de oxígeno de alto flujo o ventilación no invasiva (86,131). Además, esta combinación ha sido aprobada para uso en pacientes hospitalizados con COVID-19 según una EUA emitida por la FDA. La eficacia de baricitinib solo o con remdesivir no ha sido evaluado frente a las variantes de SARS-CoV-2 y hay datos limitados sobre el uso de baricitinib con dexametasona (86), por lo que no se aconseja su uso por el momento.

- **Ruxolitinib**

Es otro inhibidor selectivo oral de las JAK 1 y JAK 2 indicado en los trastornos mieloproliferativos, la policitemia vera y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) resistente a los esteroides. Al igual que baricitinib, se ha planteado su potencial uso en la COVID-19 por su efecto inhibitor sobre la vía de señalización intracelular de las citocinas (86). En un ensayo prospectivo, multicéntrico, aleatorizado y controlado de fase

II, el ruxolitinib no mostró diferencias estadísticas con respecto al tratamiento estándar; sin embargo, la mayoría de los pacientes demostraron una mejoría significativa de la tomografía computarizada (TC) torácica y una recuperación más rápida de la linfopenia (86,132).

- **Tofacitinib**

Es otro inhibidor selectivo oral de JAK 1 y JAK 3 indicado para la artritis reumatoide de moderada a grave, la artritis psoriásica y la colitis ulcerosa de moderada a grave. Gracias a su efecto inhibidor sobre la cascada inflamatoria, se planteó su uso para la mejoría de la lesión pulmonar en la COVID-19 grave (86). Un ensayo controlado y aleatorizado de 289 pacientes que recibieron tofacitinib o placebo mostró que el tofacitinib conllevaba un menor riesgo de insuficiencia respiratoria o muerte (133).

- **Alabrutinib, ibrutinib y rilzabrutinib**

Son inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), que regula la señalización y activación de los macrófagos. Se emplean actualmente en el tratamiento de algunas neoplasias hematológicas. Los resultados obtenidos de un pequeño estudio sin indicación médica en el que participaron 19 pacientes hospitalizados con COVID-19 grave que recibieron acalabrutinib destacaron el posible beneficio clínico de la inhibición de BTK (86,134).

1.2.6.4 Otras opciones

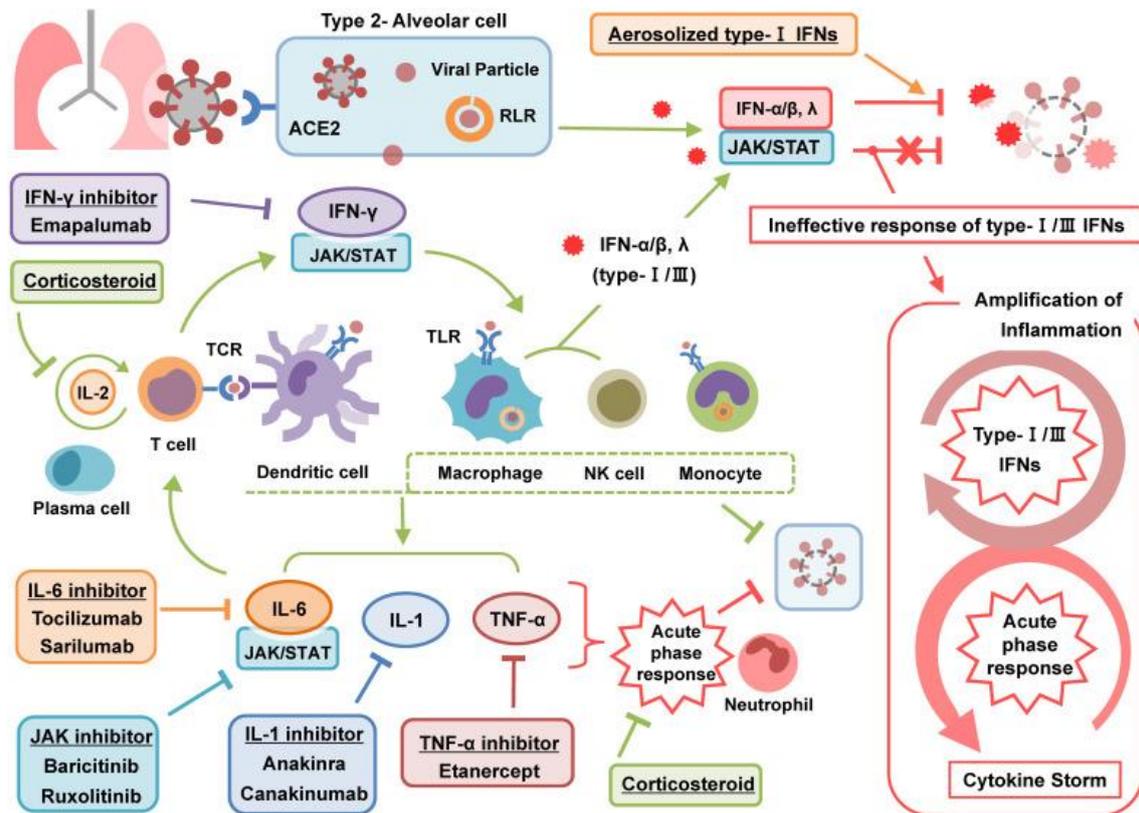
- **Zafirlukast y simeprevir**

Lazniewski et al. (135) realizaron estudios con zafirlukast, que se usa en la actualidad contra el asma por su acción antagonista de los receptores de

leucotrienos (136), y con simeprevir, un inhibidor de la proteasa utilizado en el tratamiento de la hepatitis C. Ambos fármacos disminuyen la unión del SARS-COV-2 al receptor ACE-2 y, por tanto, su entrada en la célula del huésped (97).

- **Plasma de pacientes convalecientes**

La terapia con plasma de pacientes convalecientes ha sido otra de las terapias evaluadas para el tratamiento de la COVID-19. Su uso se empezó a evaluar durante las epidemias de SARS, MERS y ébola, aunque no había ensayos que avalasen su eficacia real. La FDA, no obstante, aprobó una EUA para su empleo en pacientes con COVID-19 grave potencialmente mortal (137,138). Con posterioridad se ha comprobado que los datos de múltiples estudios han arrojado resultados contradictorios. Un estudio retrospectivo que incluyó datos de un registro nacional de EE. UU. concluyó que, entre los pacientes hospitalizados con COVID-19 sin ventilación mecánica, hubo un menor riesgo de muerte en los pacientes que recibieron una transfusión de plasma de pacientes convalecientes que contenía niveles de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) anti-SARS-CoV-2 más altos que los pacientes que recibieron una transfusión de plasma con niveles de anticuerpos más bajos. Sin embargo, los datos de tres ensayos controlados aleatorizados no mostraron diferencias significativas en la mejoría clínica o la mortalidad global en los pacientes tratados con plasma de convalecencia frente al tratamiento estándar (86,139–141).



Esquema 1. Fisiopatología y tratamiento de la tormenta de citoquinas en la COVID-19 (82).

1.2.7 Diagnóstico y seguimiento epidemiológico

La detección temprana y precisa del SARS-CoV-2 es fundamental, no solo para diagnosticar la COVID-19 en los pacientes hospitalizados o no hospitalizados, sino también para conocer la situación epidemiológica y poder tomar las medidas de Salud Pública necesarias que frenen su propagación. El *gold-standard* para la detección temprana del virus es la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa), pero su complejidad técnica le hace tener una aplicación limitada. Por ello, se han desarrollado otras técnicas que ayudan al diagnóstico de la COVID-19 dentro y fuera de los laboratorios de Microbiología que permiten obtener un resultado en el menor tiempo posible (142). La principal ventaja de la mayoría de estos métodos radica en poder dar un resultado en 24 horas o menos (97).

1.2.7.1 Muestras

Antes de plantearse cuál es la mejor técnica para un diagnóstico correcto hay que tener en cuenta si la muestra es la adecuada para el patógeno que se desea detectar. El SARS-CoV-2 es un virus respiratorio, por lo tanto, la mejor muestra para su determinación es la recogida en el tracto respiratorio superior (TRS) (muestra nasofaríngea) mediante un hisopo flocado e introducido en un medio de transporte universal (UTM) o de virus (VTM) (143). Aparte de este tipo de muestras, se han validado muestras de cornete medio nasal, de fosas nasales anteriores, orofaríngeas, aspirados o lavados de nasofaringe, muestras de la nariz o, incluso, de la garganta. En el caso de pacientes hospitalizados, las muestras que más se han recogido han sido lavados broncoalveolares (BAL) secreciones endotraqueales y, en casos puntuales, esputos (poco recomendables por su baja rentabilidad) (143).

También se planteó, en algún momento de la pandemia, el uso de saliva o gárgaras de la garganta como muestras no invasivas y aptas para la autorrecolección, pero los resultados de los estudios fueron contradictorios. Mientras que unos demostraron que el rendimiento de la saliva era comparable con las muestras nasofaríngeas (144–148), otros cuestionaron que pudiese usarse para la detección de SARS-CoV-2 igual que la muestra *gold-standard* (149). Esto podría deberse a la variabilidad en la recogida de la muestra o en las diferencias poblacionales (143). En el caso del estudio serológico, la muestra necesaria es suero o plasma (150).

Otras muestras cuyo rendimiento se han estudiado han sido, por ejemplo, las muestras de heces, que permiten detectar ARN viral, incluso en ausencia de síntomas gastrointestinales. En cuanto a las muestras post mortem, se han aceptado muestras de pulmón tomadas con hisopo y muestras de tejido. No se recomiendan estudiar muestras previamente parafinadas y fijadas con formalina por la técnica de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) como la PCR porque el ARN del virus se puede degradar por la formalina y podría inducir a resultados falsos negativos (143).

Así mismo, es importante el momento de la toma de la muestra, ya que si se hace demasiado pronto o demasiado tarde puede dar un resultado falso negativo. El

momento correcto para la recogida de la muestra debe ser 2-3 días después del inicio de los síntomas y hasta 5 días después. Si la muestra resulta negativa, pero la sospecha clínica es elevada, se recomienda repetir el estudio 48 horas después (143).

Hay que tener en cuenta que, aunque el virus no crezca en cultivos celulares, no significa que no sea viable y se pueda transmitir. Así mismo, la detección de material genético del virus en el laboratorio por métodos moleculares no implica que el virus sea viable (puede detectarse restos de material genético, pero que el paciente ya no sea un foco de infección) (143). Se ha observado que el tiempo medio de detección de ARN de virus en el tracto respiratorio superior en pacientes con COVID-19 puede variar de 8 a 20 días después del inicio de los síntomas y de 6 a 31 días en pacientes con COVID-19 moderada a grave. En cuanto a las muestras procedentes del tracto respiratorio inferior (TRI), la media de tiempo de detección fue de 8 a 38 días en casos leves y de 6 a 27 días en los casos de enfermedad moderada a grave. Un metaanálisis y una revisión sistemática concluyeron que la duración media de detección de material genético de SARS-CoV-2 era de 12,1 días (IC₉₅: 10,1 – 14,1) en el TRS y de 24,1 días (IC₉₅: 10 – 38,2) en el TRI desde el inicio de los síntomas y en casos leves. En los moderados a graves, esta estimación cambiaba a 15,8 (IC₉₅: 11,1 – 20,6) y a 23,2 (IC₉₅: 21,5 – 25) días respectivamente (143).

Otra revisión sistemática y un metaanálisis determinaron que el pico de detección (extrapolable a la carga viral) en los casos leves era máximo a los 4 días desde el inicio de los síntomas en las muestras de TRS (con $6,6 \times 10^8$ copias/ml) y 6 días en el de TRI (con $2,7 \times 10^8$ copias/ml), mientras que en los casos graves, el pico máximo de detección en el TRS se dio al día 8 (con $4,6 \times 10^9$ copias/ml) y en el TRI, al día 11 (con aproximadamente $3,5 \times 10^8$ copias/ml) (143). En cuanto a las diferencias en la carga vírica y la duración entre sintomáticos y asintomáticos, hay datos contradictorios. Algunas publicaciones han observado poca o ninguna diferencia en las cargas virales entre los dos grupos; sin embargo, otras han demostrado cargas virales significativamente mayores en los pacientes sintomáticos (143).

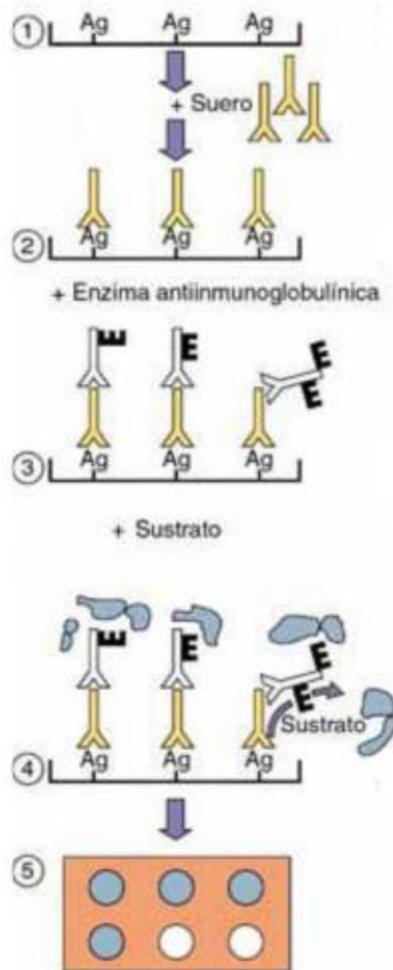
Hay que destacar que el tiempo medio de eliminación del virus en pacientes con COVID-19 leve es de 10-20 días, aunque se han reportado casos en los que la eliminación ha durado hasta 83 y 111 días después de inicio de los síntomas (151,152). Sin embargo, se

cuestiona si la persistencia de detección de ARN viral implica infectividad (143). Sería importante tener esto en cuenta a la hora de establecer cuarentenas y por cuánto tiempo (143).

1.2.7.2 Métodos serológicos

Los sistemas de detección en la actualidad incluyen, entre otros, métodos serológicos. Estos métodos son rápidos, poco invasivos (97), indirectos y su particularidad es que no diagnostican de forma directa la presencia del virus en el organismo, sino que detectan inmunoglobulinas o anticuerpos del sistema inmune (IgM, IgG, IgA) que se generan cuando el huésped entra en contacto con el virus (153).

El sistema más común se basa en la afinidad de enzimas a la unión con el antígeno específico del SARS-CoV-2 o placas conteniendo anticuerpos primarios y secundarios (97) que, al unirse al antígeno, conducen a un cambio de color que un espectrofotómetro lee y determina la concentración de anticuerpos en la muestra (ensayo inmunoabsorbente de enlace enzimático (ELISA)) (153).



Esquema 2. Ensayo ELISA. 1) Se fija un antígeno vírico a partir de células infectadas, viriones o ingeniería genética a la superficie de la placa. 2) Se añade la muestra (suero) y los anticuerpos presentes en ella se unen al antígeno presente en la placa. Se lava la placa para que los anticuerpos que no se hayan unido se eliminen. 3) Se añade un anticuerpo antihumano conjugado con una enzima. Se lava la placa para que los anticuerpos antihumanos no fijados se eliminen. 4) Se añade un sustrato que se une a la enzima. 5) El sustrato emite una luz, color o precipitado detectable a simple vista o con automatizadores (154).

Otro segundo método, igualmente usado, es el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), que utiliza sondas químicas que pueden emitir luz mediante una reacción química

llevada a cabo con el anticuerpo marcado contra el SARS-CoV-2. Este método es más sensible en comparación con el ELISA, pero más costoso (97).

Un tercer método, más rápido, pero menos sensible, es el ensayo de flujo lateral (*lateral flow assay* o LFA). Es un ensayo que se basa en la búsqueda de la presencia de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 a través del desplazamiento de la muestra por una membrana de nitrocelulosa que contiene antígenos específicos de SARS-CoV-2 (142). Algunos test no discriminan entre inmunoglobulina G o M, pero los que sí lo hacen podrían utilizarse como un indicador indirecto de una infección reciente o pasada (153). Estos test son fáciles de usar, no requieren preparación previa de la muestra ni de personal cualificado y aportan un resultado en 5-15 minutos (142). No obstante, no se recomiendan para el diagnóstico de la infección en curso, puesto que los anticuerpos IgM tardan en formarse alrededor de 5 a 14 días desde el inicio de los síntomas, tiempo en el cual se podría transmitir el virus (153,155,156).

Además, las vacunas que hay en la actualidad en el mercado generan anticuerpos anti-espícula (anti-S), pero estos también se producen tras la infección por el virus. Los anticuerpos anti-S son la diana de muchas pruebas serológicas. Sin embargo, la detección de anticuerpos por estas pruebas tiene el inconveniente de que no distinguen entre anticuerpos producidos por la vacuna o por la infección. Para ello, se recomienda detectar anticuerpos anti-nucleocápside (anti-N), específicos de la infección por SARS-CoV-2, y que no se generan por ningún otro factor externo como la vacuna. No está recomendado el diagnóstico de anticuerpos para la evaluación del estado inmunológico, ni siquiera para evaluar la eficacia de la vacuna (157).

Estos métodos no deben suponer, por sí solos, un método diagnóstico de la enfermedad. Además, un resultado positivo, sin discriminar IgM de IgG, no diferencia entre infección reciente o pasada y tampoco se pueden descartar reacciones cruzadas con otros coronavirus de la familia, y un resultado negativo no garantiza que el paciente no esté infectado en el momento de la prueba (153). Si ha estado en contacto con el virus, el diagnóstico debe realizarse por pruebas moleculares. No obstante, sí que pueden servir para crear una gran base de datos a nivel mundial, no solo para observar la inmunidad individual y de rebaño, sino también para detectar posibles donantes de plasma para

tratar la enfermedad en otros pacientes más graves o para el desarrollo de vacunas (153).

1.2.7.3 Métodos moleculares

Otra forma de detectar el SARS-CoV-2 es mediante métodos moleculares, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR). Se trata de un método de referencia que conlleva la transcripción del ARN de SARS-CoV-2 en ADN complementario (ADNc) seguida de una PCR en tiempo real para la amplificación de ese ADNc. Tiene la ventaja de que es más sensible, pero más caro que los métodos serológicos y tiene un límite de detección de unas 250 copias genómicas/ml. Las proteínas estructurales que incluyen la espícula y la nucleocápside se utilizan como biomarcadores en la detección (97). El diagnóstico de muestras agrupadas (*pooling*) ha demostrado una gran eficacia frente al diagnóstico de las muestras individualmente y unos valores excelentes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos. Además, aporta un aumento en la capacidad analítica del laboratorio de Microbiología al otorgarle la posibilidad de hacer análisis masivos sin perder precisión en el resultado (158). Se ha desarrollado otra tecnología que permite detectar la presencia o ausencia de varias mutaciones de una sola vez: son las PCR alelo-específicas. Con estas, se puede detectar a la vez si un paciente está infectado con una u otra variante, según el momento epidemiológico en el que se determine (159–161).

Existe otro método molecular basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle en tiempo real (RT-LAMP), similar a la RT-PCR en cuanto a la conversión de ARN, pero no precisa de termociclador, lo que hace que sea más eficiente en cuanto al tiempo y tiene la ventaja de que es capaz de detectar hasta 1,5 copias genómicas/ μ l (97).

Un tercer método molecular usado para la detección y diagnóstico de SARS-CoV-2 es la hibridación de ácidos nucleicos mediante microarrays (97). Consiste en una técnica similar a la RT-LAMP, pero, después de transcribir el ARN en ADNc, este se añade a un pocillo que contiene oligonucleótidos específicos del virus para, a continuación, realizar

una purificación del complejo mediante el lavado del virus hibridado y la medición de su señal. Esta, al igual que la secuenciación, es una técnica sensible, pero cara.

También se puede llevar a cabo la detección de SARS-CoV-2 en el punto de atención al paciente (*point-of-care*) mediante un flujo lateral basado en nanotecnología acoplada con anticuerpos (IgM e IgG) con algunas líneas como nanopartículas de oro y otras como oro agrupado debido al acoplamiento de bandas plasmónicas (97) por resonancia de plasmones superficiales (SPR), basado en la oscilación colectiva de electrones en una superficie de metal noble dada, y que se usa comúnmente para detectar las interacciones moleculares en tiempo real entre proteína-proteína, proteína-ADN/ARN, antígeno-anticuerpo y enzima-sustrato con alta sensibilidad (153,162).

La técnica más novedosa para la detección de este virus es la tecnología CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente intercaladas mediante el acoplamiento con fluorescencia. Mediante la técnica SHERLOCK (*specific high sensitivity enzyme reporter unlocking*), se puede detectar el virus en una hora y conlleva un menor coste de análisis a escala industrial en comparación con la RT-PCR y menor número de resultados falsos negativos. Sin embargo, tiene sus limitaciones, ya que se trata de una tecnología bastante nueva que todavía necesita mejoras (97).

1.2.7.4 Secuenciación

A raíz de la pandemia de SARS-CoV-2, la secuenciación ha ganado peso en cuanto a técnica diagnóstica (163). Tanto es así que la OMS ha facilitado unas directrices para unificar criterios: la secuenciación permite hacer un seguimiento de la aparición de nuevas variantes de SARS-CoV-2, entender cómo funciona el virus, mejorar el diagnóstico y las terapias aplicadas, investigar la transmisión y propagación entre personas y tener datos epidemiológicos de interés (164).

El estudio de secuencias genómicas acumuladas del virus permite, además, conocer el origen del virus (sin la secuenciación no se habría podido establecer el parentesco entre

el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV o la relación entre el SARS-CoV-2 humano y el virus presente en los murciélagos (RaTG13), lo que arrojó luz inicialmente sobre la posible fuente de contagio (165)), la relación filogenética entre infectados, la frecuencia de mutaciones importantes y el surgimiento de nuevas variantes de preocupación (163). La primera mutación que se detectó fue por secuenciación y fue la sustitución del aminoácido D614G en la proteína de la espícula, lo que le otorgó una ventaja en cuanto a la transmisión medible. Así, se pudo establecer el primer linaje B.1. Posteriormente, se consiguió detectar la mutación N439K en el RBM, que confería al virus una mayor afinidad por el receptor humano ACE-2, una mayor resistencia a la acción neutralizante de algunos anticuerpos monoclonales y una significativa reducción en la actividad de algunos sueros policlonales de personas previamente infectadas (166). Estos virus mutados presentaron una capacidad de replicación *in vitro* y de infección con resultados clínicos similares a la cepa salvaje. La mutación N439K fue la primera sustitución de aminoácidos en el RBM en relación con la cepa salvaje empleada en el desarrollo de vacunas, y supuso un presagio para la posterior evolución de la evasión inmune (165). El empleo de métodos computacionales y de aprendizaje automático en las secuencias genómicas servirá para generar predicciones fiables que supongan un sistema de alerta temprana para la vigilancia de nuevas variantes y será importante en el futuro desarrollo de vacunas (165).

La metagenómica y los métodos basados en enriquecimiento de dianas son las dos formas de secuenciación que se usan en la actualidad. La metagenómica permite extraer el genoma del virus de las muestras clínicas y secuenciar el ARN, lo que supone una ventaja sobre el segundo método, ya que puede usarse para diagnosticar cualquier patógeno, incluso sin conocerse su identidad o si es de nuevo surgimiento. Sin embargo, un impedimento puede ser el material genético de la célula huésped, que puede interferir con la determinación. En este caso, se debe eliminar o reducirse, y la forma de hacerlo dependerá del tipo de virus. Por otra parte, los métodos de enriquecimiento de dianas se basan en sondas de captura híbridas, donde las secuencias de estas sondas son complementarias a las secuencias genómicas del virus y estos enriquecimientos diana eliminan con gran eficacia las secuencias no diana, aumentando, así, la proporción

de secuencias diana. Una ventaja de esta técnica es que permite captar variantes que se separan de las habituales. No obstante, es una técnica cara y compleja (163).

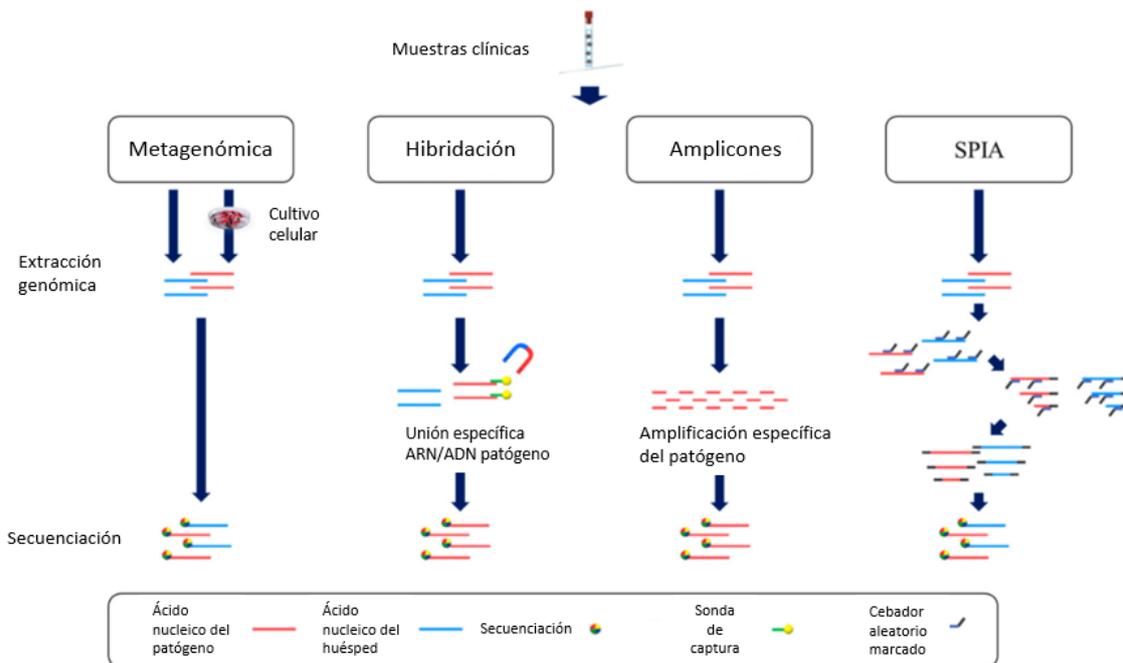
También existe la secuenciación metagenómica basada en amplicones. Se recurre a ella cuando se desean amplificar determinadas regiones de un gen mediante PCR que serán evaluadas posteriormente mediante secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequencing* o NGS) y los resultados, comparados con una base de datos previa (97). Es una técnica más barata, sensible y específica, pero solo se puede aplicar a patógenos previamente conocidos (163). Este método permite el diagnóstico de diferentes variantes de SARS-CoV-2 (97).

Existe una alternativa que permite amplificar material genómico independiente de la secuencia: la amplificación isotérmica con cebador único (SPIA) (163). La ventaja es que no requiere del conocimiento previo del patógeno, pero sí que necesita que se elimine antes del estudio el material genético no patógeno. Por ello, es importante contar con un alto inóculo del patógeno en la muestra (167). Este tipo de secuenciación, cuando se tiene un escaso inóculo, ha demostrado tener una muy baja cobertura en comparación con otros métodos (163,167).

Según la OMS, la secuenciación del genoma completo debe hacerse en muestras con valores del umbral de número de ciclos (*cycle threshold* o Ct) menores o iguales a 30, aunque la secuenciación parcial puede hacerse con muestras con un Ct de 30-35 (164). Para la secuenciación del genoma se pueden utilizar diferentes tecnologías. La secuenciación Sanger es la convencional, pero cada vez está siendo más desplazada por la secuenciación de genoma completo o NGS. Por el momento, las plataformas más utilizadas para esta nueva técnica de secuenciación son Illumina, Ion Torrent, PacBio y Oxford Nanopore Technology. La longitud de las secuencias que permite detectar Illumina es relativamente corta (*paired-end* 150 pares de bases (pb)), pero el rendimiento y la precisión de las lecturas individuales son excepcionales y los resultados se pueden obtener en 12 horas (142). Ion Torrent es otra tecnología de plataforma de secuenciación de lecturas cortas (400-600 pb), pero se diferencia de la primera en que el tiempo de funcionamiento del secuenciador es inferior. Por otra parte, PacBio y Oxford Nanopore Technology son las alternativas para las lecturas más largas, de decenas de kilo pares de bases (kpb) o más. Estas plataformas permiten cubrir la mayor

parte del genoma del virus, aunque, su rendimiento es relativamente inferior al de los secuenciadores de lectura corta y la precisión de las lecturas individuales también es peor. Las plataformas de secuenciación de Oxford Nanopore Technology maximizan los beneficios e inconvenientes del secuenciador de lectura larga. La longitud máxima de la lectura individual se registra hasta una escala de megabase (163,168). Sin embargo, debido a la relativa baja precisión de las lecturas individuales, la OMS no las recomiendan para la secuenciación del genoma completo del SARS-CoV-2 a menos que se replique la secuenciación (163,164). En un estudio realizado por Wang et al. se ha comprobado que la secuenciación de objetivos de nanoporos (NTS) para SARS-CoV-2 y otros patógenos simultáneamente de muestras respiratorias puede dar resultados en 10 horas (169).

La cobertura y la eficacia de la secuenciación del genoma vírico pueden variar en función del número de muestras por serie. La mayoría de bibliotecas de secuenciación multiplex de NGS permite analizar hasta 384 muestras por serie. Sin embargo, los secuenciadores de Illumina (HiSeq, NextSeq y NovaSeq) producen lecturas masivas para genomas pequeños de virus incluso con bibliotecas multiplex. La generación masiva de lecturas de secuencias y las bajas tasas de error compensan el tamaño de las lecturas individuales. La secuenciación del genoma completo está prácticamente solo disponible para la del secuenciador de Illumina o plataformas similares, ya que estas permiten ensamblar las secuencias individuales del virus para obtener el genoma completo con una alta calidad y excluyendo con éxito de las lecturas el material genético de la célula huésped, contaminaciones, otros patógenos, etc. Los secuenciadores como PacBio y Oxford Nanopore Technology permiten obtener lecturas individuales muy largas capaces de cubrir la mayor parte del genoma del virus, pero con un rendimiento de lectura de las secuencias totales bajo y una escasa precisión de las lecturas individuales. Por eso, no son tan apropiadas para la secuenciación del genoma completo (163).



Esquema 3. Diferentes técnicas para la secuenciación del genoma: metagenoma, hibridación, amplificación basada en amplicones y amplificación isotérmica con cebador único (SPIA). Adaptado de Hee Min Yoo, Il-Hwan Kim y Seil Kim, 2021 (163).

1.2.7.5 Otros métodos

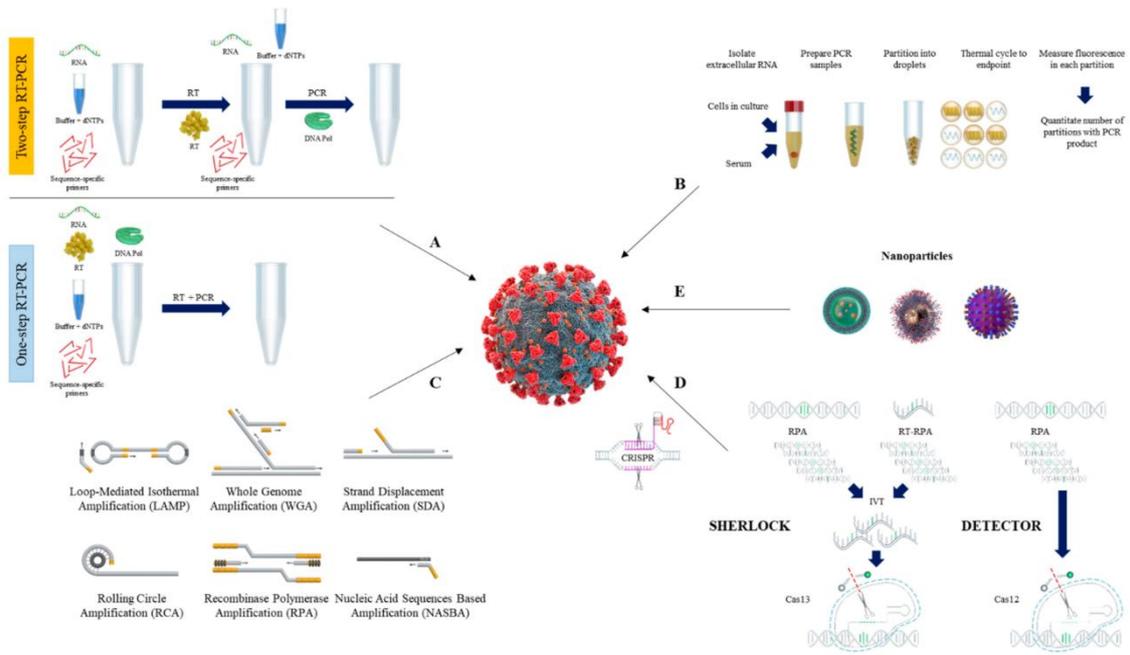
También existen pruebas basadas en la búsqueda de antígeno. A diferencia de los métodos moleculares, estas técnicas detectan componentes virales (proteínas S, M o N) sin necesidad de amplificación térmica. Y al igual que los métodos basados en PCR, estas pruebas solo determinan si existe infección activa o no, pero no el estado de recuperación del paciente. Debido a que los antígenos se encuentran en el virus y se pueden detectar en el momento de la infección, estas pruebas podrían ser más fiables que los test de diagnóstico serológicos. Se basan en pruebas de flujo lateral para una detección rápida y fácil (no requiere de formación específica para llevarla a cabo) o en un formato ELISA cuando se desea obtener una mayor sensibilidad y mayor rendimiento (se pueden trabajar hasta 96 muestras a la vez) (153) A pesar de que la detección por flujo lateral es menos sensible que los métodos moleculares, pueden detectar el antígeno del virus cuando el paciente tiene una carga viral alta (esto es en los días 1-3

previos al inicio de los síntomas o 5-7 días después), llegando a disminuir notablemente en la segunda semana después del inicio de los síntomas (143). Para estos tests solo están validadas como muestras frotis nasofaríngeos, muestras de cornetes medios nasales y frotis nasales. No están validados para frotis orales o saliva (170).

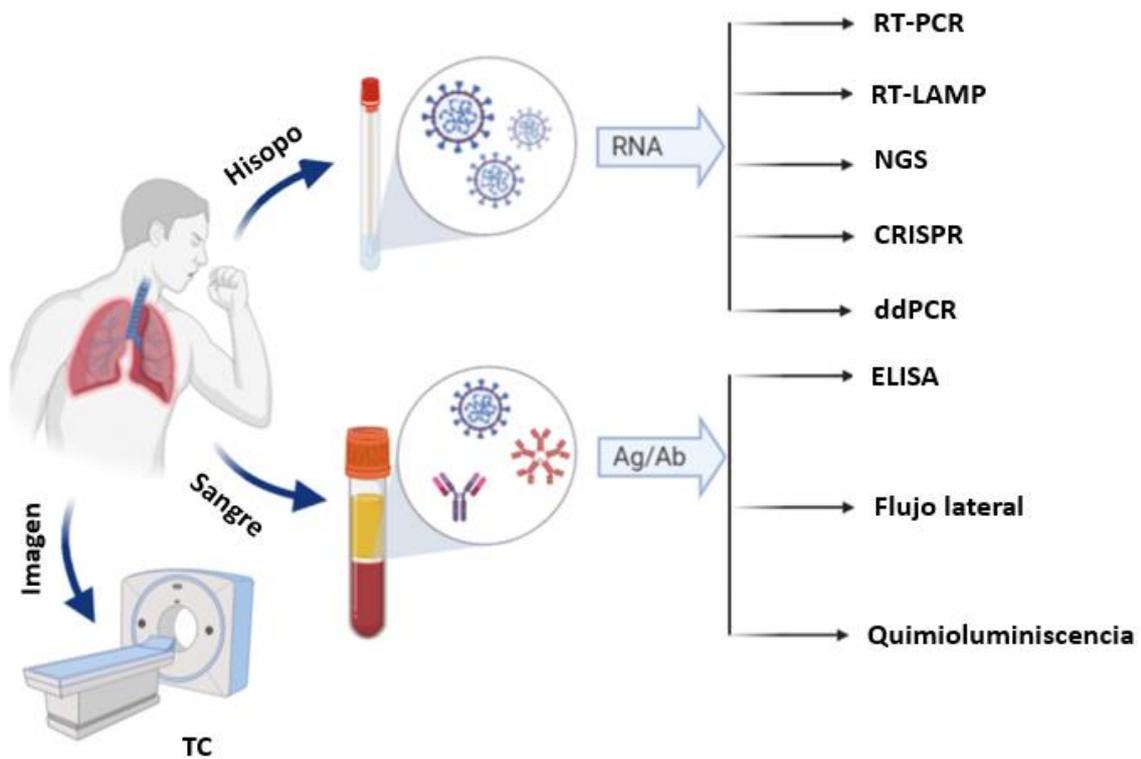
Otras opciones menos rápidas, pero igualmente utilizadas en algunos ámbitos han servido, por ejemplo, para monitorizar y analizar el progreso de la neumonía en determinados órganos (pulmones, hígado y corazón) utilizando rayos X con un modelo de inteligencia artificial con sistema de aprendizaje profundo capaz de discernir entre neumonía vírica y otros tipos de neumonía o ausencia de ella basándose en imágenes de rayos X por ordenador. Las tomografías computarizadas son los métodos más utilizados para el diagnóstico de afectación del tracto inferior o el seguimiento de casos de COVID-19. Las características típicas de una imagen de TC de tórax en esta enfermedad son opacidades en vidrio deslustrado (GGO) o reticulares con o sin consolidaciones que se presentan de manera bilateral, periférica o en distribuciones posteriores (143). Tao et al. (70) avalaron el uso de imágenes de tomografía computarizada (TC) de tórax para diagnosticar la COVID-19 por su alta fiabilidad y una sensibilidad del 98%.

Por otro lado, también existe la prueba de amplificación de ácidos nucleicos basada en cartuchos (CBNAAT). Estos cartuchos incluyen todo un sistema de amplificación completamente automatizado y que usan una PCR a tiempo real. GeneXpert es una de las tecnologías incluidas en este grupo. En su análisis, detecta el gen E y el gen N del SARS-CoV-2 (142) en unos 50 minutos. Otra es ePlex® (GenMark Diagnostics), que detecta el gen N. También se incluyen otras tecnologías desarrolladas por diferentes laboratorios como Simplexa® (DiaSorin) o Cobas® Liat (Roche), basadas en una PCR a tiempo real sin necesidad de extracción previa y que detectan los genes S y ORF1a/b en 70 minutos (Simplexa®) (171,172) y los genes ORF1a/b y N en 20 minutos (Cobas® Liat) (173) en el caso de que se encuentren en la muestra analizada. Por otro lado, también existen las tecnologías de FilmArray™ (BioMérieux) o QIAstat-Dx™ (Qiagen), que cuentan con sendos paneles sindrómicos y se basan en una PCR múltiple que arroja resultados en alrededor de 45-70 minutos (174,175).

Otra prueba basada en ácido nucleico, TrueNAT, se emplea para la confirmación de casos de COVID-19 con una tecnología basada en chips que detecta tanto el gen E como el de la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) en una hora (142).



Esquema 4. Descripción general de las pruebas de ácidos nucleicos para el SARS-CoV-2. Procedimiento esquemático de RT-PCR (A), PCR digital (B), amplificación isotérmica (C), sistema de detección CRISPR (D) y nanopartículas (E) (163).



Esquema 5. Representación esquemática de algunos métodos analíticos disponibles para la detección de SARS-CoV-2. Adaptado de Rai P., 2021 (142).

1.2.8 Variantes

Como ya se ha visto, el SARS-CoV-2 tiende a evolucionar genéticamente dando múltiples variantes con diferentes características en comparación con su cepa inicial o salvaje. La secuenciación genómica ha sido de gran importancia en el entorno pandémico mundial porque ha servido de ayuda para detectar cualquier nueva variante genética del SARS-CoV-2 que fuera surgiendo. Al principio, la evolución genética fue escasa, con la aparición de la variante D614G, dominante en todo el mundo, asociada a una mayor transmisibilidad, pero sin capacidad de causar enfermedad grave (176). Posteriormente se han descrito múltiples variantes del SARS-CoV-2, de las cuales algunas se han considerado variantes de preocupación (VOC) debido a su potencial para causar una mayor transmisibilidad o virulencia, una reducción de la neutralización por anticuerpos obtenidos mediante infección natural o vacunación, la capacidad de evadir la detección

inmunológica o una disminución de la eficacia terapéutica o vacunal (86). El Departamento de Salud y Servicios Humanos (HHS) de los EE. UU. estableció un Grupo Interagencial para el SARS-CoV-2 (SIG) para mejorar la coordinación entre los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), los Institutos Nacionales de la Salud (NIH), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Autoridad de Investigación Biomédica Avanzada y de Desarrollo (BARDA) y el Departamento de Defensa (DoD). Este grupo interagencial caracteriza las variantes emergentes y monitorea su posible impacto en las vacunas, los tratamientos y el diagnóstico. Así, se clasifican 4 categorías: variante de interés (VOI), variante de preocupación (VOC), variante de gran consecuencia (VOHC) y variantes bajo monitoreo (VBM) (177).

Variante de interés (VOI) (177):

Esta denominación incluye aquellas variantes que tienen:

- cambios en el RBD.
- una menor neutralización por los anticuerpos generados contra una infección anterior o la vacunación.
- menor eficacia teórica de los tratamientos o pruebas de detección.
- aumento previsto en la transmisibilidad o gravedad de la enfermedad.

Las posibles propiedades para que una variante sea considerada variante de interés incluyen:

- marcadores genéticos específicos que se prevé que afectarán a la transmisión, el diagnóstico, los tratamientos o el escape inmunitario.
- evidencia de que esta sea la causa de un aumento en la proporción de casos o de brotes particulares.
- prevalencia o expansión limitadas.

Una variante de interés puede tener prevalencia limitada, aunque puede requerir alguna medida de salud pública, por lo que los CDC pueden aumentar su vigilancia para evaluar su riesgo.

Variantes de preocupación (VOC) (177):

Incluyen aquellas variantes cuyas características son:

- mayor transmisibilidad.
- casos más graves de enfermedad (por ejemplo, mayor cantidad de hospitalizaciones o muertes).
- reducción significativa en la neutralización por los anticuerpos generados durante una infección anterior o la vacunación.
- menor eficacia real de los tratamientos o las vacunas, o fallas de detección de diagnóstico.

Las variantes de preocupación podrían requerir una o más medidas de salud pública adecuadas, entre ellas:

- notificar a la OMS conforme al Reglamento Sanitario Internacional.
- notificar a los CDC y a las iniciativas locales o regionales.
- aumentar las medidas preventivas, como el uso de mascarillas, la realización de pruebas de detección o el distanciamiento físico.
- realizar investigaciones para determinar la eficacia real de las vacunas y tratamientos contra la variante.

Estas variantes han sido, a lo largo de la pandemia, las siguientes (86):

Alfa (linaje B.1.1.7)

Esta variante se detectó a finales de diciembre de 2020 en el Reino Unido, aunque ya circulaba en septiembre de ese mismo año. Al principio, se la

denominó como variante GRY (GR/501Y.V1) y posteriormente como B.1.1.7 después de analizar la secuenciación del genoma completo de muestras de pacientes que dieron positivo en las pruebas del SARS-CoV-2 en ese momento. El nombre de Alfa lo recibió por ser la primera variante dominante en el mundo, responsable de la primera ola (86).

Como característica se vio que carecía del gen S (*S-gene target failure*, SGTF) y que incluía 17 mutaciones en el genoma viral, de las cuales ocho (delección 69-70, delección 144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) se encuentran en la proteína espícula. En concreto, se ha comprobado que la mutación N501Y otorga un aumento de la afinidad de la proteína S por los receptores ACE-2, mejorando la adhesión viral y la entrada en las células del huésped (86,178).

Los informes preliminares establecieron que la variante Alfa era entre un 43% y un 82% más transmisible que la cepa anterior, superando a las variantes preexistentes de SARS-CoV-2 para emerger como la variante dominante en el Reino Unido en ese momento. Un estudio inicial de casos y controles apareado concluyó que no había diferencias significativas en el riesgo de hospitalización o mortalidad asociada con esta variante en comparación con otras existentes anteriormente. Sin embargo, estudios posteriores han concluido que las personas infectadas con la variante B.1.1.7 presentaban una mayor gravedad de la enfermedad en comparación con las personas infectadas con otras formas circulantes del virus (86).

Un gran estudio de cohortes apareado realizado en el Reino Unido concluyó que la razón de riesgo (RR) de mortalidad de los pacientes infectados con la variante B.1.1.7 era de 1,64 (IC₉₅: 1,32 - 2,04; $p < 0,0001$) respecto a pacientes contagiados con cepas circulantes previas. Otro estudio informó de que la variante B.1.1.7 se asociaba con un aumento de la mortalidad en comparación con otras variantes del SARS-CoV-2 (cociente de riesgos instantáneos (CRI) = 1,61; IC₉₅: 1,42-1,82). En general, se concluyó que el riesgo de mortalidad entre los pacientes con

B.1.1.7 era mayor (CRI = 1,67; IC₉₅: 1,34-2,09) en comparación con los individuos con SARS-CoV-2 no B.1.1.7 (86).

Beta (linaje B.1.351)

Esta variante llamada Beta o GH501Y.V2 pertenece al linaje B.1.351 y contiene, al igual que la Alfa, múltiples mutaciones en la espícula. Se detectó por primera vez en Sudáfrica en octubre de 2020 y fue la variante predominante durante la segunda oleada de infecciones por SARS-CoV-2 en la pandemia (86).

Incluye nueve mutaciones (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G y A701V) en la proteína de espícula, de las cuales tres (K417N, E484K y N501Y) se localizan en el RBD y aumentan la afinidad de unión a los receptores ACE-2 (86).

Según diversos estudios, esta variante tiene un mayor riesgo de transmisión y una neutralización reducida por terapia de anticuerpos monoclonales, sueros de convalecientes y sueros posvacunación (86).

Gamma (linaje P.1)

Esta variante, que se detectó por primera vez en Brasil en diciembre de 2020, supone la tercera variante de preocupación y se le puso el nombre de Gamma o GR/501Y.V3 (linaje P.1) (86).

Contiene diez mutaciones en la proteína de la espícula (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K y N501Y), tres de ellas (L18F, K417N, E484K) en el RBD, de forma parecida a la variante B.1.351, lo que le confiere la misma característica de aumento de la afinidad de unión a los receptores ACE-2, así como una reducción de la neutralización (86).

Delta (linaje B.1.617.2)

La cuarta variante de preocupación, conocida como Delta, se identificó inicialmente en India en diciembre de 2020 y fue responsable de la segunda oleada mortal de infecciones por SARS-CoV-2 en abril de 2021 en ese país. En Estados Unidos, esta variante no se detectó hasta marzo de 2021 (86).

Inicialmente se la consideró una variante de interés, pero cambió su denominación a variante de preocupación en mayo de 2021 después de que se propagase rápidamente por todo el mundo (86).

Contiene diez mutaciones con respecto a la cepa salvaje (T19R, G142D, delección 156, delección 157, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) en la proteína de la espícula (86).

Ómicron (B.1.1.529)

La última variante de preocupación, también conocida como variante Ómicron, se detectó por primera vez en Sudáfrica el 23 de noviembre de 2021 tras un repunte en el número de casos de COVID-19 (86).

Desde el inicio se consideró una VOC debido a sus más de 30 cambios en la proteína de la espícula y por el gran aumento en el número de casos observados en Sudáfrica. Las mutaciones incluyen T91 en la envoltura, P13L, delección E31, delección R32, delección S33, R203K, G204R en la proteína de la nucleocápside, D3G, Q19E, A63T en la matriz, N211del/L212I, delección Y145, delección Y144, delección Y143, G142D, T95I, delección V70, delección H69, A67V en el dominio N-terminal de la espícula, Y505H, N501Y, Q498R, G496S, Q493R, E484A, T478K, S477N, G446S, N440K, K417N, S375F, S373P, S371L, G339D en el dominio de unión al receptor de la espícula, D796Y en el péptido de fusión de la espícula, L981F, N969K, Q954H en la repetición heptada 1 de la espícula, así como otras

múltiples mutaciones en las proteínas no estructurales y en la proteína de la espícula (86).

Los estudios iniciales sugieren que esta variante tiene una infectividad 13 veces mayor y es 2,8 veces más infecciosa que la variante Delta (86). Otro estudio chino sugiere que la infectividad es de 70 veces mayor que la variante Delta y la cepa salvaje, con una tasa de neutralización 20 veces menor. Sin embargo, estudios en EE. UU. observaron que los pacientes infectados por Ómicron y que requerían hospitalización fueron mucho más leves en comparación con Delta. La baja prevalencia de la enfermedad grave por esta variante podría explicarse por las altas tasas de vacunación a nivel mundial (179).

Se ha planteado que la mutación K417N de la espícula (también incluida en la variante Beta) junto con la E484A pueden hacer que la variante Ómicron escape al efecto de las vacunas. A pesar de que se ha visto que conlleva una mayor transmisión entre personas, reviste menor gravedad en los casos (180). En el anexo 1 se encuentran las principales subvariantes de ómicron y sus mutaciones.

En la actualidad, es la variante circulante que predomina en todo el mundo. Se han detectado 5 subvariantes: BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 (86). Inicialmente, BA.1 fue el linaje mayoritario. Posteriormente, BA.2 fue aumentando su presencia hasta pasar a ser el linaje principal a nivel mundial desde marzo hasta junio de 2022. Más tarde, los linajes BA.2.12.1, BA.4 y BA.5, mostraron una mayor transmisión que BA.2 y fueron desplazándola progresivamente. Finalmente, BA.5 se confirmó como el linaje dominante desde el mes de julio de 2022 (en España fue a mediados de junio de 2022). A partir de entonces comenzaron a surgir variantes recombinantes con mutaciones que podrían explicar un mayor escape a la respuesta inmune frente a variantes previamente circulantes. El Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) consideró a varios de esos linajes como variantes de interés: BQ.1* (el asterisco indica que se incluyen los linajes derivados de este), BA.2.75* (incluyendo CH* y BN*), XBB* y XBB.1.5*. El linaje XBB.1.5 se convirtió en el dominante a nivel

global en febrero de 2023 (en marzo en España). Este linaje tiene una mutación en la posición 486 (F486P) que le otorga la capacidad de evasión de la respuesta a los anticuerpos que ya se había visto presente en XBB o XBB.1, y afecta a la unión al receptor ACE-2 (lo que podría implicar una mayor capacidad de transmisión respecto a XBB y XBB.1). El 17 de abril de 2023, la OMS incluyó al linaje XBB.1.16 entre las variantes de interés (VOI) por su gran presencia en varios países. Este linaje añade las mutaciones E180V y K478R a las de XBB, presenta una capacidad de evasión a la respuesta inmune comparable a la de XBB.1.5 y no se ha relacionado con un aumento en la gravedad de los casos (180). En el informe del 22 de mayo de 2023 del Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad de España sobre la actualización de la situación epidemiológica de las variantes de SARS-CoV-2 en este país, XBB.1.5 y sus linajes recombinantes derivados suponían el 58,2% de todas las muestras secuenciadas de manera aleatoria en la semana 18 de 2023, mientras que los linajes derivados de XBB.1.9* suponían el 27,3% y el resto de los derivados de XBB, el 7,3% (180).

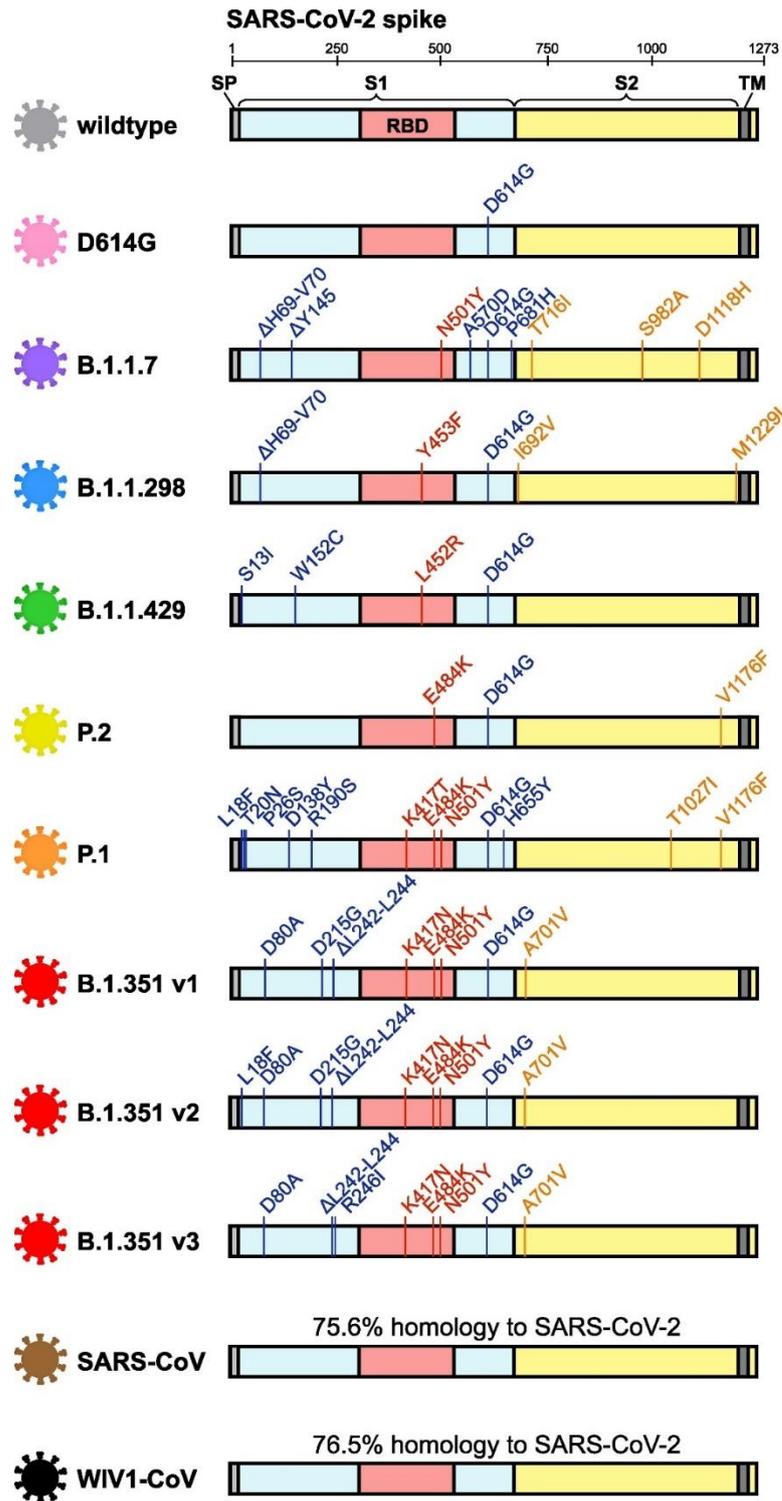


Imagen 1. Mutaciones en la secuencia de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2: cepa salvaje (*wildtype*) (gris), variante D614G (rosa), variante Alfa o B.1.1.7 (morado), variante B.1.1.298 (azul), variante B.1.1.429 (verde), variante P.2 (amarillo), variante Gamma o P.1 (naranja), tres variantes de Beta o B.1.351 (rojo; v1, v2 y v3), SARS-CoV-1 (marrón) y WIV1-CoV (negro) (181).

Variantes de gran consecuencia (VOHC):

Además de las posibles propiedades de una variante de preocupación, las variantes designadas como VOHC incluyen el impacto en las medidas médicas paliativas como (177):

- fallo demostrado en los objetivos de pruebas de diagnóstico.
- reducción significativa en la eficacia de las vacunas, gran cantidad de infectados en pacientes vacunados, o muy baja protección inducida por las vacunas contra enfermedades graves.
- reducción significativa en la susceptibilidad a múltiples tratamientos aprobados.
- casos más graves de enfermedad clínica y aumento de las hospitalizaciones.

Una variante de gran consecuencia debería ser notificada a la OMS según el Reglamento Sanitario Internacional, a los CDC, debería conllevar el anuncio de estrategias para prevenir o contener la transmisión, y recomendaciones para actualizar los tratamientos y las vacunas (177).

Variantes bajo monitoreo (VBM):

Las variantes designadas como VBM incluyen (177):

- linajes cuyos datos indican que existe un impacto potencial o claro en las contramedidas médicas disponibles.
- linajes que causan una enfermedad más grave o una mayor transmisión, pero que ya no se detectan.
- linajes previamente designados como VOI, VOC o VOHC que actualmente circulan a niveles muy bajos en el mundo.

Estas variantes no representan un riesgo significativo e inminente para la salud pública (177).

Variantes recombinantes

El proceso de recombinación se da cuando dos linajes distintos infectan la misma célula a la vez. Es un fenómeno poco frecuente, pero que puede afectar a las características del virus, como su capacidad para propagarse, para causar enfermedades graves o para hacer que los tratamientos o las vacunas sean menos eficaces. En muchos casos, los virus recombinantes no tienen ventajas competitivas que los ayuden a desarrollarse, pero en otras ocasiones les hacen más fuertes. Como cualquier otra variante, estas deben ser evaluadas y monitorizadas por los servicios correspondientes y estos deben tomar las medidas oportunas según su clasificación (177). En la actualidad, las variantes recombinantes conocidas del SARS-CoV-2 corresponden a la variante Ómicron y se las denomina como “XBB” (182).

La nomenclatura para las variantes de SARS-CoV-2 se ha realizado usando dos sistemas (177):

Sistema del linaje Pango:

Es un sistema que otorga una jerarquía en cuanto a la nomenclatura, y se clasifican según su evolución descendiente de un linaje original. Se nombran alfabéticamente por prefijos como “B” o “BA” seguidos de sufijos numéricos “.1”. Cuando se define un nuevo linaje, el sistema Pango asigna un número adicional al nombre de su linaje de origen (p. ej., BA.2.75 es un sublinaje de BA.2). A los linajes con nombres más largos se les puede asignar alias alfabéticos y la numeración continúa (por ejemplo, “BA” significa “B.1.1.529”, por lo tanto “BA.2” es lo mismo que “B.1.1.529.2”).

Sistema Nextclade:

Es una herramienta que categoriza las variantes nuevas de SARS-CoV-2 en función de su relación genética. A las ramas potencialmente importantes del árbol genealógico del SARS-CoV-2 se les asignan nombres, lo que indica que los miembros de esa rama son un "clado" y se cree que comparten un ancestro común. Esta herramienta asigna cada clado después de que la variante haya circulado un tiempo determinado, haya mostrado un crecimiento constante en una región o haya recibido una clasificación por parte de la OMS. Los nombres asignados se componen de dos dígitos del año de asignación seguido de una letra que indica el orden de asignación dentro del año. Por ejemplo, "22A" es el primer clado designado en el 2022 y corresponde al grupo de linajes Pango que descienden del BA.4, el cual estaba en circulación a principios del 2022 (imagen 2).

Con todo ello, se obtiene la siguiente clasificación actual:

Nomenclatura de la OMS	Linaje Pango	Linaje Nextclade	Estado actual	Fecha de designación
Alfa	B.1.1.7 Q	20I	VBM	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021
Beta	B.1.35 y descendientes	20H	VBM	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021
Gamma	P.1 y descendientes	20J	VBM	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021

Delta	B.1.617.2 y descendientes	21A, 21I, 21J	VBM	VOC: 15 de junio del 2021 VBM: 14 de abril del 2022
Épsilon	B.1.427 B.1.429	21C	VBM	VOC: 19 de marzo del 2021 VOI: 26 de febrero del 2021 VOI: 29 de junio del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Eta	B.1.52	21D	VBM	VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Iota	B.1.526	21F	VBM	VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Kappa	B.1.617.1	21B	VBM	VOI: 7 de mayo del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
No se aplica	B.1.617.3		VBM	VOI: 7 de mayo del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Ómicron (linajes originales)*	B.1.1.529 y descendientes	21K, 21L, 22A, 22B	VOC	VOC: 26 de noviembre del 2021
Zeta	P.2		VBM	VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021

Mu	B.1.621 B.1.621.1	21H	VBM	VBM: 21 de septiembre del 2021
Theta (86)	P.3	21E		
Lambda (86)	C.37	21G		
Ómicron (linajes posteriores)	BA.2.86 XBB.1.9.1 XBB.1.9.2 XBB.2.3 XBB.1.16 XBB.1.5 CH.1.1 BA.2.74	22F, 23A, 23C, 23I, etc.	VBM	VBM: 1 de septiembre de 2023
No se aplica	Variantes que contienen mutaciones de la proteína S F456L**		VOI	VOI: 1 de septiembre de 2023

Tabla 8. Clasificación de las variantes de SARS-CoV-2 y sus nomenclaturas (última actualización: 1 de septiembre de 2023). VOC: variante de preocupación; VBM: variante de bajo monitoreo; VOI: variante de interés. *Los linajes originales de ómicron incluyen el BA.1 o similares. **Muchos linajes han adquirido la mutación F456L y algunos ejemplos son EG.5, FL.1.5.1 y XBB.1.16.6. Adaptado de Cascella et al., 2023 y *Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2*, CDC, 2023 (86,177).

Con esta clasificación, se obtienen los linajes de cada clado:



Imagen 2. Árbol filogenético de clasificación de variantes de SARS-CoV-2 mediante clados (183). Ver anexo 2.

Las variantes circulantes han ido cambiando a lo largo de la pandemia en todo el mundo. En el siguiente árbol filogenético se puede ver la distinta distribución y surgimiento de las variantes principales.

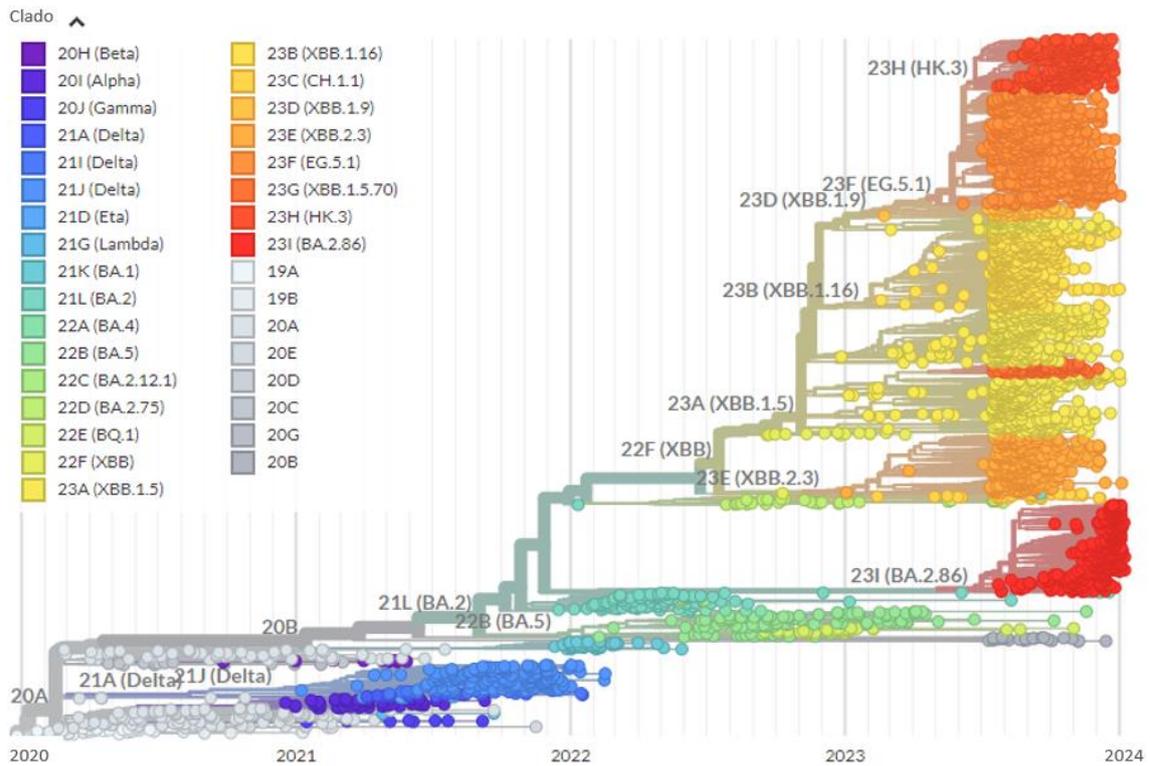
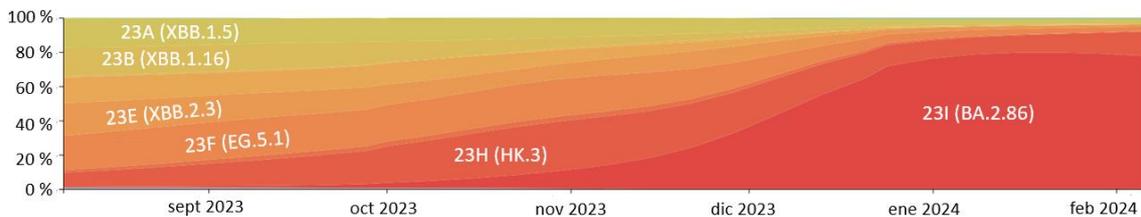


Imagen 3. Distribución de variantes en el mundo desde diciembre de 2019 hasta enero de 2024 (184).

Como ya se ha comentado, actualmente y con los datos actualizados a día 6 de febrero de 2024, la variante circulante es la Ómicron y sus sublinajes (184)



En España, la distribución ha ido en consonancia con el resto de Europa.

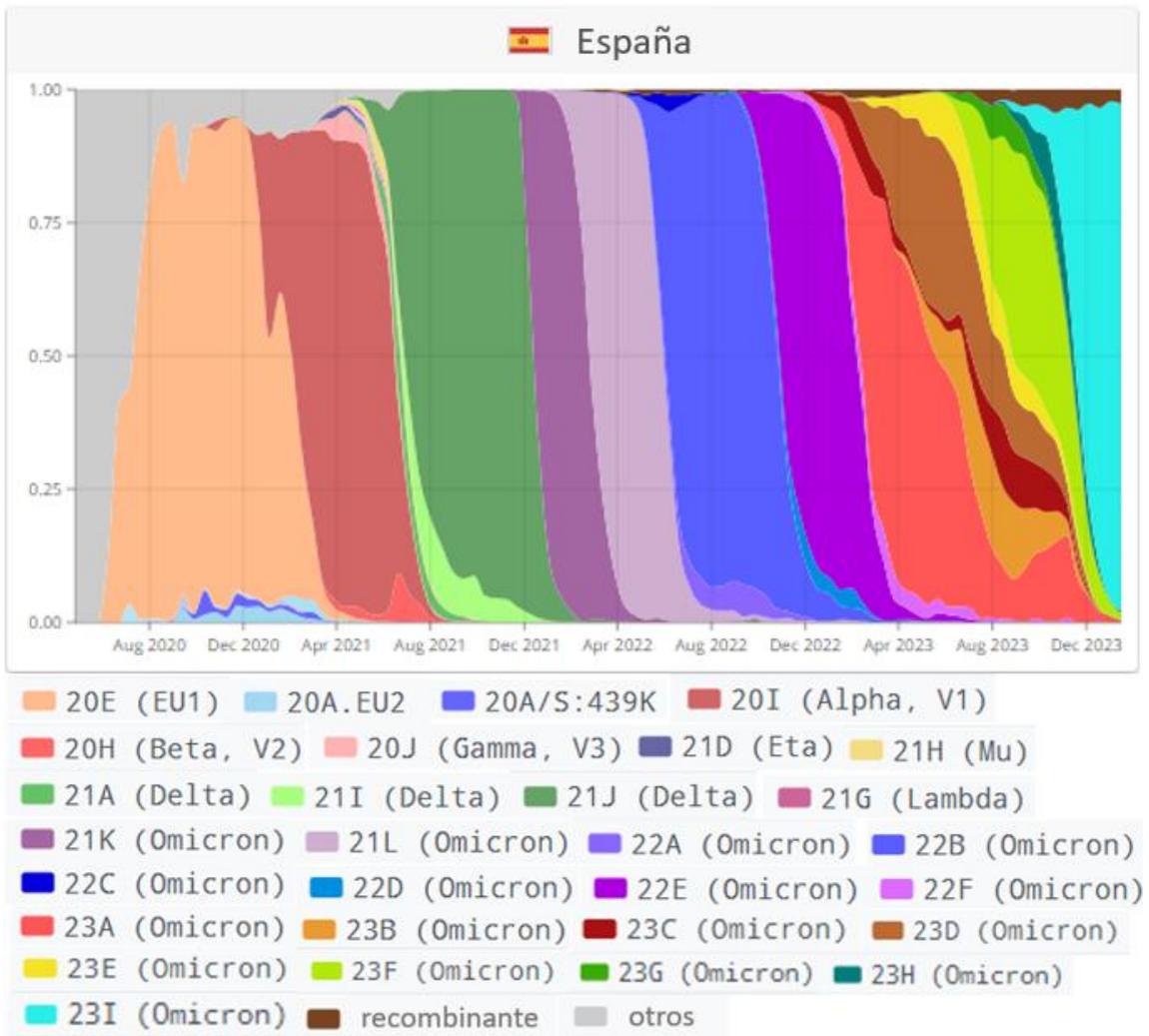


Imagen 4. Distribución de variantes circulantes de SARS-CoV-2 en España desde 27 de abril de 2020 hasta el 29 de enero de 2024. En el eje de las X se encuentra el tiempo transcurrido y en el eje de las Y, la proporción del número total de secuencias analizadas (no los casos). Adaptado de CoVariants, 2023 (185).

Y, actualmente, al igual que en la gran mayoría del resto del mundo, la variante circulante principal es la Ómicron y sus sublinajes.

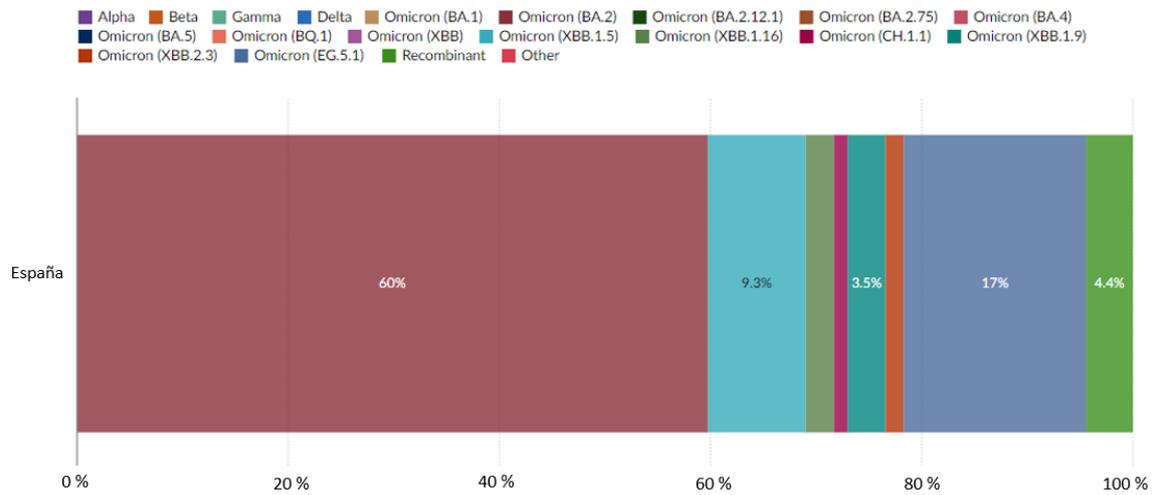


Imagen 5. Distribución de variante Ómicron en España. Datos actualizados a fecha 4 de diciembre de 2023 (186).

1.3. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune se pone en marcha tras un primer contacto con el virus, ya sea por una infección natural o por la vacunación. No obstante, hay personas que no consiguen desarrollar anticuerpos que puedan combatir el virus de manera efectiva (187,188).

1.3.1 Respuesta innata

El primer contacto del SARS-CoV-2 con el organismo al que infecta ocurre en el tracto respiratorio superior, en las fosas nasales a través del epitelio, en las amígdalas y glándulas adenoides y en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT). Aquí, empieza a inducir una respuesta inmune en la mucosa (189). La primera en activarse es la respuesta innata y lo hace a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen, a su vez, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o a lesiones (DAMP) (189). Los primeros se asocian con el reconocimiento de patógenos microbianos, mientras que los segundos, con el de componentes de la célula huésped liberados durante el daño o muerte celular (190). Se activan, entonces, los receptores de la membrana innata tipo Toll (TLR), en el endosoma (TLR7, TLR8 y TLR9) y en el citosol (receptores similares a RIG-1 (gen I inducible por ácido retinoico) (RLR)), provocando una respuesta de interferón tipo I (IFN-I). Esta molécula actúa como unión entre la respuesta innata y la activación de la respuesta adaptativa (189,190).

Existe un tipo especial de receptores, los de tipo Scavenger (SR), que son capaces de interaccionar con el virus, pero de manera no específica. Se localizan, principalmente, en macrófagos estromales y células dendríticas. Además, pueden actuar como cofactores de los PRR, incluidos los TLR, en el reconocimiento y la neutralización del virus por parte de las células de la inmunidad innata, aunque como desventaja, en ciertos casos ellos mismos pueden ser la puerta de entrada de los virus (incluido SARS-CoV-2) y provocar infección (190).

Diversos estudios han comprobado que la proteína S se une de manera eficaz a los PRR, especialmente al TLR-4. Esta interacción activa la señalización de TLR-4 para aumentar la expresión del receptor ACE-2 en la superficie de la célula, lo que favorece la entrada del virus en los alveolos tipo II (también llamados neumocitos tipo II). Se cree que la miocarditis producida en la COVID-19 puede deberse a la activación de estos receptores TLR-4 y la consecuente hiperactivación de la respuesta inmune innata. Estudios de acoplamiento molecular han demostrado que la proteína S también se puede unir a TLR-1 y TLR-6, aunque con menor energía de unión (190).

Las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas (CD) tienen un papel relevante en la replicación del virus en el pulmón. Las CD actúan como centinelas en el tracto respiratorio y actúan de enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa en el pulmón (191).

Una vez que la respuesta innata ha ejercido su función con éxito limitando la entrada, replicación, traducción y ensamblaje virales, se pone en marcha la maquinaria necesaria para la respuesta adaptativa (189).

1.3.2 Respuesta adaptativa

Tras la respuesta innata, se activa la adaptativa. El virus se presenta al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC-I y MHC-II) y a las células *natural killer* (NK). Por su parte, el MHC-II, que se encuentran en la superficie de células presentadoras de antígeno como monocitos, células dendríticas, macrófagos y células B y que puede ser activado por interferón gamma (IFN- γ) y modulado por interferón alfa/beta (IFN- α/β), interleukina 4 (IL-4), interleukina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y glucocorticoides, activan estas mismas células B y fomentan su proliferación y su especialización, al igual que hacen con las células T CD4⁺ (189). A la misma vez, el MHC-I, localizado en todas las células que cuentan con núcleo, se pone en marcha para reconocer antígenos específicos que activen la producción de células T CD8 (189).

Las células NK suponen un 5-20% de los linfocitos y un 15% de las células mononucleares que se encuentran en la sangre periférica en los humanos. Estas células NK tienen la particularidad de que pueden identificar directamente las células del organismo que ya han sido infectadas sin necesidad del MHC-I (189). Esta particularidad hace que puedan combatir, incluso, los patógenos intracelulares que son capaces de evadir la acción de los CD8⁺ al interferir con el MHC-I (189).

Después de diversos estudios, se ha comprobado que la actuación conjunta de la inmunidad humoral (producción de anticuerpos) y la celular (producción de linfocitos T) se correlaciona con la forma más leve de la COVID-19; mientras, la población mayor, donde es habitual una respuesta descoordinada de estas dos inmunidades, desarrolla con mayor frecuencia una forma más grave de la enfermedad. También se observó que, en pacientes con asma, un desequilibrio entre células T *helper* 1 (Th1) y 2 (Th2) durante el ingreso hospitalario estaba asociado con una mayor mortalidad por COVID-19 (189). Por su parte, una respuesta humoral tardía y altos niveles de inmunoglobulinas A, M y G demuestran un desequilibrio en la respuesta humoral que se asocia, al igual que pasaba con las células Th1 y Th2, a unos malos resultados clínicos. En los pacientes que han fallecido por COVID-19 se ha visto una drástica disminución de células B totales, células B vírgenes, células B de memoria, IgA e IgG anti-S y anti-N en comparación con los pacientes recuperados de la enfermedad (189). Además, se ha observado que la persistencia de anticuerpos neutralizantes está relacionada con una enfermedad más grave (189).

En estudios realizados con el SARS-CoV, se ha constatado la presencia de células B de memoria, aunque de corta duración (unos 6 años de media después de la infección), y de inmunidad celular (CD8) después de 17 años, aunque tras este periodo la inmunidad humoral fuera indetectable (189).

1.3.2.1 Respuesta celular

A la vista de que la respuesta humoral se quedaba corta a la hora de dar respuestas satisfactorias en cuanto a la evolución de los pacientes, la comunidad científica decidió empezar a incluir la determinación de la respuesta celular en sus investigaciones (189). Algunos científicos plantearon que la inmunidad celular puede jugar un papel determinante en el control del SARS-CoV-2 en pacientes que han perdido o no han llegado a desarrollar IgG anti-S después de la vacunación, como ha ocurrido en pacientes con tratamiento inmunosupresor como el anticuerpo monoclonal rituximab (anti-CD20), que agota los anticuerpos, aunque pocos desarrollan neumonía después de la infección con el virus (189).

Así como se vio que los anticuerpos anti-N permanecían de 40 a 159 días, pero los anti-S habían disminuido y, en algunos casos, desaparecido, las células T permanecieron detectables, incluso aumentaron en cantidad y potencia en ese mismo periodo de tiempo (189), otorgando al paciente una inmunidad celular específica para el SARS-CoV-2. Esta inmunidad es fácilmente detectable con, por ejemplo, el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA) para aumentar la proteína (ELISpot). Este IFN- γ es liberado por las células NK y por las células T *natural killer* (NKT) y juega un papel en la respuesta inmunitaria tipo 1 (células T efectoras de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD4⁺ y CD8⁺) después de que se haya reconocido un antígeno específico del virus y se haya puesto en marcha la inmunidad adaptativa (189).

Tras un primer contacto del virus con la célula, se destruyen varios antígenos por un proceso de fagocitosis llevado a cabo por las células presentadoras de antígeno (APC). Estas células rompen el antígeno en fragmentos más pequeños y los presentan en su superficie a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Estos fragmentos son, a su vez, presentados a células del huésped (Th CD4⁺, CD8⁺ y células B). Estas últimas se diferencian en células plasmáticas y liberan anticuerpos que impiden la entrada del virus en la célula. La activación de las células T auxiliares por APC conduce a una diferenciación en subtipos con distintas funciones mediadas por la secreción de citoquinas y el contacto de célula a célula. Paralelamente, las células auxiliares Th₂ diferenciadas ayudan a la madurez de las células B provocando una

segunda señal, principalmente a través de IL-4 y la interacción de CD40/CD40L. Algunas de las células CD4⁺ también se diferencian en células auxiliares foliculares T (Tfh), participando en las interacciones en los centros germinales para que se lleve a cabo la maduración de las células B de memoria y las células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad y larga vida. Por su parte, otro grupo de células CD4⁺ se diferencian en células T auxiliares de memoria. Las células auxiliares Th₁ tienen la principal tarea de intervenir en la formación de la respuesta celular, activando el MHC-I de CD8⁺ (CTL) e interactuando con APC simultáneamente. Una vez activados, los CTL provocan la apoptosis (mediante la unión del ligando FasL con FasL) de las células huésped infectadas con SARS-CoV-2. Algunos CTL se diferencian en células T citotóxicas de memoria con función de activar rápidamente la respuesta de CTL en contacto con antígenos secundarios, de manera similar que cuando las células NK interactúan con la célula infectada por el virus. Estas contienen unos gránulos con IFN- γ y TNF- α en su citoplasma que secretan y producen la muerte celular programada. Además, el mecanismo de activación de las células NK no se produce a través de moléculas de MHC, ya que el MHC no siempre está presente en las células infectadas por virus (imagen 6) (189).

En pacientes con COVID-19 leve o asintomática, se vio que desarrollaban células Tfh específicas contra el virus y, en aquellos con una forma grave de la enfermedad, la presencia de una alta concentración del receptor de quimiocinas CXCR3⁺ y de células T foliculares auxiliares (189).

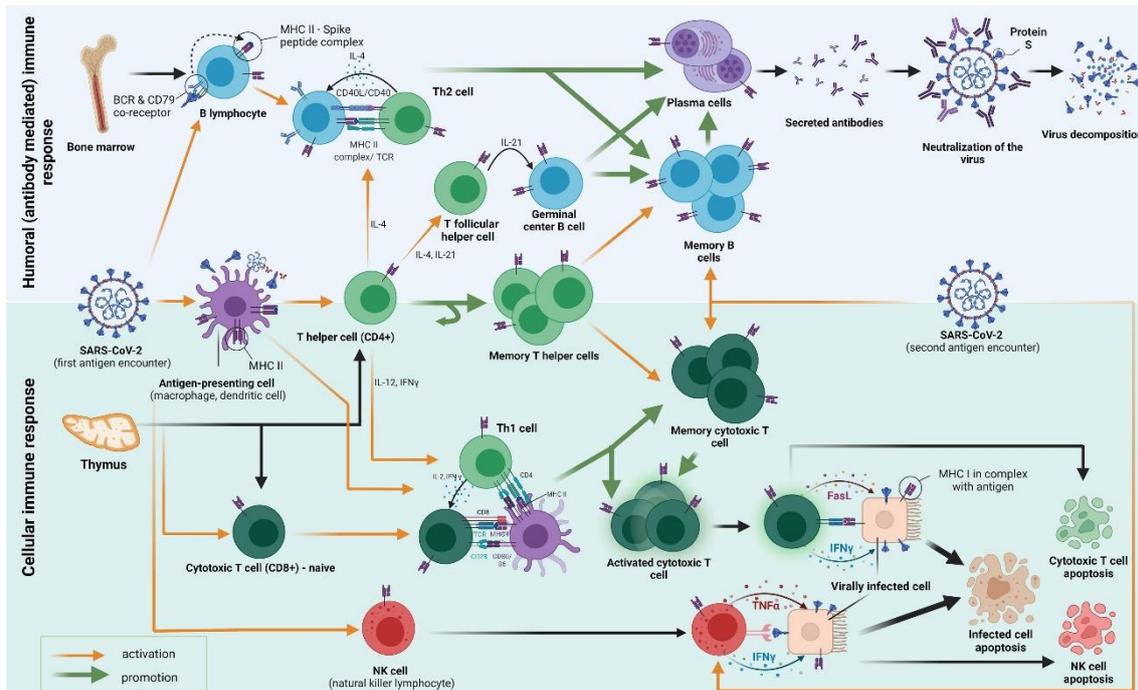


Imagen 6. Respuesta humoral y celular desarrollada ante el contacto del huésped con el SARS-CoV-2.

Se cree que, en los pacientes convalecientes por la enfermedad o vacunados contra SARS-CoV-2, las células T CD4⁺ se ven menos afectadas por las mutaciones de las variantes del virus que dan lugar a las temidas VOC, al revés de lo que ocurre con los anticuerpos neutralizantes (inmunidad humoral). Además, puede ser que la protección contra el virus esté determinada por células T específicas contra el SARS-CoV-2 que produzcan un reacción cruzada con otros coronavirus (189).

En el estudio llevado a cabo por Bange et al., se comparó la respuesta inmune de pacientes oncohematológicos (con un claro deterioro de la respuesta humoral) con COVID-19 y se observó que las tasas de supervivencia eran mayores entre aquellos que tenían más células CD8⁺, incluidos aquellos en tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD20 (192). Sin embargo, esto no se vio en los que recibieron un trasplante de órgano, lo que reafirma las observaciones de Sattler et al., que no encontraron ninguna alorreactividad en trasplantados de riñón tras la administración de BNT1b2b2 (193). No obstante, otro estudio determinó que, tras la tercera dosis con la vacuna ARNm-1273, el 49 % de los pacientes sometidos a trasplante de riñón que no

habían respondido a las dos dosis anteriores desarrollaron anticuerpos (189,194). Otro estudio francés analizó la respuesta inmune de 11 contactos con familiares con PCR negativa para SARS-CoV-2 y niveles de anticuerpos negativos, de los que 4 desarrollaron una respuesta celular, lo que demuestra que habían tenido reacciones de células T específicas del virus sin seroconversión. En conclusión, distintos artículos reafirman que pacientes con PCR positiva para SARS-CoV-2 seronegativos 60 días después del inicio de los síntomas tenían una respuesta de células T confirmada en el laboratorio por IFN- γ -ELISpot (189).

Está demostrado que las personas vacunadas que han sido infectadas por el virus tienen títulos de anticuerpos y niveles de células T más altos que los que no. Además, esta inmunidad celular es más duradera: mientras que los títulos de anticuerpos se correlacionan de forma inversa con el tiempo transcurrido tras el último contacto del organismo con el virus, la inmunidad celular puede detectarse hasta 20 meses después (189).

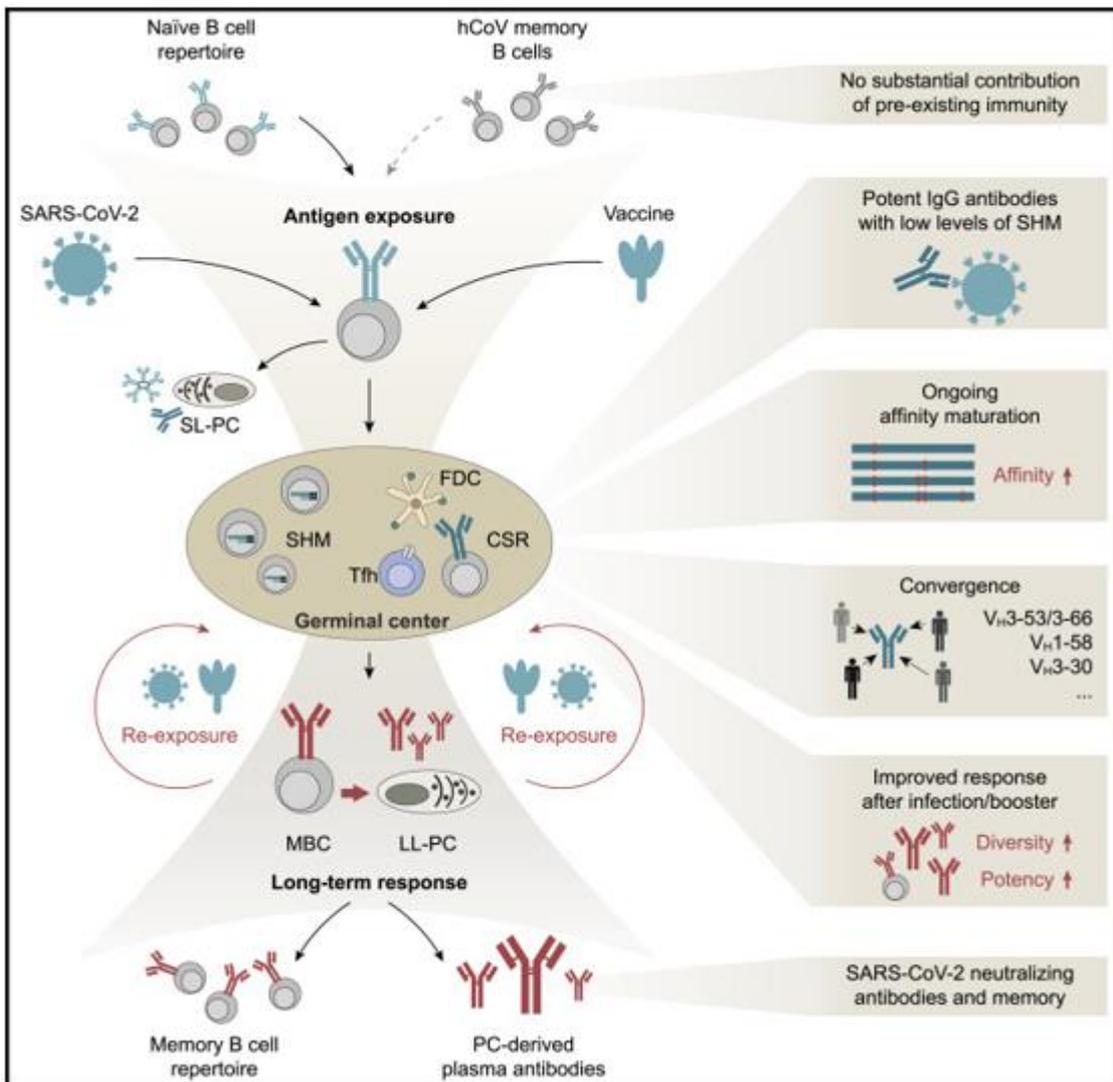
Todavía queda mucho por estudiar en lo relacionado a la inmunidad celular frente al SARS-CoV-2. Ampliar conocimientos y mejorar la comprensión en esta materia podría aportar otro punto de vista en cuanto al diseño de vacunas y a medidas sociales (aislamientos de pacientes sin anticuerpos anti-S, tratamiento de estos pacientes, prevención de la propagación, etc.), así como una posible predicción de resultados clínicos (189).

1.3.2.2 Respuesta humoral

La respuesta humoral se desarrolla en dos fases: la extrafolicular y la del centro germinal. La primera ocurre unos 9 días después de la infección y en la que las células B se activan y se diferencian en células plasmáticas de vida corta fuera del folículo, dando lugar a anticuerpos con escasas mutaciones, pero con altas capacidades de neutralización. Aquí predomina la formación de IgM, que cambia a IgG e IgA después. En la segunda fase, que se desarrolla días después de la infección y puede durar meses,

las células B específicas de antígeno se ven sometidas a una hipermutación somática y se seleccionan basándose en una alta afinidad por el antígeno. Aquí se obtienen distintos isotipos de anticuerpos de vida larga. En ambas fases se producen anticuerpos B de memoria específicos de antígeno que perduran tiempo después de que la infección primaria se haya eliminado (195).

Después de un primer contacto con el antígeno del virus, las células B se acumulan en los centros germinales de los folículos de células B de los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y bazo). Una vez allí, estas células B se activan, proliferan, mutan y compiten por el antígeno con la ayuda de células T. Tras este proceso, se obtienen células B de memoria con afinidad madurada y de clase conmutada, además de células plasmáticas de vida larga. Tras varios estudios, se vio que las células *helper* foliculares B y T del centro germinal reactivas frente al SARS-CoV-2 se podían detectar a las 2-3 semanas después de la inmunización y se asociaban al desarrollo de anticuerpos neutralizantes. También fue posible detectar células del centro germinal y células plasmáticas de la médula ósea reactivas al virus más de 6 meses después de la primera inmunización. Además, se vio que la enfermedad grave se asociaba con respuestas de células B independientes del centro germinal extrafolicular que producen células plasmáticas de vida corta con maduración de afinidad baja o nula. Sin embargo, en la enfermedad leve, se observaron niveles más altos de mutación somática y células plasmáticas reactivas frente al SARS-CoV-2 de vida más larga (24).



Esquema 6. Desarrollo de células B. La infección o vacunación por SARS-CoV-2 expone el antígeno del virus al sistema inmune, haciendo que se activen los linfocitos B *naïve* (vírgenes). Paralelamente, también puede atraer células B de memoria ya preexistentes a través del proceso de reactividad cruzada con otros coronavirus humanos comunes endémicos (hCoV; por ejemplo, OC43). Tras la activación, estas células B se diferencia en células plasmáticas secretoras de anticuerpos de vida corta (SL-PC) o son reclutadas en centros germinales. Aquí, interactúan con células dendríticas foliculares presentadoras de antígenos (FDC) y células T foliculares auxiliares (Tfh) para producirse una recombinación de cambio de clase (CSR) y ganar afinidad por el antígeno presentado a través de una hipermutación somática (SHM). Una ligera cantidad de esa hipermutación somática parece ser suficiente para obtener una actividad neutralizante de gran efectividad. Las células B del centro germinal ya maduras pueden permanecer

aquí para obtener más mutaciones somáticas o diferenciarse en células B de memoria (MBC) o células plasmáticas secretoras de anticuerpos de vida larga (LL.C). Una posterior exposición al virus, ya sea mediante vacunación o infección, inducirá la diferenciación de células B de memoria en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, pudiendo provocar la evolución de las células B y la adquisición de mutaciones y/o la producción y expansión de nuevos clones de células B de memoria. Estos procesos generan clones de células B de memoria y una actividad neutralizante del suero con una potencia aumentada frente a diferentes variantes (24).

En un estudio realizado con 67 participantes con COVID-19 se demostró que los anticuerpos anti-N IgM e IgG se desarrollaban desde el día 7 y el 10 después de la infección y alcanzaban su nivel máximo a los 28 y a los 49 días respectivamente, llegando a aparecer antes y con títulos mayores en los pacientes con COVID-19 grave. Aquellos que desarrollaban menos cantidad de IgG (respondedores débiles) tenían una tasa de eliminación del virus significativamente más alta con respecto a los respondedores fuertes, de lo que se concluye que una respuesta más fuerte de anticuerpos indica una eliminación viral más tardía y mayor gravedad de la enfermedad (196). Esto fue corroborado por otro estudio llevado a cabo por Zhao et al. en 2020 (197). Por su parte, Liu et al., demostraron que una alta cantidad de anticuerpos tenía una correlación inversa con la inflamación pulmonar (198).

Al igual que ocurre en la respuesta celular, existen reacciones cruzadas entre virus de la familia coronavirus. En el caso de los anticuerpos frente a SARS-CoV-2, SARS-CoV y MERS, en un estudio se vio que anticuerpos monoclonales de un paciente infectado en 2003 con SARS-CoV se dirigían también contra la espícula del SARS-CoV-2, estructura con la que ambos comparten un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Y, de igual manera, anticuerpos de pacientes que habían sido infectados con SARS-CoV-2 neutralizaron eficazmente SARS-CoV y MERS. También se ha observado, sobre todo en niños, que el contagio con HCoV (coronavirus de resfriado común), produce unos anticuerpos que pueden neutralizar con alta tasa de eficacia el SARS-CoV-2, lo que

explicaría, a su vez, por qué los niños sufren una COVID-19 menos grave que los adultos (196).

Los estudios han demostrado que los anticuerpos IgA e IgG anti-S han ido disminuyendo con el tiempo, aunque no queda claro cuándo dejan de ser detectables, mientras que, paralelamente, los anticuerpos anti-N fueron detectables durante más tiempo (de 40 a 159 días de mediana) (189).

Es importante conocer cuánto duran los anticuerpos activos en el organismo. Hay estudios que sugieren que esta duración supera los meses después de la infección, aunque otros han observado que hay una fuerte caída de títulos de anticuerpos en 3-4 meses. En concreto, se ha observado que la disminución de IgA es más leve que las de IgM e IgG. En los pacientes con COVID-19 asintomática o leve, la disminución es también mayor que en los pacientes con enfermedad grave, lo que sugiere que la longevidad de las respuestas de anticuerpos puede estar correlacionada con el grado de gravedad. Así mismo, estos datos también plantean la necesidad de potenciar la vacunación para una protección duradera. A pesar de que la longevidad de los anticuerpos no está clara, se ha visto que existen células B de memoria frente a SARS-CoV-2 3-6 meses después de la infección. Hay estudios que determinan que la cantidad de células B de memoria específicas contra la región RBD se mantuvo hasta 6 meses después de la infección en pacientes en los que los títulos de IgM e IgG y la capacidad de neutralización descendieron significativamente. La persistencia de estas células B de memoria contribuyen a una protección eficaz ante una reexposición al virus y suponen la base fundamental para una vacunación eficaz (196).

Algunas investigaciones sugieren que los títulos de anticuerpos anti-S se correlacionan con células plasmáticas específicas de la proteína de la espícula en la médula ósea, que disminuyen drásticamente en los 4 primeros meses después de la infección y de forma más gradual después (hasta 11 meses). Esto puede plantear que las células plasmáticas tengan memoria. Además, en pacientes con infecciones recurrentes se ha visto un aumento de anticuerpos específicos en el suero y en la saliva asociados a células B de memoria (189).

Se ha observado que, en aquellos pacientes que superaron la enfermedad grave, se desarrollaba IgG anti-S antes y con títulos más altos que en aquellos que fallecieron o que respondieron lentamente con la producción de anticuerpos anti-S, anti-RBD o anticuerpos neutralizantes (NAb). Curiosamente, en otro estudio se vio que el nivel de anticuerpos anti-S se elevaba en las personas que habían superado la enfermedad, y los de anti-N, en los fallecidos. Además, en los primeros, las respuestas fagocíticas y de fijación del complemento específicas de la espícula se hicieron antes más fuertes, lo que puede indicar un beneficio en la evolución de la enfermedad. También se ha comprobado que la producción de anticuerpos neutralizantes antes de las primeras dos semanas de enfermedad supone un factor determinante en la recuperación. No obstante, los títulos de anticuerpos específicos no son los únicos que determinan la evolución, sino que hay que tener en cuenta factores como la cinética de la seroconversión, el isotipo del anticuerpo o la especificidad del antígeno de los anticuerpos (196).

A pesar de que la respuesta humoral ha sido ampliamente medida y estudiada, no ha sido así con la inmunidad de las mucosas. Se cree que esta inmunidad ejerce su acción a través de la neutralización de partículas virales. En el subepitelio de la mucosa y glándulas asociadas se produce IgA por parte de las células plasmáticas, y se transporta a las secreciones y se libera en forma de SIgA (IgA secretora). Este anticuerpo tiene la capacidad de inhibir la unión del virus a la célula huésped, la invasión de las células epiteliales y fomentar la aglutinación y la eliminación de sustancia mucosa y destaca por su gran actividad neutralizante (189,196). Los anticuerpos IgA predominan en la fase temprana de la COVID-19 (196) en suero, saliva y líquido broncoalveolar, aunque luego, las concentraciones de IgA específica en el suero disminuyen tras un mes desde el inicio de los síntomas, mientras que la IgA neutralizante puede permanecer en saliva durante 2-3 meses (189). El hecho de que la producción de IgA actúe como primer paso de defensa contra la entrada del virus en el organismo en la activación de la inmunidad en la mucosa abre las puertas al desarrollo de vacunas nasales. De hecho, en un estudio realizado con vacunas intranasales con vectores de adenovirus en ratones se vio que estos conseguían una inmunidad completa frente al SARS-CoV-2. Además, en comparación con dos dosis de vacuna intramuscular de ARNm, un refuerzo con una

vacuna intranasal indujo niveles altos de IgA y de neutralización en la mucosa y de células T de memoria en los pulmones. Pero no solo tras una dosis de refuerzo, sino que, tras una dosis única con otra vacuna también vectorizada con adenovirus, los ratones estaban completamente protegidos contra el SARS-CoV-2, además de asegurarse una prevención en la pérdida de peso y en la mortalidad. Esta vacuna indujo, no solo la producción de IgA en la mucosa del tracto respiratorio superior, sino también de anticuerpos séricos neutralizantes y de células T CD4⁺ y CD8⁺ durante 6 meses (189).

Se han dado casos en los que ciertos pacientes han generado autoanticuerpos. Estos se dirigen contra proteínas del sistema inmune (citoquinas, quimiocinas, componentes del complemento, proteínas de superficie, etc.) del propio organismo, provocándole una perturbación. Esto se ha visto, sobre todo, en afecciones inflamatorias graves, como la infección viral crónica, y en pacientes con COVID-19 con síntomas muy graves. En pacientes hospitalizados, se han detectado niveles de anticuerpos anti-anexina A2 (196), relacionados con lesión pulmonar (199), en los pacientes que fallecieron más altos que en los no críticos. Estos autoanticuerpos también se pueden dirigir contra antígenos asociados a tejidos que se correlacionan con las características clínicas de la inflamación y con la gravedad de la enfermedad. En un estudio se vio que células B extrafoliculares que se habían activado en pacientes críticos compartían características con las células B de enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES). En otro estudio se informó de la presencia de autoanticuerpos contra IFN-I en el 10% de los pacientes con neumonía por COVID-19 potencialmente mortal frente a un 0,33% de individuos sanos o un 0% de pacientes con enfermedad asintomática (196).

1.3.3 Inmunidad híbrida

La inmunidad híbrida es la que se consigue con la infección con SARS-CoV-2 después de una pauta completa de vacunación. Diferentes estudios que han investigado la inmunidad tras una infección después de la administración de dos dosis de una vacuna o sin haberla recibido nunca han demostrado que los primeros cuentan con una mayor

cantidad de anticuerpos y, estos, con una mayor capacidad de neutralización que los primeros (individuos *naïve*). Tras un periodo de 3 meses postvacunación, las personas que se infectaron mantuvieron una mayor cantidad de anticuerpos plasmáticos específicos anti-RBD con un nivel de neutralización plasmática mayor frente a las variantes virales, incluida Ómicron, que los pacientes infectados que no habían sido vacunados previamente. Además, los previamente vacunados presentaron mayor número de células B específicas IgG anti-RBD de memoria y activadas, aunque estos niveles también se alcanzaron en el grupo sin vacunar tras una tercera dosis de refuerzo (200).

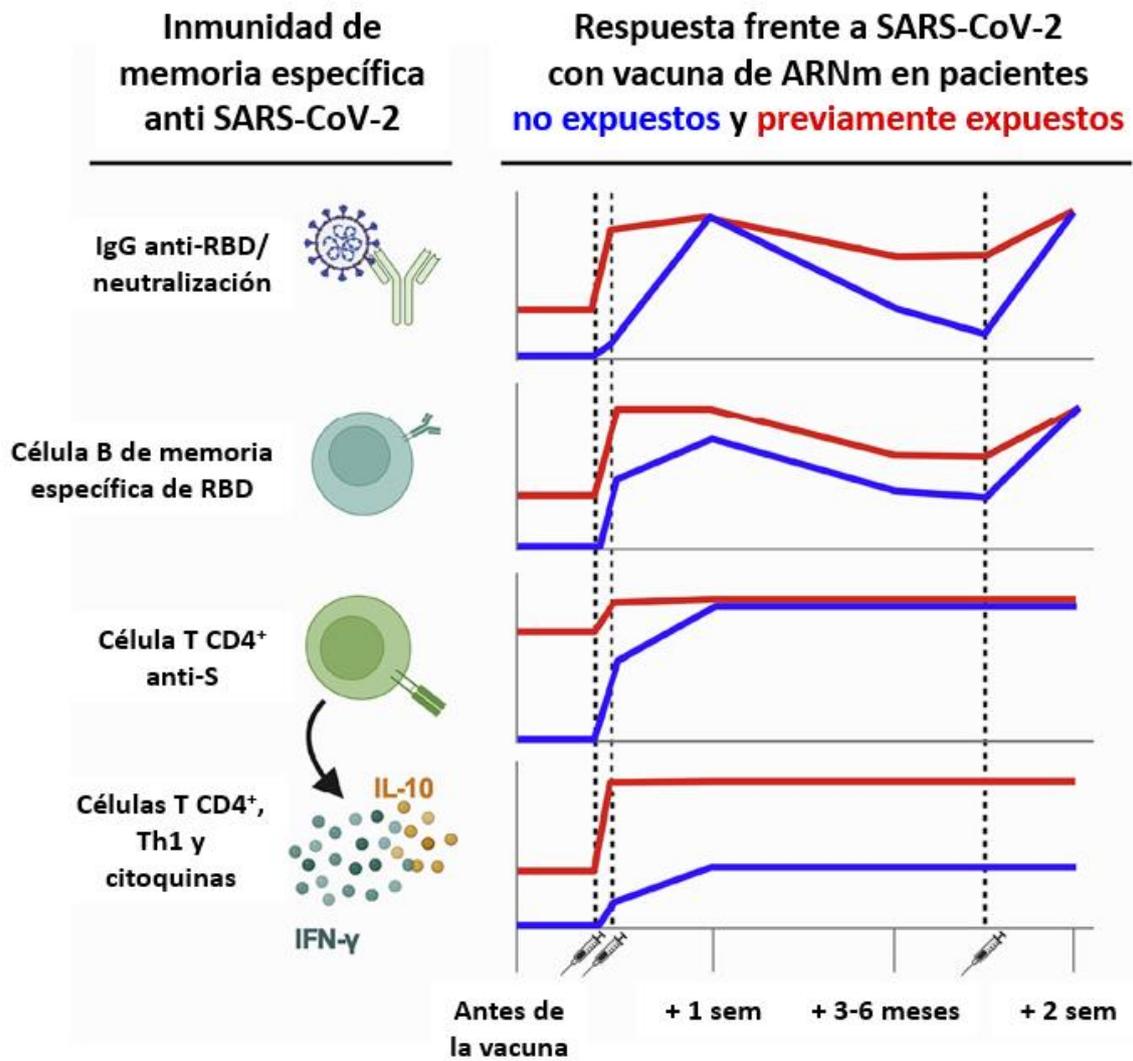


Imagen 7. Comparativa de inmunidad de memoria específica frente a SARS-CoV-2 por vacunación en pacientes no infectados (*naïve*) (azul) o en pacientes previamente infectados (rojo). Adaptado de Rodda et al., 2022 (200).

1.4. NEUTRALIZACIÓN

La neutralización contra el SARS-CoV-2 se obtiene, como ya se ha mencionado anteriormente, mediante anticuerpos, producidos bien por infección natural o bien por vacunación. La gran mayoría de anticuerpos neutralizantes se generan en función de epítomos de la proteína S en conformación de “prefusión”, que degenera luego en su estado de “postfusión”, en la que la producción de estos anticuerpos se encuentra reducida (26). Es una de las funciones fundamentales que tienen los anticuerpos y con ella inducen una esterilización frente a la infección viral. Estos anticuerpos se unen a la región RBD y otras proteínas del virus evitando su acoplamiento al receptor de la ACE-2. No reaccionan de manera cruzada con anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 ni con el plasma de pacientes convalecientes, por lo que se concluye que estos anticuerpos anti-RBD son, la mayoría, inhibidores específicos del virus (196). Adoptan una estructura cristalina con la que se une a los epítomos correspondientes a la parte donde interaccionan la región RBD viral con el de ACE-2 de la célula, lo que provoca un impedimento estérico y una competencia directa (196).

El aislamiento de anticuerpos neutralizantes con alta afinidad para el SARS-CoV-2 se puede conseguir pocas semanas después de la infección, y se hace a partir de células B de memoria de individuos convalecientes sin importar el grado de gravedad (24).

Se han observado anticuerpos con alta potencia y pocas mutaciones somáticas en segmentos de genes variables (por ejemplo, más del 95 % - 100 % de similitud con el gen VH de la línea germinal), lo que puede indicar que la vacunación induce de forma efectiva anticuerpos potentes. Meses después de la infección, los antígenos virales pueden quedarse atrapados en los centros germinales y/o expresarse de forma sostenida. Tras una infección leve, el nivel de mutación somática en las células B de memoria aumenta con el tiempo, generando células maduras que codifican anticuerpos con mayor potencia y frente a más variantes. De la misma manera, tras la vacunación, las células B del centro germinal de los ganglios linfáticos y las células B de memoria pueden evolucionar y conseguir niveles cada vez mayores de mutación somática, aunque el desarrollo de la potencia y actividad frente a las distintas variantes de los

anticuerpos tras la vacunación es menor que tras la infección natural, pero ahí juega un papel fundamental la vacunación de refuerzo (*booster*), con la que se consiguen nuevos clones de células B que contribuyan de forma eficaz a un aumento de esa potencia neutralizante y actividad frente a otras variantes del virus (24).

Cabe destacar que la IgA sérica y de las superficies mucosas tiene una neutralización mucho mayor que la IgG, en concreto, la forma dimérica de IgA, predominante en las mucosas, tiene una capacidad de neutralización 15 veces mayor que la forma monomérica, predominante en el suero, y esta, a su vez, es el doble de potente que la forma equivalente de IgG (196).

En pacientes que han superado la enfermedad y en vacunados, los anticuerpos IgG anti-S van dirigidos contra epítomos fuera de la región RBD y muchos no tienen capacidad neutralizante. Sin embargo, la mayor parte de los anticuerpos que expresan una capacidad neutralizante potente son los que se dirigen contra la región RBD específicamente (anticuerpos anti-RBD). Esta región puede adoptar diferentes conformaciones ("abajo" y "arriba", esta última necesaria para la interacción con el receptor ACE-2) gracias a su gran flexibilidad. Esto influye en el acceso a los epítomos de los anticuerpos.

Analizando estructuras, características funcionales y/o mapeo antigénico, se han establecido distintas clasificaciones para los anticuerpos neutralizantes anti-RBD (24). Los anticuerpos anti-RBD que tienen mayor actividad neutralizante *in vitro* son aquellos que compiten con el motivo de unión del receptor ACE-2. Estos son anticuerpos derivados de segmentos génicos VH3-53 o VH3-66 y con muy pocas mutaciones, y constituyen un clonotipo que se encuentra en la mayoría de los individuos. La mayoría de clonotipos VH3-53 o VH3-66 sólo pueden acceder a su epítomo cuando la región RBD está en posición "arriba" (clase 1, imagen 8); sin embargo, otros anticuerpos dirigidos a los motivos de unión a receptores pueden unirse a la región RBD en cualquiera de sus posiciones (clase 2, imagen 8). Al interactuar con regiones RBD adyacentes, pueden bloquear el trímero S en una conformación cerrada, impidiendo, así, su unión al receptor ACE-2. Un tercer tipo de anticuerpos anti-RBD son los que unen los epítomos distales al motivo de unión al receptor, con el que muestran un solapamiento mínimo o nulo (clase

3, imagen 8). Aunque algunos anticuerpos monoclonales (por ejemplo, sotrovimab) que no compiten directamente con la unión a ACE-2 sí pueden interferir a través de impedimento estérico. Por último, existe un cuarto tipo de anticuerpos anti-RBD no competidores de ACE-2 que van dirigidos a un epítipo conservado distal del motivo de unión al receptor (clase 4, imagen 8). A pesar de su limitada actividad *in vitro*, se ha demostrado que estos anticuerpos actúan alterando la proteína de la espícula (provocando el desprendimiento prematuro de S1, por ejemplo) y han demostrado una reactividad cruzada contra coronavirus zoonóticos relacionados (24).

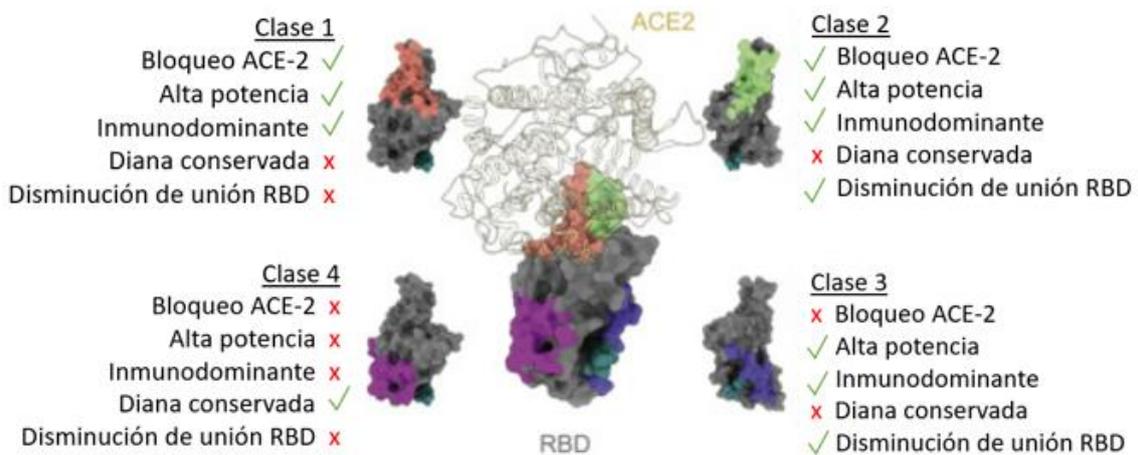


Imagen 8. Clasificación de anticuerpos neutralizantes en función de su unión a la región RBD. Adaptado de Gruell et. al, 2022 (24).

Los anticuerpos que actúan en la cara RBM son los que tienen mayor capacidad neutralizante. Entre ellos se encuentran anti-RBD-1, RBD-2 y RB-3. Anticuerpos anti-RBD-1 actúan en el centro de unión entre RBD y ACE-2; los anti-RBD-2 se desplazan hacia la espícula, y los anti-RBD-3, hacia la superficie plana. C102, C105, P2C-1F11, CB6 y REGN10933 son algunos de los anticuerpos neutralizantes anti-RBD-2 y utilizan, mayoritariamente, un fragmento variable (VH) de la cadena pesada (IGHV3-53/IGHV3-66) que tienen una hipermutación somática muy limitada y bucles CDR3 cortos (menos de 15 residuos) en la región determinante de la complementariedad. NY en los residuos 32 y 33 de la VH en la CDR1 y SGGG en los residuos 53-56 de VH en la CDR2 son dos

motivos característicos necesarios para la unión al RBM. Los anticuerpos anti-RBD-2 y 3 se ven afectados por las mutaciones K417N/T, E484K/A y N501Y presentes en Alfa, Beta, Gamma y los sublinajes BA.1 y BA.2 de la variante Ómicron (195).

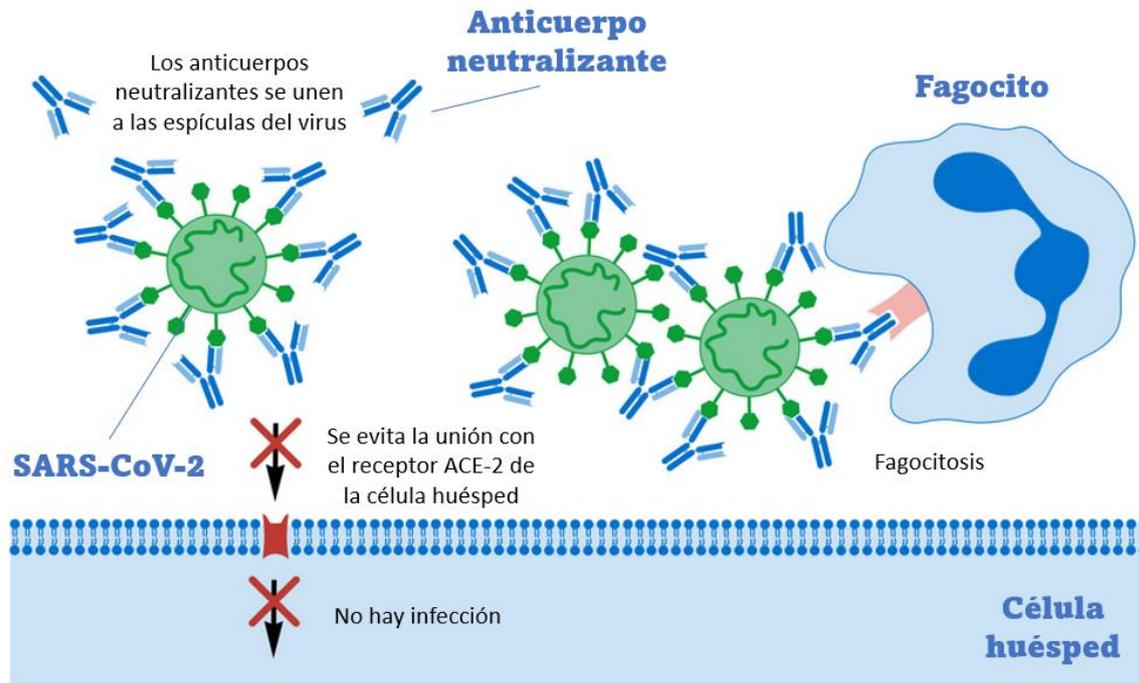


Imagen 9. Mecanismo de acción de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes se unen a las proteínas de las espículas en la superficie del SARS-CoV-2, impidiendo su unión al ACE-2 de la célula huésped. Al unirse varios anticuerpos neutralizantes a varias espículas, atraen a otros virus neutralizados y los agrupan para que puedan ser más fácilmente reconocidos y destruidos por los fagocitos. Adaptado de Fluidic Analytics, 2020 (201).

Otros anticuerpos, dirigidos contra la cara exterior del RBD, también tienen gran capacidad de neutralización. Son los anti-RBD-4 y anti-RBD-5. Los primeros se unen al borde exterior del RBM y bloquean el ACE-2. Estos son los anticuerpos C002, A19-46.1, BD-368-2, COV2-2130 y P2B-2F6. Por su parte, los anti-RBD-5 se unen lejos del RBM, por lo que ellos no bloquean el receptor ACE-2. Los anticuerpos anti-RBD-4 interactúan con los residuos F486 y Q493 en el RBM, igual que los de clase 2. Estos residuos diferencian

SARS-CoV-2 del SARS-CoV y parece ser que mejoran el RBD del SARS-CoV-2 para unión al receptor ACE-2. La interacción entre anti-RBD-4 y F486 imita la interacción entre ese residuo y ACE-2, ya que F486 se queda estático en un bolsillo hidrofóbico entre las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos. Otra interacción común es la que se hace con E484 a través de la cadena pesada o ligera, aunque la mutación E484K/A, encontrada en Beta, Gamma, Ómicron BA.1 y BA.2, Mu, Eta e Iota, disminuye o anula totalmente la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-RBD-4. Se ha observado que el uso conjunto de COV2-2196 (anti-RBD-2) y COV2-2130 (anti-RBD-4) de forma terapéutica como Tixagevimab-Cilgavimab (de la farmacéutica AstraZeneca), consigue una neutralización eficaz frente a Ómicron BA.1 y BA.2., a pesar de que cada una por separado no lo logra. La mutación L452R, característica principalmente en Delta, Épsilon y Kappa, también reduce significativamente o anula por completo la capacidad de neutralización de los anti-RBD-4. Por su parte, los anti-RBD-5 ejercen su acción contra el glucano N343, muy conservado entre el SARS-CoV-2, el SARS-CoV y muchos virus de murciélagos y pangolines que se consideran de alto riesgo de posibles brotes. REGN10987, LY-CoV1404 (anticuerpo parental de Bebtelovimab (Eli Lilly)) y C110 son algunos anticuerpos que pertenecen a este grupo y su función es unirse a las regiones entre el borde exterior del RBM y el glucano N343, mientras que los otros anticuerpos de este grupo, S309 (el anticuerpo parental de Sotrovimab (de GlaxoSmithKline/Vir Biotechnology)) y C135, se unen a regiones que contienen el glucano N343. Las mutaciones de escape de REGN10987 incluyen aquellas en las posiciones N439, N440 y G446. En concreto, LY-CoV1404 neutraliza de manera eficaz Ómicron BA.1 y BA.2. Estos anticuerpos anti-RBD-4 y anti-RBD-5 tienen bajas hipermutaciones somáticas sin maduración aparente, por lo que actúan en un corto periodo de tiempo de manera muy potente. El tercer tipo de anticuerpos neutralizantes son los que se dirigen contra la cara interior y son los anti-RBD-6 y anti-RBD-7. Son más pequeños que los anteriores, con menor capacidad neutralizante y solo se unen a epítopos contrarios a la superficie exterior solamente accesibles cuando el RBD adopta una conformación hacia arriba. Esta accesibilidad transitoria y limitada podría explicar su baja capacidad de neutralización. Estos anticuerpos incluyen S2X259, DH1047 y CR3022. Para la variante Ómicron, estos anticuerpos anti-RBD-6 y 7 no tienen ninguna

capacidad de neutralización, principalmente por las mutaciones en las posiciones S371, S373 y S375 (195).

Aunque la actividad neutralizante es la que se da más frecuentemente frente a la región RBD, también existen anticuerpos dirigidos frente a la región NTD de la proteína de la espícula. En comparación con otras regiones, la NTD tiene una densidad de glucanos relativamente alta que limita la accesibilidad. Sin embargo, se han detectado anticuerpos que actúan contra un sitio estructuralmente definido de gran vulnerabilidad (supersitio antigénico), además de anticuerpos anti-NTD neutralizantes que muestran un contacto mínimo o nulo con este sitio. No se conoce con exactitud el mecanismo por el que los anticuerpos anti-NTD ejercen su actividad neutralizante, pero se cree que puede ser porque interfieren en los cambios conformacionales necesarios para la fusión de membranas tras la unión del virus al receptor ACE-2 (24).

Se ha identificado un tercer tipo de anticuerpos en cuanto a su sitio de unión. Estos se unen al dominio S2 y tienen la capacidad de reducir la carga viral *in vivo*. Se caracterizan por una capacidad neutralizante un poco más débil que los otros anticuerpos, pero tienen una alta reactividad cruzada con otros virus de la familia, lo que le otorga la posibilidad de ser las dianas del diseño de vacunas pan-*Betacoronavirus* (24), familia a la que pertenece el SARS-CoV-2.

Mención aparte, hay ciertos anticuerpos que no encajan en ningún sistema de clasificación. Estos son ADG-2 y S2H97. El epítipo de ADG-2 se superpone parcialmente con los de la clase 1 y con los de clase 4 y S2H97 se une a un epítipo debajo del RBM. La unión de S2H97 al RMD necesita una apertura mayor del RBD que la unión de los anticuerpos anti-RBD-6 y anti-RBD-7 al ACE-2. De igual manera que los anticuerpos no compiten con ACE-2, se cree que S2H97 neutraliza el virus al interferir e interrumpir los pasos posteriores a la unión de ACE-2 antes de la entrada viral (195).

En cuanto a las variantes de preocupación, se han detectado mutaciones que pueden conferir resistencia a los anticuerpos neutralizantes. En concreto destacan dos en el RBD, en la proteína de la espícula. El residuo E484 es el lugar donde algunas mutaciones forman enlaces de hidrógeno, lo que provoca una considerable reducción de la unión policlonal al plasma de los anticuerpos de clase 2. De la misma manera actúan las

mutaciones en el residuo K417, que disminuye la actividad de los anticuerpos de clase 1. Las mutaciones en estos dos residuos, E484 y K417, atenúan la acción de los anticuerpos neutralizantes dirigidos al RBM. Las VOC Beta, Gamma y Ómicron cuentan con mutaciones en ambos residuos, por lo que con ellas se ha visto una clara disminución de la sensibilidad a la neutralización mediada por anticuerpos en comparación con la cepa salvaje (24).

Pero no solo hay mutaciones en el RBD. En la región NTD se dan inserciones y deleciones o mutaciones en los alrededores del supersitio antigénico. Pequeñas mutaciones individuales en esta región, como la mutación L452R presente en la VOC Delta, pueden no tener un gran efecto contra la actividad policlonal sérica, pero sí que pueden conferir resistencia a los anticuerpos monoclonales terapéuticos y, si dejan de ser individuales para pasar a ser una acumulación, ya sí que pueden llegar a afectar a la resistencia policlonal. La variante Ómicron y sus sublinajes presentan mutaciones en la región NTD y en los epítomos de muchos anticuerpos anti-RBD de clase 1, 2 y 3, lo que le otorga la capacidad de tener una alta resistencia a los anticuerpos monoclonales y a los policlonales que se generan por la infección natural o por la vacunación (24).

En cuanto a los estudios llevados a cabo *in vitro*, se ha observado que la variante Ómicron es capaz de sortear la neutralización de los anticuerpos producidos por la vacuna BNT162b2 en más del 85% de los casos debido a sus múltiples mutaciones en la espícula, lo que puede suponer un problema a la hora de encontrar terapias eficaces que frenen su avance (202). En otro metaanálisis, en el que se incluyeron 3 estudios donde se estudiaba la neutralización con virus vivos, se publicó que las variantes Alfa, Beta, Gamma y Delta también escapaban a la acción neutralizante de los anticuerpos producidos por infección natural con una media de 1,4, 4,1, 1,8 y 3,2 veces en comparación con la cepa salvaje. No obstante, los anticuerpos contra la variante Alfa siguen siendo efectivos y no hay indicios de que alguna vacuna no sea eficaz. En el caso de la variante Beta, se ha observado, en algunos casos, el escape de la neutralización de plasma convaleciente y anticuerpos inducidos por la vacunación. En cuanto a la Gamma, se ha visto que las vacunas diseñadas protegen frente a esta variante, aunque tenga un mayor escape a la neutralización que la anterior. Finalmente, la variante Delta escapa a

la neutralización de algunos anticuerpos dirigidos contra el NTD y los títulos de anticuerpos neutralizantes después de dos dosis de vacuna son entre 3 y 5 veces más altos que frente a la variante Alfa, aunque una dosis de refuerzo muestra una alta eficacia frente a Delta (202).

Especial mención requiere la mutación en la secuencia E484 situada en la región RBD de la proteína S. Esta mutación tiene una sustitución de glutamato (E) por lisina (K) (203) o por alanina (A) en la posición 484. Se ha identificado como la responsable *in vitro* del escape de los anticuerpos monoclonales y policlonales séricos porque aumenta la afinidad del RBD por el ACE-2 (204), hasta más de 10 veces, según algunas publicaciones (203). Algunas de las VOC, la Beta (E484K), la Gamma (E484K) y la Ómicron (E484A), cuentan con esta mutación, lo que les hace especialmente peligrosas por su gran capacidad de diseminación, incluso entre personas totalmente vacunadas (181).

Otras mutaciones importantes a tener en cuenta son (204):

- La mutación N501Y. Se localiza dentro de la región RBD de la proteína S. Su función es aportar una mayor afinidad de esta región por el receptor ACE-2, lo que puede aumentar la transmisibilidad.
- La mutación E484Q. También se encuentra en la región RBD de la proteína S. Es similar a la mutación E484K/A y también se asocia a un escape inmunitario.
- Las mutaciones K417N y K417T, en la proteína S. Juegan un papel importante en el cambio conformacional de la proteína y en el escape del sistema inmunitario. Se descubrió que K417N otorga menor afinidad por el receptor ACE-2, pero esto se compensa con la presencia de N510Y. La presencia de ambas mutaciones juntas aporta mayor afinidad por este receptor que si ninguna está presente.
- La mutación L452R. Se encuentra dentro de la región RBD y, por lo tanto, puede jugar un papel importante en la transmisibilidad o el escape inmunitario. Se ha demostrado que esta mutación escapa al efecto del anticuerpo monoclonal terapéutico bamlanivimab (LY-CoV555).
- La delección de las regiones 69 y 70 (Δ 69-70) de la proteína S está asociada con un aumento de la capacidad infectante, una disminución de la neutralización y un fallo en la diana del gen S (SGTF) en algunas pruebas RT-PCR multiplex,

aunque la variante que albergue esta delección podrá ser detectada la mayoría de las veces por el diseño de las pruebas que se detectan múltiples genes.

- Las mutaciones en la proteína de la nucleocápside pueden suponer un potencial riesgo para el diagnóstico del virus, dado que las pruebas de diagnóstico rápido de antígeno detectan la presencia de esta proteína.

Mutaciones en la espícula						
Variante	RBD	NTD	Sitio de la furina	Otras	Mutaciones destacadas	Efectos
(B.1)				D614G		Aumenta la densidad de la proteína S y la tasa de infección.
Alfa (B.1.1.7)	N501Y	Δ69-70 Δ144	P681H	A570D D614G T716I S982A D1118H	N501Y	10 veces más afín a ACE-2 que la cepa original, aumenta la transmisibilidad y la carga viral, y tiene un efecto mínimo en el escape del sistema inmunitario.
Beta (B.1.351)	K417N E484K N501Y	L18F D80A Δ211 D215G Δ241-243		D614G A701V	E484K	Aumenta la transmisibilidad, efecto moderado en el escape de anticuerpos y en la evasión del sistema inmunitario.
Gamma (P.1)	K417T E484K N501Y	L18F T20N P26S D138Y D164G R190S		D614G H655Y T1027I	K417T	Aumenta la transmisibilidad, efecto moderado en el escape de anticuerpos y en la evasión del sistema inmunitario.
Delta (B.1.617.2)	L452R T478K	T19R Δ156-157 R158G	P681R	D614G D950N	L452R	Aumenta la transmisibilidad, efecto moderado en el escape de anticuerpos y en la evasión del sistema inmunitario, aumento en la escisión en S1/S.

Mutaciones en la espícula						
Variante	RBD	NTD	Sitio de la furina	Otras	Mutaciones destacadas	Efectos
Ómicron (B.1.1.529)	G339D S371L S373P S375F K417N N440K G446S S477N T478K E484A Q493R G496A Q498R N501Y Y505H	A67V Δ69-70 T95I G142D Δ143-145 L212I Δ211		T547K D614G H655Y N679K N764K D796Y N856K Q954H N969K	N501Y E484A	Aumenta la afinidad de unión por ACE. Reduce la neutralización del fármaco bamlanivimab.
Ómicron BA.1/ B.1.1.529.1	G339D S371L S373P S375F K417K N440K G446S S477N T478K E484A Q493R G496S Q498R N501Y Y505H	A67V Δ69-70 T95I Δ143-145 Δ211 L212I +214EPE	P681H	T547K D614G H655Y N679K N764K D796Y N856K Q954H N969K L981F		Aumenta la transmisibilidad, efecto moderado en el escape de anticuerpos y en la evasión del sistema inmunitario.
Ómicron BA.2/ B.1.1.529.2	G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H	T19I Δ24-26 A27S G142D V213G	P681H	D614G H655Y N679K N764K D796Y Q954H N969K		Aumenta la transmisibilidad respecto a BA.1 en un 30% y presenta un mejor escape de anticuerpos y mayor evasión del sistema inmunitario.

Mutaciones en la espícula						
Variante	RBD	NTD	Sitio de la furina	Otras	Mutaciones destacadas	Efectos
Ómicron BA.3/ B.1.1.529.3	G339D S371L/F S373P S375F D405N K417N N440K G446S S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H	A67V Δ69-70 T95I G142D Δ143-145 Δ211 L212I +214EPE	P681H	D614G H655Y N679K N764K D796Y Q954H N969K		Aumenta la transmisibilidad, presenta un mejor escape de anticuerpos y mayor evasión del sistema inmunitario.
Ómicron BA.4/ B.1.1.529.4	G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K L452R S477N T478K E484A F486V Q498R N501Y Y505H	T19I Δ24-26 A27S Δ69-70 G142D V213G	P681H	D614G H655Y N679K N764K D796Y Q954H N969K		Aumenta la transmisibilidad, la evasión del sistema inmunitario y el escape de anticuerpos en comparación con BA.2 en individuos vacunados o que fueron infectados por BA.

Mutaciones en la espícula						
Variante	RBD	NTD	Sitio de la furina	Otras	Mutaciones destacadas	Efectos
Ómicron BA.5/ B.1.1.529.5	G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K L452R S477N T478K E484A F486V Q498R N501Y Y505H	T19I Δ 24-26 A27S Δ 69-70 G142D V213G	P681H	D614G H655Y N679K N764K D796Y Q954H N969K		Aumenta la transmisibilidad, la evasión del sistema inmunitario y el escape de anticuerpos en comparación con BA.2 en individuos vacunados o que fueron infectados por BA.

Tabla 9. Variantes de preocupación, mutaciones en la proteína espícula del SARS-CoV-2 y efecto biológico. ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2 (*angiotensin-converting enzyme 2*); NTD: dominio N-terminal (*N-terminal domain*); RBD: dominio de unión al receptor (*receptor binding domain*), Δ : delección (205).

Cuando se evaluaron las variantes que contenían una mutación en la región RBD, la variante B.1.1.7 (N501Y) del Reino Unido, la variante B.1.1.298 (Y453F) del visón danés y la variante B.1.429 (L452R) de California mostraron una neutralización similar a la de la cepa salvaje y la primera variante D614G. Aquellas personas que recibieron la pauta completa de la vacunación con BNT162b2 mostraron una neutralización en comparación con la cepa salvaje de 2,1 veces más para B.1.1.7, 1,4 veces más para B.1.1.298 y 2,0 veces más para B.1.429. En aquellos que fueron vacunados con ARNm-1273, se observó una neutralización de 2,3 veces para B.1.1.7, 1,3 veces para B.1.1.298, y 2,0 veces para B.1.429 en comparación con la cepa salvaje. Sin embargo, la neutralización de la variante brasileña/japonesa P.2, que contiene la mutación E484K en el RBD, disminuyó

significativamente (5,8 veces para BNT162b2, $p < 0,001$; 2,9 veces para mRNA-1273, $p < 0,01$). Esto concuerda con los amplios estudios que plantean que esta mutación puede evadir la respuesta inmune (206,207) y puede posibilitar una reinfección por SARS-CoV-2 (181,208–212). Del mismo modo, las respuestas de anticuerpos neutralizantes también disminuyeron significativamente para la cepa brasileña/japonesa P.1 (6,7 veces para BNT162b2, $p < 0,0001$; 4,5 veces para mRNA-1273, $p < 0,001$), que cuenta con tres mutaciones en RBD (K417T, E484K y N501Y) y también ha dado casos de reinfección (181,212).

1.5. VACUNAS

Los primeros casos de neumonía por SARS-CoV-2 se detectaron en China el 31 de diciembre de 2019 (1). No obstante, no se desarrolló un programa de vacunación masiva hasta diciembre de 2020 (213). A día 18 de octubre de 2023, se habían administrado 13.516.282.548 dosis de vacunas en todo el mundo, 112.886.307 en España (datos recogidos hasta el 3 de septiembre de 2023) (42).

En condiciones normales, el desarrollo de una vacuna es un proceso largo que puede durar entre cuatro y siete años (214). Sin embargo, ante la situación de emergencia por la COVID-19, los gobiernos de todo el mundo se vieron obligados a movilizar una cantidad enorme de recursos humanos y materiales en esfuerzos de investigación y desarrollo (26). Los laboratorios agilizaron sus investigaciones y acortaron estos periodos enormemente para poder dar una respuesta rápida en el momento más crítico de la pandemia. Además, las empresas reforzaron la fabricación y producción de los componentes necesarios para conseguir el mayor número de dosis disponibles para la población (214). En este contexto, la Comisión Europea facilitó a los laboratorios, lo más rápido posible y en una situación sin precedentes, a fabricar y distribuir vacunas, incluso antes de conocer los resultados definitivos de los ensayos clínicos, con el consiguiente riesgo de no ser aptas para su administración posteriormente por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) o por la FDA en EE. UU. y teniendo que ser destruidas (214).

La EMA y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan actualizar las vacunas para poder combatir las nuevas variantes dominantes hoy en día en la mayor parte del mundo. Además, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) y EMA plantean nuevas vacunas monovalentes dirigidas solo frente a una cepa en concreto, como XBB.1.5 (215,216). Además, asumiendo la estacionalidad del virus (periodos de invierno, sobre todo), recomiendan establecer un periodo anual de vacunación (por ejemplo, en primavera) para dar tiempo a las empresas a su fabricación y a los gobiernos para poner en marcha campañas de vacunación en función de la situación epidemiológica del momento (216).

El impacto de las vacunas para frenar la pandemia depende de su eficacia, la urgencia con la que se aprueben, la rapidez con la que se fabriquen y suministren, la posible aparición de otras variantes que puedan escaparse del efecto neutralizante de las vacunas y el número de personas inmunizadas (213).

En general, las vacunas contra la COVID-19 tienen una alta eficacia para prevenir la enfermedad grave, la hospitalización y la muerte causadas por las variantes actuales del virus (Ómicron y sus sublinajes), pero no tanto frente a la infección y la enfermedad leve, aunque sí se ha demostrado que la infección en personas después de haber sido vacunadas se manifiesta con unos síntomas más leves que en las no vacunadas. Sin embargo, ninguna vacuna es 100 % eficaz, por lo que hay personas que siguen enfermando, incluso muriendo, a pesar de estar vacunadas con todas las dosis recomendadas (infección postvacunación) (213), aunque es bastante infrecuente. No obstante, según datos de los CDC de EE. UU., las personas no vacunadas tienen un riesgo de fallecer por la enfermedad once veces mayor que las personas vacunadas (213), por lo tanto, la recomendación es vacunarse siempre que sea posible. Esta infección postvacunación también puede deberse a que no se haya respetado el tiempo mínimo para dejar actuar al sistema inmune después de haber recibido la vacuna. Las vacunas alcanzan su nivel máximo de inmunidad varias semanas después de haber recibido la última dosis de la pauta completa. Hasta entonces, la persona vacunada puede infectarse, enfermar y propagar el virus (213). Pero esta inmunidad no solo protege a la persona que se vacuna, sino que también ayuda a proteger a los demás que le rodean, ya que la probabilidad de que la persona vacunada se contagie del virus y lo propague es menor, aunque el riesgo siempre existe (213).

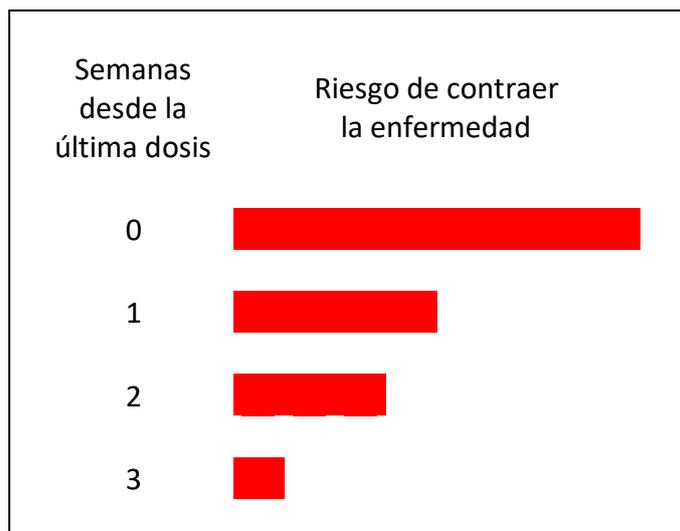
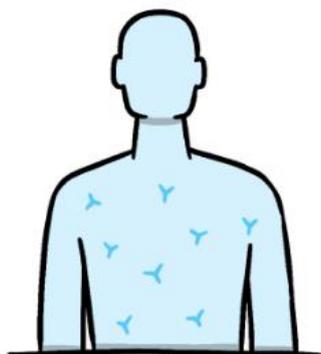
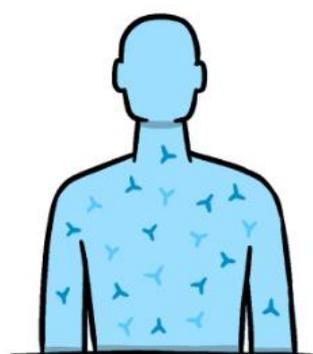


Imagen 10. Relación entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de la vacuna y el riesgo de infectarse con SARS-CoV-2. Adaptado de *Eficacia teórica, eficacia real y protección de las vacunas*, OMS, 2021 (217).

Las personas infectadas también deben vacunarse porque esto refuerza el sistema inmune (218).



Inmunidad natural por infección



Inmunidad natural por infección + vacuna

Imagen 11. Diferencia entre la formación de anticuerpos a través de inmunidad natural por una infección sin y con vacuna. Adaptado de infografía de la OMS sobre “vacunarse contra la COVID-19”, 2021 (218).

También es importante conocer cuánto tiempo dura la inmunidad de las vacunas. Todavía hay estudios que están comprobando esto, pero lo que sí se sabe es que la protección disminuye a los 6 meses después de la primera pauta de vacunación, por lo que es importante una dosis de recuerdo después de ese tiempo. Además, personas mayores de 60 años, con enfermedades previas o que están en contacto constante con el virus se les considera grupo prioritario y, por tanto, se recomienda administrarles esta dosis de refuerzo antes que al resto (213).

Los programas de vacunación mundiales favorecieron el levantamiento del confinamiento y la relajación en las medidas sanitarias, así como alivio en la presión sobre los sistemas nacionales de salud, ya que disminuyó la gente que enfermaba gravemente o que requería hospitalización (73). Según las estimaciones de algunos científicos, se cree que, durante el primer año de vacunación, las muertes por COVID-19 en todo el mundo se redujeron a más de la mitad, evitando, así, entre 14 y 20 millones de muertes (73).

Desde el principio quedó claro que las vacunas anti-COVID-19 suponen una importante herramienta para luchar contra la pandemia, pero no son suficientes por sí solas. Necesitan del apoyo de medidas sociales y de salud pública como la vigilancia, el aislamiento de los pacientes positivos diagnosticados, con síntomas o que hayan sido contactos de alguno de estos anteriores, el rastreo de los contactos, la protección individual de lavado de manos frecuente y uso de desinfectante, guardar una distancia mínima de un metro con respecto a las personas de alrededor, usar mascarilla facial homologada ajustada a la cara y que tape nariz y boca, evitar aglomeraciones en lugares cerrados, cubrirse la boca al toser o estornudar y permanecer en casa si presenta algún síntoma compatible con la enfermedad. Solo estas medidas en conjunto pueden frenar la transmisión del virus (213).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, sigue habiendo un gran desconocimiento en cómo le afecta las vacunas. Distintas líneas de evidencia señalan un papel importante de las células T en la protección y reducción de la gravedad de la enfermedad, y de las células

B en la adaptación de la inmunidad a las VOC (219). No obstante, siguen siendo necesarios más estudios que arrojen luz sobre este tema.

Se han desarrollado varias vacunas con distintos componentes: vacunas de virus inactivados, de virus vivos atenuados, de proteínas recombinantes, de vectores de virus (adenovirus o virus de la gripe), pero, sin duda, la tecnología más innovadora ha sido la del ARN mensajero (26).

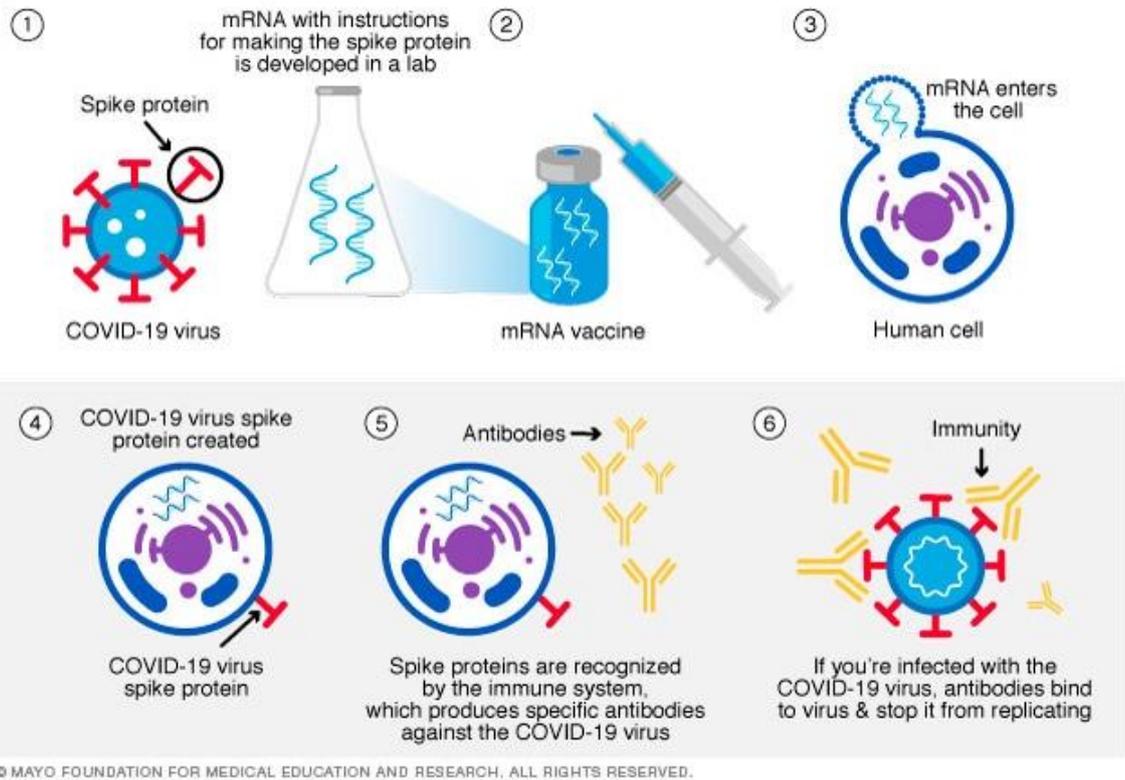
1.5.1 Desarrollo y tecnología

Vacuna de ARN mensajero (ARNm)

La mayoría de las vacunas se basan en la inoculación del microorganismo causante de la enfermedad que se quiere combatir atenuado o inactivado y, tradicionalmente, han sido las más usadas; sin embargo, no es la única forma de diseñar vacunas. Una de las primeras vacunas para la COVID-19 que salió al mercado basó su tecnología en el uso de ARN mensajero (220).

El ARN mensajero (ARNm) es una molécula diseñada para codificar una proteína de interés; en este caso, la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 (26,221). La proteína trimérica S, en la superficie del SARS-CoV-2, es clave en la entrada del virus en las células huésped, como ya se ha comentado previamente. Es por ello por lo que se considera el principal antígeno para el diseño de vacunas (26). El ARNm es, además, una molécula inestable, con carga negativa y propensa a ser degradada por nucleasas, por lo que se suele encapsular en un vehículo de administración para que entre en la célula diana. En este caso, se encapsula en nanopartículas lipídicas (26), que, además de facilitar la entrada en la célula huésped también favorecen la estabilidad de la vacuna durante su almacenamiento (73).

Esta vacuna para la COVID-19 se administra intramuscularmente (220), aunque esta tecnología está desarrollada para que también se pueda administrar por vía subcutánea en otras enfermedades (26). Una vez dentro del organismo, pueden estar implicadas tanto células inmunes (dendríticas, macrófagos o células en órganos linfoides periféricos) como no inmunes (musculares y epidérmicas) (26). En el caso de las vacunas para SARS-CoV-2, el ARNm traduce en los ribosomas un prototipo de proteína S del virus, pero inofensiva. Las células del organismo presentan esta proteína S en su superficie para que el sistema inmune la reconozca y active la producción de células inmunitarias humorales y celulares para combatir y eliminar el patógeno extraño (26,220). Esto permitirá que, cuando el organismo entre en contacto con el virus real, tenga una respuesta inmune mucho más rápida, acortando, así, el tiempo de permanencia del virus en el cuerpo y haciendo que los síntomas sean mucho más leves o, incluso, inexistentes (222). Una vez formados y presentados los fragmentos de proteína S, las células los eliminan. El ARNm no llega a introducirse en ningún momento en el núcleo de la célula huésped, donde se encuentra el ADN (223), por lo que no hay posibilidad de mutaciones. El hecho de que el virus esté menos tiempo de forma viable en las células huésped puede hacer que el contagio entre personas sea más leve o que el número de personas contagiadas sea menor que sin esa respuesta inmune rápida, aunque no evita el contagio (224).



Esquema 7. Funcionamiento de una vacuna de ARNm. Paso 1: virus SARS-CoV-2 y su proteína de la espícula y ARN mensajero (ARNm o *mRNA*) diseñado en el laboratorio con instrucciones para que se traduzca en la proteína de la espícula del virus. Paso 2: se inocula la vacuna de ARNm. Paso 3: el ARNm entra en la célula humana. Paso 4: se traduce la proteína espícula (S) a partir del ARNm. Paso 5: la proteína de la espícula es reconocida por el sistema inmune, el cual produce anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Paso 6: cuando la célula se vuelve a infectar con el virus, los anticuerpos lo bloquean y evitan que se replique (se genera la inmunidad) (223).

Estas vacunas se han dado a conocer a la población por primera vez en la pandemia de SARS-CoV-2, demostrando su gran éxito, pero arrastran una larga trayectoria de años de investigación y estudios preliminares. La molécula de ARNm fue descrita por primera vez por Brenner y sus colegas en 1961 (225), aunque no fue hasta 1969 cuando se consiguió traducir la primera proteína *in vitro* a partir de ARNm aislado debido a su alta inestabilidad. Después de años de

investigación, la FDA aprobó en agosto de 2018 el primer fármaco terapéutico de interferencia de ARN (*small interfering RNA* o siRNA), Onpattro® (Alnylam Pharmaceuticals Inc.) (26). Ahora, se ha planteado la aplicabilidad de estas vacunas en otras infecciones víricas como la rabia, la gripe, el ébola, el zika, el virus del dengue o el metapneumovirus humano, incluso para otras enfermedades no infecciosas como el cáncer, para las que se están llevando a cabo distintos ensayos clínicos (26). Las vacunas de ARNm han revolucionado el panorama actual por su corto proceso de investigación y desarrollo, por su sencilla producción y por su alta capacidad de activar el sistema inmune (26).

Las vacunas desarrolladas por las farmacéuticas Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Moderna (ARNm-1273) fueron las primeras usadas para la COVID-19 usando esta tecnología de ARNm (223) después de que numerosas agencias reguladoras de Estados Unidos, Reino Unido, Canadá y Hong Kong (China) aprobasen una autorización de uso de emergencia (26). El 23 de agosto de 2021, la de Pfizer-BioNTech fue la primera vacuna para la COVID-19 aprobada oficialmente para su comercialización por la FDA, y, meses después, la primera de la historia aprobada para su uso en niños de 5 a 11 años de edad (26). Estas vacunas de ARNm frente al SARS-CoV-2 han demostrado tener una mayor eficacia frente a las VOC que otro tipo de vacunas tanto en los ensayos clínicos como en los ensayos en vida real (202).

Vacunas de vectores virales

Las vacunas de vectores virales utilizan una versión modificada de un virus vector diferente al patógeno que se quiere combatir para transmitir instrucciones importantes a las células del huésped (220). Normalmente, ese virus suele ser adenovirus o poxvirus (179) y actúa de plataforma para transportar los fragmentos del virus patógeno que se desean replicar en la célula (226).

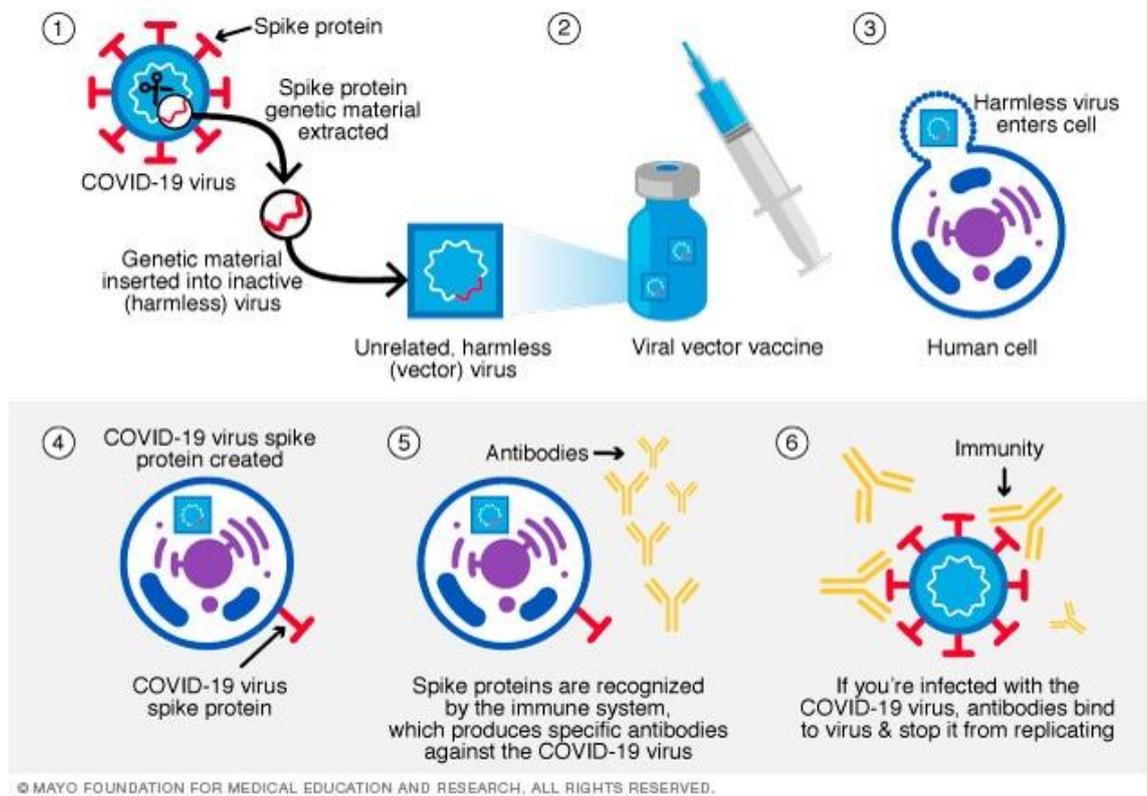
Se clasifican en dos tipos: sin replicación y con replicación. Las primeras entran en las células y producen los antígenos deseados, pero sin replicarse. Las

segundas sí que lo hacen y también pueden producir vectores virales infecciosos que desencadenen otra segunda inmunidad y, reforzar así, el sistema de defensa (179).

Esta tecnología se ha planteado como opción para algunas las enfermedades como el zika, la gripe o el VIH y ha sido empleada recientemente en algunos brotes de ébola (220). Además, también se ha estudiado su aplicación en terapia génica, como para el tratamiento de cáncer, o para la investigación en biología molecular (220).

Las vacunas de vectores virales desarrolladas para combatir la COVID-19 son de administración intramuscular. El virus vector que contiene la vacuna es uno diferente al SARS-CoV-2 que no produce infección de ningún tipo, y cuya función es otorgar instrucciones a las células musculares para que produzcan y hagan copias de un fragmento no infeccioso de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2. Una vez formado, descomponen el vector y lo eliminan. Posteriormente, estas células presentan ese fragmento formado de la proteína S en su superficie y el sistema inmune lo reconoce, provocando una cascada de activación de anticuerpos y otras células inmunitarias que combaten la “falsa infección”. Como cualquier vacuna, ante un segundo contacto con el virus, el sistema inmune actuará más rápida y eficazmente (220).

Las vacunas contra la COVID-19 desarrolladas, por un lado, por AstraZeneca y la Universidad de Oxford (ChAdOx1-S nCoV-19) y, por otro lado, por Janssen de Johnson & Johnson (Ad26.CoV2.S) se basan en esta tecnología.



Esquema 8. Funcionamiento de una vacuna de vector viral. Paso 1: se extrae material genético de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 y se introduce en un virus diferente e inocuo que actúa como vector. Paso 2: se inyecta la vacuna de vector viral. Paso 3: el vector entra en la célula huésped. Paso 4: se genera la proteína de la espícula a partir del material que portaba el virus vector. Paso 5: la proteína de la espícula es reconocida por el sistema inmune, el cual produce anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Paso 6: cuando la célula se vuelve a infectar con el virus, los anticuerpos lo bloquean y evitan que se replique (se genera la inmunidad) (223).

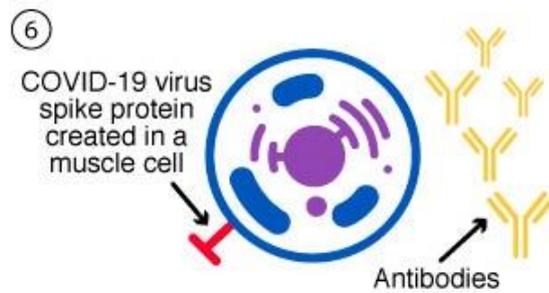
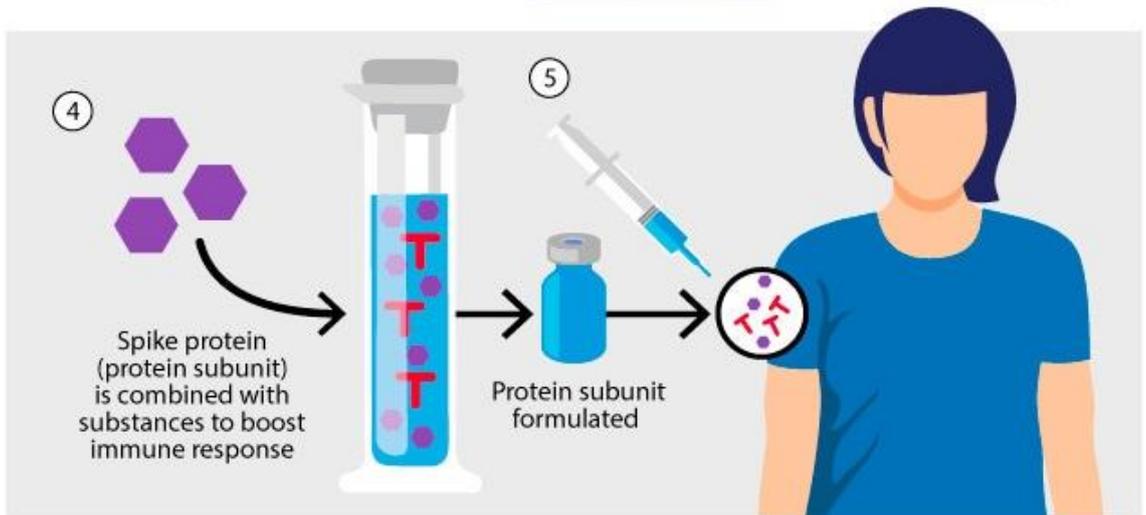
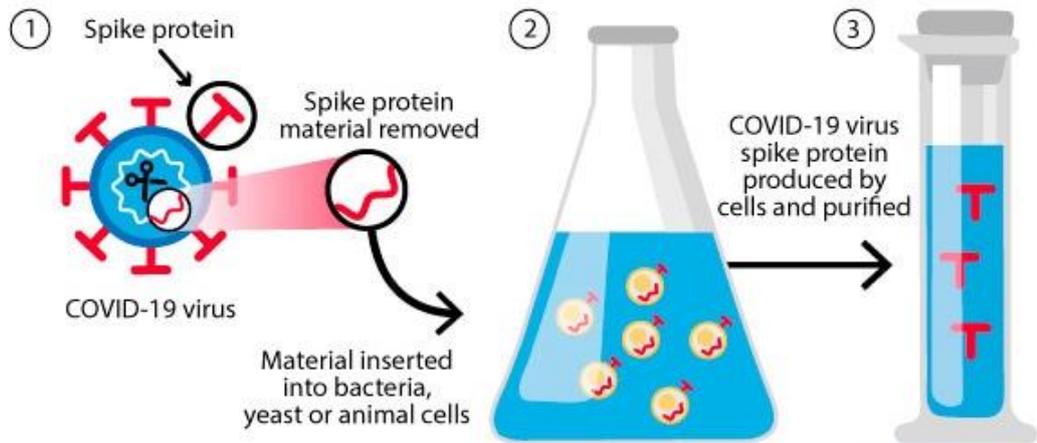
Vacunas de subunidades proteicas

Estas vacunas incluyen proteínas inocuas de la espícula del SARS-CoV-2 como elemento principal en la formulación (223). También cuentan con un adyuvante que facilita la activación del sistema inmunitario cuando se enfrenta a esa proteína S por primera vez para, ante un segundo contacto, actuar más rápida y eficazmente y frenar, así, la infección (220).

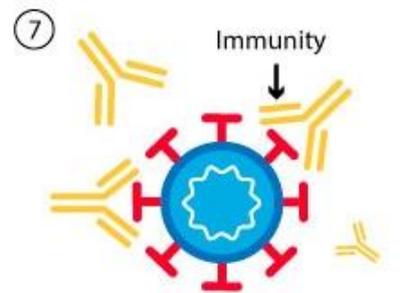
La administración de estas vacunas es intramuscular. Una vez en el organismo, las células del sistema inmune se activan frente a esas proteínas extrañas para intentar eliminarlas. El adyuvante, por su parte, refuerza esta acción para que se produzcan más anticuerpos y el organismo pueda combatir la infección (220).

Son vacunas más seguras que las que usan virus completos porque estas no llevan ningún elemento que pueda replicarse por sí solo. Sus principales problemas adversos pueden deberse al adyuvante, que es que potencia la inmunogenicidad de la vacuna (179).

Novavax es un laboratorio que ha desarrollado una vacuna basada en subunidades proteicas (NVX-CoV2373).



Spike proteins are recognized by the immune system, which produces specific antibodies against the COVID-19 virus



If you're infected with the COVID-19 virus, antibodies bind to virus & stop it from replicating

© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

Esquema 9. Funcionamiento de una vacuna de subunidades proteicas. Paso 1: se extrae material genético del virus SARS-CoV-2 que codifica para la proteína de la espícula. Paso 2: se inserta en bacterias, levaduras o células animales. Paso 3: en las células se produce la proteína de la espícula y se purifica. Paso 4: una

subunidad de la proteína de la espícula se combina con sustancias específicas para provocar una activación del sistema inmune. Paso 5: se formula la vacuna con subunidades proteicas y se inocula. Paso 6: se forma una proteína de la espícula en la célula muscular que es reconocida por el sistema inmune, el cual produce anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Paso 7: cuando la célula se vuelve a infectar con el virus, los anticuerpos lo bloquean y evitan que se replique (se genera la inmunidad) (223).

Vacunas inactivadas

La inactivación de un virus o bacteria para su aplicación en una vacuna se realiza mediante métodos químicos o físicos, bidireccional, y de inactivación o eliminación del virus o bacteria portador de la enfermedad. Los inactivadores pueden ser productos como peróxido de hidrógeno y psoralenos, radiación gamma, tratamiento UV, calor, formaldehído y β -propiolactona (179). Estos procesos requieren laboratorios especiales que cultiven de forma segura el virus a emplear, pero pueden producirse a gran escala, aunque llevan un tiempo relativamente largo y suele tener que administrarse en pautas de dos o tres dosis (226). Además, pueden provocar alguna reacción adversa como fiebre o los problemas asociados a las vacunas y los trastornos autoinmunes (179).

A día 1 de marzo de 2022, había 21 tipos de vacunas candidatas basadas en virus inactivado en fase de desarrollo clínico para la COVID-19 (179).

Vacunas atenuadas

Las vacunas basadas en virus vivos atenuados incluyen virus que se han cultivado en unas condiciones adversas específicas o que han sufrido procesos de recombinación, mutaciones (inserciones y deleciones, desoptimización de codones, etc.) todo ello para generar versiones debilitadas de virus vivos o virus muy parecidos que limiten el proceso de replicación. Desencadena una respuesta inmune similar a la infección natural, pero no produce enfermedad. Este modelo

de vacunas ha sido ampliamente implementado en enfermedades como el sarampión, las paperas y la rubéola (triple vírica) o la varicela y el herpes zóster (226). Sin embargo, pueden tener un efecto adverso indeseado, ya que, debido a que la inmunidad se va a ver algo alterada, durante un breve periodo de tiempo pueden provocar la activación o reactivación de enfermedades, como el herpes zóster. Estas vacunas no están recomendadas en personas inmunocomprometidas porque suelen provocar cierta inestabilidad genética y virulencia residual (179).

A fecha 1 de marzo de 2022, había 2 tipos de vacunas basadas en el virus vivo atenuado en fase de desarrollo clínico para su posterior evaluación (179).

1.5.2 Tipos de vacunas

A día 12 de enero de 2022, las vacunas aprobadas contra SARS-CoV-2 e incluidas en la lista de la OMS para su uso en emergencias fueron (213):

- BNT162b2, de Pfizer-BioNTech (aprobada el 31 de diciembre de 2020).
- ARNm-1273, de Moderna (aprobada el 30 de abril de 2021).
- ChAdOx1-S nCoV-19, de Oxford/AstraZeneca (aprobada el 16 de febrero de 2021).
- Ad26.CoV2.S, de Janssen (aprobada el 12 de marzo de 2021).
- CoronaVac, de Sinovac (aprobada el 1 de junio de 2021).
- NVX-CoV2373, de Novavax (aprobada el 17 de diciembre de 2021).
- BBIBP-CorV, de Sinopharm (aprobada el 7 de mayo de 2021).
- BBV152, de Bharat Biotech (aprobada el 3 de noviembre de 2021).

También se han desarrollado vacunas bivalentes que cuentan con protección frente a dos cepas distintas (227):

- BNT162b2 adaptada (Comirnaty® bivalente), de Pfizer-BioNTech.
- mRNA-1273.214 y mRNA-1273.222 (Spikevax® bivalentes), de Moderna.

BNT162b2 (Comirnaty®, de Pfizer-BioNTech)

La vacuna desarrollada por Pfizer-BioNTech, BNT162b2 o Comirnaty®, contiene un ARN mensajero (tozinamerán) que codifica una glicoproteína de la espícula de longitud completa con dos mutaciones de prolina en la subunidad S2, diseñada para mantener la proteína S en conformación de prefusión, la que induce una mayor respuesta de anticuerpos neutralizantes (26). La administración es por vía intramuscular en dos dosis de 30 µg separadas con un intervalo de 21 días (en el caso de pacientes inmunocomprometidos, se puede administrar una tercera dosis al menos 28 días después de la segunda dosis) y es recomendable administrar una tercera (o cuarta) dosis de refuerzo (*booster*) en mayores de 12 años al menos 3 meses después de haber recibido la última (228).

Los estudios llevados a cabo en pacientes de 16 años demostraron que la eficacia de la vacuna en la prevención de la infección por COVID-19 fue del 95% (221) y, durante los seis meses posteriores, del 91,3% (26). Además, su protección alcanza su máximo después de la segunda dosis y luego disminuye rápidamente su respuesta inmunitaria humoral. No obstante, en aquellos pacientes que habían recibido dosis de refuerzo, se vio que la protección otorgada por la vacuna era del 95,6% (26). En cuanto a la capacidad de neutralización, estudios que empleaban pseudovirus comprobaron que, tras dos dosis de BNT162b2, los títulos de neutralización fueron de 160, 7, 24 y 73 títulos medios geométricos (GMT) para la cepa salvaje del SARS-CoV-2 y las variantes Ómicron, Beta y Delta, respectivamente, aunque estos valores aumentaron hasta 368, 164, 279 y 413 GMT después de un mes tras la dosis de refuerzo, observándose tendencias bastante similares a las pruebas de neutralización con virus vivos. Con esto, se concluyó que una dosis de refuerzo con esta vacuna puede afianzar la neutralización contra la última variante de preocupación, Ómicron (26).

ARNm-1273 (Spikevax®, de Moderna)

Al igual que la de Pfizer-BioNTech, la vacuna desarrollada por Moderna, ARNm-1273, codifica la proteína S del SARS-CoV-2 de longitud completa en su conformación de prefusión. Esta fue la segunda vacuna de ARNm que obtuvo una EUA de la FDA estadounidense el 18 de diciembre de 2020 y una solicitud de licencia biológica (BLA) el 31 de enero de 2022 (26). Los resultados de los ensayos clínicos han demostrado que esta es una vacuna con alta tolerabilidad y seguridad en adolescentes y adultos, sin que se hayan constatado problemas graves de seguridad por el momento (la gran parte de los efectos no deseados fueron leves o moderados, siendo el más frecuente el dolor en el lugar de la inyección tras cada dosis y migrañas, fatiga, mialgias o escalofríos tras la administración de la segunda dosis (229)).

En un ensayo clínico de fase III, 30.420 participantes mayores de 18 años recibieron dos dosis de 100 µg de ARNm-1273 con un intervalo de 28 días entre cada una de ellas. Este ensayo concluyó que la eficacia de la vacuna fue del 94,1%, con respuestas inmunitarias similares entre los adolescentes de 12 a 17 años. En un estudio llevado a cabo en Qatar entre diciembre de 2020 y mayo de 2021, se vio que la eficacia de esta vacuna frente a las variantes Alfa y Beta después de dos dosis era de 100% y 96,4% respectivamente, mientras que disminuía a valores de 73,1% frente a la variante Delta (26). En cuanto a la variante Ómicron, estudios en vida real demostraron que la administración de 3 dosis de ARNm-1273 otorgaban una protección del 62,5%, menor que la observada en la variante Delta (95,2%). No obstante, tras el uso de esa tercera dosis de refuerzo ninguno de los vacunados fue hospitalizado, lo que arroja resultados favorables (26).

Tras el surgimiento de la variante Beta, se desarrollaron dos vacunas más que se unirían a la ARNm-1273 para actuar como vacunas de refuerzo, la ARNm-1273.351 y la ARNm-1273.211 (26). La dosis de refuerzo alcanzó niveles de neutralización frente a las variantes Beta, Gamma y Delta similares a los observados en la cepa salvaje. De las tres vacunas de refuerzo evaluadas, ARNm-

1273.211 fue la que indujo mayores títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las variantes anteriormente mencionadas (26).

Según los resultados de un estudio de casos y controles con prueba negativa que se llevó a cabo en Escocia, dos dosis de la vacuna ARNm-1273 mostraron una eficacia del 23,7% (IC₉₅: 4,4-39,4) en la prevención de la infección por la variante Ómicron, y una eficacia de 46,3% (IC 95%: 41,3-51,03) tras una tercera dosis de refuerzo (179).

A pesar de que la eficacia de las vacunas de ARNm contra el SARS-CoV-2 han demostrado disminuir su eficacia con el tiempo, siguen siendo eficaces frente a las variantes que van surgiendo y consiguen reducir las tasas de hospitalización y mortalidad, siendo ligeramente superior la vacuna ARNm-1273 en comparación con BNT162b2 (26).

ChAdOx1-S nCoV-19 (AZD1222 (Vaxzevria®) y SII (Covishield®), de Oxford/AstraZeneca)

Esta es una vacuna recombinante basada en vectores virales que se ha formulado con adenovirus de chimpancé (ChAd) no replicados (230).

Los datos en vida real de estudios llevados a cabo en Reino Unido demuestran una eficacia del 74% frente a la enfermedad sintomática por la variante Alfa, un 67% frente a la sintomática por Delta y un 91% frente a la hospitalización por esta última variante (230).

El estudio llevado a cabo por López Bernal et al. concluyó que la eficacia de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 disminuía notablemente en personas infectadas con la variante Delta tras una sola dosis (30,7% [IC₉₅: 25,2-35,7]) con respecto a los infectados con la variante Alfa (48,7 % [IC₉₅: 45,5-51,7]), con resultados bastante similares a los de la vacuna BNT162b2. Tras la segunda dosis, la eficacia de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 aumentó hasta el 67,0 % (IC₉₅: 61,3-71,8) entre los

infectados con la variante Delta y hasta un 74,5 % (IC₉₅: 68,4-79,4) entre los infectados con la variante Alfa (231).

En cuanto a la variante Ómicron, dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 otorgaron una protección limitada contra la enfermedad sintomática por Ómicron, de la misma manera que sucede con BNT162b2, pero una dosis de refuerzo aumentó notablemente esta protección, aunque disminuyó 5-9 semanas después (232). Según otros estudios, la protección frente a la enfermedad sintomática en pacientes adultos con la variante Ómicron llega hasta picos de 66,1 % (16,6-86,3 %) tras una dosis de refuerzo con ChAdOx1 nCoV-19 y del 68,5 % (65,7-71,2 %) tras la dosis de refuerzo con BNT162b2, y la protección contra la hospitalización alcanza el 82,3 % (64,2-91,3 %) y el 90,9 % (88,7-92,7 %) respectivamente. En el caso de la variante Delta, la protección frente a la hospitalización llega al 80,9 % (15,6-95,7 %) tras una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 y al 93,9 % (92,8 - 94,9 %) tras la de BNT162b2 (233).

Además, los estudios preclínicos demostraron que podía inducir respuesta celular rápida mediada por células T de tipo 1 y 2 en ratones y monos Rhesus (179).

Como reacciones adversas, se notificaron fatiga, dolor de cabeza, fiebre, mialgia (179) y episodios tromboembólicos venosos, como la trombosis venosa cerebral, desencadenados por el síndrome de trombocitopenia inmunitaria protrombótica inducida por vacuna (VIPIT) (157).

Ad26.CoV2.S (Jcovden®), de Janssen (Johnson & Johnson)

La vacuna Ad26.COVID.2.S se basa en el uso de un vector de adenovirus humano tipo 26 recombinante (234) no replicante (235).

En un ensayo de fase III internacional, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, se administró esta vacuna a 19.630 participantes y placebo a 19.691. Los resultados fueron que una dosis de Ad26.CoV2.S protegió contra la enfermedad

moderada a grave-crítica con una eficacia del 66,9% a los 14 días y del 66,1 % a los 28 días de ser administrada, un poco mayor en el caso de la enfermedad grave-crítica (234).

Los resultados de un estudio de casos y controles con prueba negativa llevado a cabo en Sudáfrica demostraron que una dosis de refuerzo de Ad26.CoV2.S suponía una eficacia de un 63% (IC₉₅: 31-81) contra la hospitalización por la variante Ómicron después de 14 días. En República Checa, otro estudio demostró que la eficacia era del 47% (IC₉₅: 45-49) después de 14 días o más tras la administración (179).

Como reacciones adversas que se notificaron, la más frecuente fue dolor seguida de eritema e hinchazón en el lugar de la inyección, y reacciones adversas sistémicas como cefalea, fatiga, mialgia, náuseas y fiebre. La duración media fue de 48 horas postvacunación. No obstante, la FDA también notificó otras más graves como embolia, artritis y neuropatía periférica que se vieron 28 días postvacunación (179). Los efectos secundarios más grave que se observaron con esta vacuna fueron, al igual que con la vacuna ChAdOx1-S nCoV-19, los tromboembólicos venosos, incluida la trombosis venosa cerebral, ocasionados por el síndrome de VIPIT (157).

CoronaVac® (de Sinovac)

La vacuna CoronaVac ha sido desarrollada por Sinovac Research and Development Co., Ltd. y es un ejemplo de vacuna basada en subunidades proteicas. Su administración es, normalmente, intramuscular y, como ya se ha mencionado de este tipo de vacunas, precisa de una proteína del virus y un adyuvante para desencadenar una respuesta inmunitaria.

Según un estudio de cohortes retrospectivo llevado a cabo en Chile, la eficacia de Sinovac fue del 37,9% (IC₉₅: 36,1-39,6) frente a la infección por la variante Ómicron en niños de 3-5 años 14 días o más de la segunda dosis (179).

Como reacciones adversas, la más frecuente fue dolor en el lugar de la inyección, que cesó a las 48 horas de la administración. Es de destacar que la aparición de fiebre tras la vacunación con Sinovac fue menor que con otras vacunas frente a la COVID-19. Se notificó un caso de urticaria 48 h después de la primera dosis que se consideró posiblemente relacionado con la vacunación durante la fase I. No se desarrollaron reacciones adversas graves en dosis posteriores (179).

NVX-CoV2373 (Nuvaxoid® (en Europa) y Covovax® (en India), de Novavax) (236)

Es una vacuna de proteína recombinante desarrollada por el laboratorio Novavax que ha demostrado tener un éxito comparable con las vacunas de ARNm, aunque todavía, la información sobre su seguridad y eficacia es limitada (237).

Se administran dos dosis con una diferencia de 3-8 semanas, y se adquiere una inmunidad adecuada 14 días después de la segunda dosis. No se recomienda ninguna dosis de refuerzo, ni para inmunocompetentes ni para inmunodeprimidos (237,238).

En el estudio publicado por Bhiman et al. demuestran la variante Ómicron se escapa a la neutralización 16 veces más que la cepa salvaje tras la vacunación. En concreto, tras dos dosis, los sublinjaes BA.1 y BA.4/BA.5 de la variante Ómicron fueron resistentes a la neutralización en el 72 % (21 casos de 29) y el 59 % (17 casos de 29) de las muestras, respectivamente. No obstante, tras una tercera dosis, los títulos subieron a 1197 GMT y 582 GMT respectivamente, con respuestas similares a las obtenidas con vacunas de ARNm (239).

Además, dos dosis de la vacuna inducen una respuesta firme de células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria en el 100 % y el 65 % de las personas, respectivamente (239).

En cuanto a las reacciones adversas, esta vacuna se ha asociado con el riesgo de desarrollar miocarditis o pericarditis en varones jóvenes de 12 a 39 años después de la vacunación, aunque, teniendo en cuenta que la COVID-19 causa eventos adversos con mayor probabilidad, se considera una vacuna segura (237).

BBIBP-CorV (de Sinopharm)

Es una vacuna de virus inactivados fabricada por el laboratorio Sinopharm y aprobada por la OMS en numerosos países para su uso contra la COVID-19.

Como ya se ha visto, la variante Ómicron suscita grandes preocupaciones debido a las mutaciones que le permiten escaparse de la inmunidad y propagarse rápidamente. Aunque siguen faltando estudios que describan la capacidad de neutralización de las vacunas frente a esta variante, hay un estudio en el que se estudió la inmunogenicidad de los pacientes con COVID-19 a los que se les separó en dos grupos y a unos se les administró como refuerzo la vacuna BBIBP-CorV frente a pseudovirus de las variantes Beta, Delta y Ómicron. Los resultados fueron que a los 14 días postvacunación, el título del test de neutralización de estos pseudovirus aumentó hasta 67,4 GMT frente a la cepa salvaje, 8,85 frente a Beta y 35,07 frente a Delta, mientras que la actividad de neutralización frente a Ómicron se situó por debajo del límite inferior de cuantificación en el 80% de las muestras (240).

Los efectos adversos observados con esta vacuna fueron de grado 1 o 2 a la semana de la vacunación. No se informó ninguno de grado 3 o superior. El más frecuente fue el dolor, seguido de mialgias, cefaleas y fatiga. Igual sucedió tras la dosis de refuerzo (241).

BBV152 (Covaxin®, de Bharat Biotech)

Es una vacuna inactivada por el virión completo formulada con una molécula agonista del receptor tipo Toll 7/8 adsorbida en alumbre (Algel-IMDG) (242) desarrollada por el laboratorio Bharat Biotech (243).

Al evaluar la persistencia de la inmunogenicidad de esta vacuna 6 meses después de la administración de dos o tres dosis en un estudio de fase II, doble ciego, aleatorizado y controlado, se comprobó que, tanto la inmunidad humoral como la celular permanecían hasta 12 meses postvacunación, aunque con unos títulos de anticuerpos menores. Una tercera dosis de refuerzo aumentó los títulos de neutralización frente a todas las VOC, incluida la Ómicron, con un leve aumento de la respuesta de células B de memoria (242).

No se observaron efectos adversos graves, excepto dolor en el lugar de la inyección, picor y enrojecimiento. Por lo tanto, estos resultados indican que una dosis de refuerzo de BBV152 es segura y necesaria para asegurar una inmunidad persistente y minimizar las infecciones de COVID-19 debidas a las nuevas variantes emergentes (242).

Vacunas bivalentes

Estas nuevas formulaciones se basan en vacunas de ARNm con cantidades iguales de dos cadenas de ARNm, una que codifica para la cepa salvaje igual que las incluidas en las vacunas monovalentes y otra para la variante de SARS-CoV-2 que se requiera en cada momento. En el momento actual, la segunda hebra de ARNm codifica para los sublinajes circulantes de la variante Ómicron (244).

En agosto de 2022, los CDC recomendaron la vacunación de refuerzo contra el SARS-CoV-2 con las vacunas bivalentes antes que con las monovalentes en pacientes mayores de 11 años 2 meses o más después de haber completado la primera pauta de vacunación con la vacuna monovalente (245). La FDA ha emitido

un comunicado en el que deja en claro que las formulaciones bivalentes no están autorizadas para la inmunización primaria y, por su parte, las vacunas monovalentes Pfizer y Moderna COVID-19 ya no están autorizadas para su uso como dosis de refuerzo en personas de 12 años o mayores (244).

Los efectos adversos observados en estas vacunas son similares a los observados en las vacunas monovalentes (244), pero parecen ser menos comunes y de menor gravedad (245).

Pfizer-BioNTech y Moderna son los dos laboratorios que han desarrollado vacunas bivalentes a partir de sus vacunas de ARN mensajero.

BNT162b2 adaptada (Comirnaty® original/Ómicron BA.1 y Comirnaty® original/BA.4-5, de Pfizer-BioNTech)

Esta es una vacuna ARNm bivalente producida por Pfizer-BioNTech que codifica para la cepa salvaje y Ómicron BA.1 o BA.4/BA.5 (246). Contiene dos principios activos en igual proporción: tozinamerán y riltozinamerán (bivalente BA.1) (247) o famtozinamerán (bivalente BA.4/BA.5) (248).

Se desarrolló un estudio que incluyó a 55 participantes que habían recibido previamente 3 dosis de BNT162b2 (pauta primaria y dosis de refuerzo), demostró que la respuesta inmunitaria frente al sublinaje BA.1 de la variante Ómicron eran mayor después de una segunda dosis de refuerzo con la vacuna bivalente Comirnaty original/Ómicron BA.1 que después de un segundo refuerzo con la vacuna Comirnaty original sola (monovalente). Además, la respuesta inmunitaria a la cepa salvaje del SARS-CoV-2 fue comparable con ambos casos. Un tercer estudio demostró que los pacientes que habían recibido la dosis de refuerzo con la vacuna monovalente BA.1 adaptada desarrollaron una mayor respuesta inmune frente a este sublinaje que aquellos cuya dosis de refuerzo había sido BNT162b2 original (249).

En otro estudio en el que participaron 104 participantes, 40 (38,5 %) de ellos recibieron una cuarta dosis de refuerzo con ARNm de BNT162b2 monovalente y 64 (61,5 %), con BNT162b2 bivalente con la cepa salvaje y Ómicron BA.4/5. La tasa de reacciones adversas tras la segunda dosis de refuerzo fue significativamente mayor entre los participantes que recibieron la vacuna bivalente (87,5 % [IC₉₅: 77,2–93,5]) en comparación con los del grupo que recibieron la vacuna monovalente (52,5 % [IC₉₅: 37,5–67,1]) (246). Las vacunas BNT162b2 monovalente adaptada a Ómicron BA.1 y la bivalente (BNT162b2 + monovalente BA.1) inducen respuestas neutralizantes frente a la cepa salvaje y BA.1, BA.4/BA.5 y, en menor medida, frente a BA.2.75 (250). Además, el perfil de seguridad de las bivalentes y las monovalentes adaptadas a BA.1 o BA.4/BA.5 fue bastante similar a la vacuna BNT162b2 original (250), aunque los efectos adversos fueron un poco más notables en el uso de las bivalentes que con la monovalente (246), pero en ningún caso hubo mayor riesgo de hospitalización (251).

mRNA-1273.214 y mRNA-1273.222 (Spikevax® bivalente, de Moderna)

Esta es una vacuna ARNm bivalente producida por Moderna que codifica para la cepa salvaje y Ómicron BA.1 (mRNA-1273.214) u Ómicron BA.4/BA.5 (mRNA-1273.222) (252).

Las vacunas bivalentes suponen una estrategia más para la lucha contra el SARS-CoV-2 al aumentar en gran medida los anticuerpos neutralizantes tanto de variantes pasadas como las actuales o futuras. Además, la administración de estas vacunas como refuerzo después del uso de las monovalentes supone una mayor inducción de la respuesta inmune que si el refuerzo se hace con la misma monovalente. Ya constan estudios previos con la vacuna mRNA-1273.211 que codifica las proteínas de la espícula de la cepa salvaje y de la variante Beta (B.1.351). Tras una dosis de refuerzo, esta vacuna provocó niveles de anticuerpos neutralizantes más altos que los conseguidos con la vacuna monovalente, no solo contra Beta, sino también contra Delta y Ómicron BA.1. De igual forma, datos

provisionales del refuerzo con la vacuna bivalente ARNm-1273.214 dirigida contra la cepa salvaje y el sublinaje de Ómicron BA.1 demostraron que esta vacuna indujo respuestas de anticuerpos neutralizantes más altas contra BA.1, BA.2 y BA.4/5 que el uso de la vacuna monovalente ARNm-1273 como refuerzo (252).

En un estudio llevado a cabo por el Dr. Spyros Chalkias et al., tras una primera dosis de mRNA-1273, 437 participantes recibieron la segunda dosis de refuerzo de mRNA-1273.214 y 377, de la vacuna mRNA-1273, todos ellos sin infección previa. Los títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes fueron de 2.372,4 (IC₉₅: 2.070,6-2.718,2) en los pacientes del primer grupo y 1.473,5 (IC₉₅: 1.270,8-1.708,4) en el segundo frente al sublinaje BA.1 y 727,4 (IC₉₅: 632,8-836,1) y 492,1 (IC₉₅: 431,1-561,9) respectivamente frente a los sublinajes BA. 4 y BA.5 (BA.4/5). Este mayor título de anticuerpos neutralizantes después de una dosis de refuerzo con la vacuna mRNA-1273.214 frente al uso de mRNA-1273 también se observó frente a otras variantes (Alfa, Beta, Gamma, Delta) (253). Y, de igual manera, se vio con la mRNA-1273.222 (252).

Ambas vacunas fueron igual de seguras que la monovalente (253).

La OMS ha recogido un listado con las vacunas desarrolladas para el SARS-CoV-2 donde se incluyen las características tanto de las finalmente aprobadas como de las que no lo fueron (254).

Vacuna esterilizante

En España, el equipo del doctor Luis Enjuanes, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha estado trabajando en el diseño de una vacuna esterilizante de administración intranasal.

Esta vacuna se basa en el uso de un replicón de ARN. Un replicón es una copia del ARN viral del que se han eliminado algunos genes; como consecuencia, se

obtiene una versión atenuada del virus y con baja capacidad de propagación, lo que le hace ser una opción segura y altamente inmunizante (255). El prototipo se ha realizado con el MERS-CoV, del que se ha obtenido un replicón de la eliminación del gen de la envoltura (E). De aquí, se ha conseguido un virus atenuado y se ha evitado su propagación, además de la incorporación de marcos de lectura abiertos (ORF) 3, 4A, 4B y 5. En los ensayos preclínicos, este replicón de ARN provocó una inmunidad esterilizante en ratones tras la infección con una dosis letal de MERS-CoV, en los que no se observaron daños histopatológicos ni virus infecciosos en los pulmones. Además, tras la inmunización con esta vacuna, los anticuerpos neutralizantes aumentaron en gran medida, lo que puede significar que estas vacunas son eficaces y muy seguras (256).

La particularidad con el resto de vacunas de ARN es que esta sería autoamplificable, lo que conllevaría que el propio sistema podría multiplicar entre 1.000 y 5.000 veces la dosis inicial de ARN administrada, con lo que esta podría ser mucho menor al inicio. Además, utiliza varios antígenos (el gen S, el gen N y otros) del propio virus para inmunizar, con lo que la estimulación del sistema inmune sería mayor y, al ser de administración nasal, la protección en las mucosas es mucho mayor que con las vacunas de administración intramuscular. Se cree que la inmunidad por esta vacuna nasal sería de 1-3 años. (257). Aunque el estudio se haya hecho con el MERS-CoV, se está trabajando para que esta tecnología sea extrapolable al SARS-CoV-2 y se consiga detener por completo su propagación.

***PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS***

PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Desde finales de 2019 el mundo ha vivido una situación con pocos precedentes. La pandemia provocada por el SARS-CoV-2 ha supuesto un desafío donde se han puesto en marcha medidas drásticas como restricciones, cambios en los hábitos higiénicos y en el comportamiento social. Pero no solo a nivel individual, sino que, en los hospitales, centros de salud o residencias esto ha provocado una gran saturación de camas, material, y recursos con el fin de poder frenar la propagación y el aumento de las tasas de contagio y morbi-mortalidad por COVID-19. En un gran despliegue de medios, se han empleado recursos humanos, científicos e industriales para contener esta pandemia que, al momento de la elaboración de esta tesis, parecen tener su efecto positivo. Las agencias de medicamentos de los grandes países han aprobado tratamientos ya conocidos para otras enfermedades con la esperanza de que fuesen eficaces también para la COVID-19. Y se han elaborado a contrarreloj vacunas contra el virus con algunas tecnologías ya conocidas, otras novedosas y otras, con un futuro esperanzador.

Esta tesis pretende ser un trabajo que recoja la información más relevante respecto al patógeno causante de esta pandemia, el SARS-CoV-2, incluyendo métodos diagnósticos, los tratamientos aprobados y comercializados, la respuesta inmunitaria inducida por el virus y las vacunas desarrolladas para frenar la propagación. Y con el objetivo de añadir evidencia sobre la situación de la respuesta inmunitaria en pacientes ingresados en nuestro país y la capacidad de eliminación del virus por efecto de las vacunas, la tesis se dividirá en dos capítulos acorde con los siguientes objetivos:

1. La capacidad de respuesta inmune de pacientes ingresados en distintos centros de España con diagnóstico de COVID-19 en la primera ola de la pandemia. Este objetivo se desarrollará en el capítulo 1.
2. La capacidad neutralizante de los anticuerpos generados en trabajadores de la salud en un centro de Granada (Andalucía, España) tras la vacunación frente a

diferentes variantes de SARS-CoV-2 sin haber estado previamente expuestos al virus. Este objetivo se desarrollará en el capítulo 2.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Respuesta de anticuerpos en pacientes ingresados en el hospital con sospecha de infección por SARS-CoV-2: resultados de un estudio multicéntrico en España.

1.1. CONTEXO HISTÓRICO

La pandemia de SARS-CoV-2 empezó en diciembre de 2019. La secuencia genómica de la cepa salvaje inicial causante de los primeros casos se estableció como secuencia base. En seguida fueron apareciendo las primeras mutaciones en el virus que dieron lugar a nuevas variantes (como la B.1), aunque sin especial interés epidemiológico. Pronto surgió una variante nueva que sería la primera catalogada como variante de preocupación: la B.1.1.7 (Alfa). Esta nueva variante desplazó a las anteriores y consiguió establecerse como variante circulante mayoritaria, lo que supuso el inicio de la primera ola de contagios, que duró desde enero hasta junio de 2020 en España (258).

La recogida de muestras para el estudio del desarrollo de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 recogido en este capítulo se hizo entre abril y julio de 2020, con lo que, en ese momento, se desconocía el desarrollo de anticuerpos frente al virus y su permanencia en el tiempo.

1.2. OBJETIVOS

Los objetivos principales fueron:

- Caracterizar la inducción de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en el tiempo en pacientes ingresados con diagnóstico de COVID-19 en distintos centros de España durante la primera ola de la pandemia.
- Determinar la producción de anticuerpos en estos pacientes en función de la edad y el sexo.

1.3. MATERIAL Y MÉTODOS

1.3.1 Pacientes

Para el estudio se incluyeron a mil doscientos treinta y seis pacientes ingresados con diagnóstico de COVID-19 entre abril y julio de 2020, durante la primera ola de la pandemia, en 18 hospitales públicos y privados de España (Clínica Universitaria de Navarra, Complejo Asistencial Universitario de León, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Complejo Hospitalario de Jaén, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Ramón y Cajal, Hospital San Pedro, Hospital Universitario Clínico San Cecilio, Hospital Universitario de Burgos, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Hospital Universitario Virgen del Rocío). Solo en 866 casos se conocía el sexo (513 eran hombres y 353 mujeres), y en 1.066 se contaba con la edad, con una media de 64 años. En todos los casos se confirmó la infección por SARS-CoV-2 mediante RT-PCR.

1.3.2 Muestras de suero

Se recogieron muestras de suero en tubos el mismo día o después de tener el resultado positivo de la RT-PCR para SARS-CoV-2, dependiendo de las necesidades clínicas en los cuidados y manejos del paciente (tabla 10).

Se obtuvieron muestras individuales de 1.054 pacientes y múltiples de los 183 restantes (consiguiendo 413 muestras), sumando, en total, 1.467 muestras. En el caso concreto de 43 pacientes, se recogieron dos muestras: la primera 4 días antes de la PCR y la segunda, 7-17 días después.

1.3.3 ELISA

Las determinaciones se realizaron mediante pruebas de ELISA anti-SARS-CoV-2 IgM + IgA y anti-SARS-CoV-2 IgG (Vircell S.L., España) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos ensayos, los pocillos de reacción fueron recubiertos con proteínas de la nucleocápside y proteínas de la espícula. Todas las muestras de suero obtenidas de los pacientes fueron inactivadas previamente a 56 °C en un termobloque durante 30 minutos. La determinación de anticuerpos se llevó a cabo inmediatamente después de la inactivación. En los casos en los que esto no fue posible se almacenaron a 4 °C durante no más de 4 días antes de la realización de la prueba. Según el fabricante, la especificidad declarada para los ensayos IgM + IgA e IgG era del 98,9% y del 98,2%, respectivamente, basada en estudios realizados en poblaciones pre pandémicas. Los dos ensayos ELISA eran cualitativos y hay que destacar que el que detectaba IgM + IgA no diferenciaba entre ambas inmunoglobulinas.

1.3.4 RT-PCR

La determinación de la presencia o ausencia de SARS-CoV-2 se realizó mediante RT-PCR, según la técnica comercial empleada durante el período de estudio en cada uno de los centros participantes. Las muestras recolectadas fueron exudados nasos y orofaríngeos recogidos mediante hisopos flocados y enviados al laboratorio de Microbiología en medio de transporte universal (UTM) o para virus (VTM), a partir de los cuales se llevó a cabo la extracción del ácido nucleico a través de distintos ensayos comerciales aprobados y con marcado CE.

1.3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa R versión 3.6.3 (2020-02-29) " *Holding the Windsock* " Copyright (C) 2020 *The R Foundation for Statistical*

Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64 bits). Los resultados dudosos se interpretaron principalmente como negativos. Para calcular los valores p se usó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Las gráficas usadas para representar los datos fueron diagramas de caja y bigotes, con cajas que abarcaban el 90 % de los datos y bigotes que presentaban los percentiles del 95 % y 5 %.

1.4. RESULTADOS

1.4.1 Cinética de anticuerpos anti-SARS-CoV-2

La tabla 10 recoge los resultados de las 1.467 muestras de suero recogidas de pacientes con SARS-CoV-2 confirmado mediante PCR referidos a la fecha de recogida con respecto al primer resultado positivo de PCR del paciente. En el día 0, IgM + IgA demostraron una mayor reactividad, detectándose en 154 muestras (47,2 %) con respecto a IgG, que solo se detectó en 135 muestras (41,4 %) y con la detección de algún marcador serológico (IgM + IgA y/o IgG) en 187 muestras (57,4 %). Esta mayor reactividad de IgM + IgA con respecto a IgG solo tuvo significación estadística el día 1 ($p = 0,016$), cuando se detectó en el 49,7 % de las muestras frente al 40,4 % en las que solo se detectó IgG. La mayor reactividad de IgM + IgA se observó durante los primeros 16 días en el 84 % de las muestras, mientras que, en el caso de IgG, el 74 % de las muestras fueron positivas con solo esta inmunoglobulina durante los 7 días siguientes a la PCR. Tras la tercera semana, ambas detecciones alcanzaron proporciones similares. No obstante, IgG fue más prevalente en las muestras que se recogieron un mes tras la PCR.

El patrón IgM + IgA e IgG positivas juntas fue el más observado en el día 0 en el 36,5 % de las muestras, posteriormente lo fue IgM + IgA positivas solo en un 11,7 % de las muestras y, por último, lo menos observado fue IgG positiva, que lo hizo en un 5,8 % de las muestras. En todos los intervalos de tiempo se vio que, cuando solo se detectaba un único marcador positivo, IgM + IgA lo hacía con mayor frecuencia que IgG.

Día de la muestra ^a	Total nº sueros	IgG (%)	IgM + IgA (%)	IgM + IgA y/o IgG (%)	Solo IgG positiva (%)	Solo IgM + IgA positivas (%)	IgM + IgA e IgG positivas (%)	IgM + IgA e IgG negativas (%)
0	326	135 (41.4)	154 (47.2)	187 (57.4)	19 (5.8)	38 (11.7)	116 (35.6)	153 (46.9)
1	332	134 (40.4)	165 (49.7) ^b	180 (54.2)	21 (6.3)	52 (15.7)	113 (34.0)	146 (44.0)
2	154	83 (53.9)	98 (63.6)	95 (61.7)	6 (3.9)	21 (13.6)	77 (50.0)	50 (32.5)
3	106	61 (57.5)	68 (64.2)	69 (65.1)	8 (7.5)	15 (14.2)	53 (50.0)	30 (28.3)
4	111	79 (71.2)	89 (80.2)	92 (82.9)	7 (6.3)	17 (15.3)	72 (64.9)	15 (13.5)
5	51	40 (78.4)	42 (82.4)	39 (76.5)	2 (3.9)	4 (7.8)	38 (74.5)	7 (13.7)
6	53	34 (64.2)	38 (71.7)	38 (71.7)	1 (1.9)	5 (9.4)	33 (62.3)	14 (26.4)
7	50	37 (74.0)	42 (84.0)	41 (82.0)	1 (2.0)	6 (12.0)	36 (72.0)	7 (14.0)
8	42	26 (61.9)	33 (78.6)	32 (76.2)	1 (2.4)	8 (19.0)	25 (59.5)	8 (19.0)
9	30	20 (66.7)	23 (76.7)	23 (76.7)	1 (3.3)	4 (13.3)	19 (63.3)	6 (20.0)
10–16	129	114 (88.4)	119 (92.2)	118 (91.5)	2 (1.6)	7 (5.4)	112 (86.8)	8 (6.2)
17–23	40	36 (90.0)	36 (90.0)	38 (95.0)	1 (2.5)	1 (2.5)	35 (87.5)	3 (7.5)
24–30	16	16 (100)	16 (100)	16 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (100)	0 (0.0)
> 30	26	24 (92.3)	20 (76.9)	24 (92.3)	4 (15.4)	0 (0.0)	20 (76.9)	2 (7.7)

^a Días después del primer resultado positivo de PCR.

^b $p = 0,016$ comparada con IgG (las demás comparaciones no obtuvieron una significación estadística).

Tabla 10. Resultados positivos de IgG e IgM + IgA en 1.467 muestras de suero de pacientes positivos para SARS-CoV-2 mediante PCR. Los resultados se expresan como frecuencias absolutas (porcentaje indicado entre paréntesis) de muestras positivas en cada parámetro o en ambos parámetros al mismo tiempo.

Con los resultados obtenidos, se pudo elaborar la gráfica recogida en la figura 12. Aquí, se puede observar la evolución de IgM + IgA e IgG a lo largo del periodo del estudio. El porcentaje de casos positivos para IgM + IgA fue mayor hasta el día 24, momento en el que ambos parámetros se igualaron.

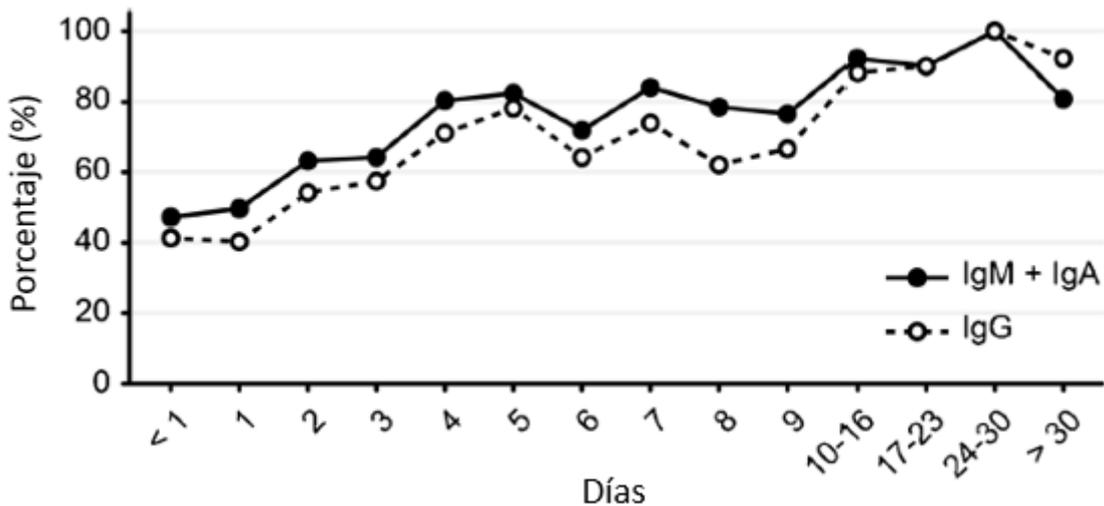


Figura 12. Tendencia dinámica de la tasa de positividad para IgM + IgA e IgG en sueros de pacientes positivos para SARS-CoV-2 detectado por RT-PCR.

Para llegar a entender mejor la cinética de la respuesta de anticuerpos, se estudió la seroconversión en el caso de 43 pacientes de los que se habían recogido dos muestras, la primera 4 días como máximo después del resultado de la PCR y la segunda, a los 7-17 días post PCR. Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla 11. Se detectó IgG en 15 muestras (34,9 %) en el primer intervalo de tiempo (T1, 0-4 días), mientras que IgM + IgA se detectó en 23 (53,5 %) en el mismo periodo. En cuanto al segundo periodo (T2, 7-17 días), IgG se detectó en 35 muestras (81,4 %) e IgM + IgA, en 40 (93,02 %). De los 43 pacientes, 20 (46,51 %) seroconvirtieron para IgG y 19 (44,19 %) para IgM + IgA, mientras que 2 (4,65 %) no mostraron seroconversión. Las medias de los índices fueron de 1,97 para IgG y 2,55 para IgM + IgA en las muestras recogidas durante la fase de infección aguda y de 3,04 para IgG y 3,15 para IgM + IgA en las muestras recogidas durante la fase de convalecencia.

Parámetro serológico	Nº sueros positivos (%)	
	T1 (0-4 días)	T2 (7-17 días)
IgG	15 (34.9)	35 (81.4)
IgM + IgA	23 (53.5)	40 (93.0)
IgM + IgA e IgG positivas	15 (34.9)	34 (79.1)
IgG positiva	1 (2.3)	1 (2.3)
IgM + IgA positiva	8 (18.6)	6 (14.0)
IgM + IgA e IgG negativas	19 (44.2)	2 (4.7)

T1: momento de recogida del primer suero. T2: momento de recogida del segundo suero.

Tabla 11. Tasas positivas de detección de IgA + IgM e IgG en sueros de pacientes de los que se disponía de dos muestras obtenidas en momentos diferentes. Los intervalos de tiempo fueron de 0-4 días tras la PCR para la primera recogida de suero y de 7-17 días tras la PCR para la segunda recogida de suero.

1.4.2 Edad y sexo en la respuesta de Ac frente a SARS-CoV-2

Los pacientes que tuvieron un resultado positivo para la PCR de SARS-CoV-2 se clasificaron en cuatro grupos según los resultados de las pruebas serológicas: solo IgG positiva, solo IgM + IgA positivas, positivas o negativas ambas pruebas. En la figura 13a se muestra la distribución de los resultados serológicos por grupos de edad correspondientes a los 1.066 pacientes de los que se conocía la edad. La proporción de pacientes con las dos pruebas serológicas negativas aumentó con la edad del paciente. Cuando estos resultados se analizaron según el tiempo transcurrido entre la PCR y la recogida de suero (figuras 13b y 13c), este efecto también se observó en las muestras recogidas poco después del primer diagnóstico por PCR, mientras que la mayoría de las muestras recogidas en la segunda semana tras la PCR mostraron respuestas serológicas

positivas en todos los grupos de edad. En la figura 14 se pueden ver las diferencias en los resultados serológicos por edad y el sexo. No se observaron diferencias significativas en general entre hombres y mujeres ni para IgM + IgA ni para IgG. Sí se observaron diferencias entre sexos para algunos grupos de edad, pero no se observó una tendencia clara que apoyara una mayor respuesta serológica de los hombres frente a las mujeres, y este resultado puede reflejar diferencias en el tamaño de las poblaciones.

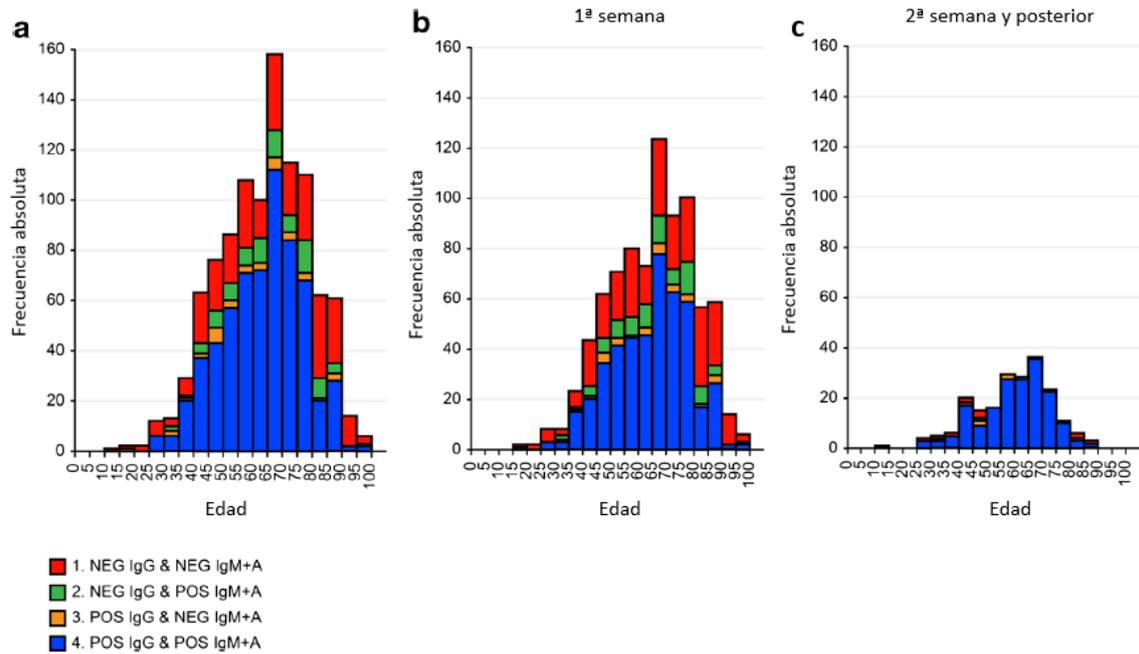


Figura 13. Resultados de las pruebas serológicas de los pacientes con PCR positiva agrupados por edad. Las alturas de las barras representan frecuencias absolutas. **a)** Datos de todos los pacientes positivos a la PCR, **b)** resultados correspondientes a muestras recogidas en la primera semana tras el primer resultado de la PCR, y **c)** resultados correspondientes a muestras recogidas más tarde de una semana tras el primer resultado de la PCR.

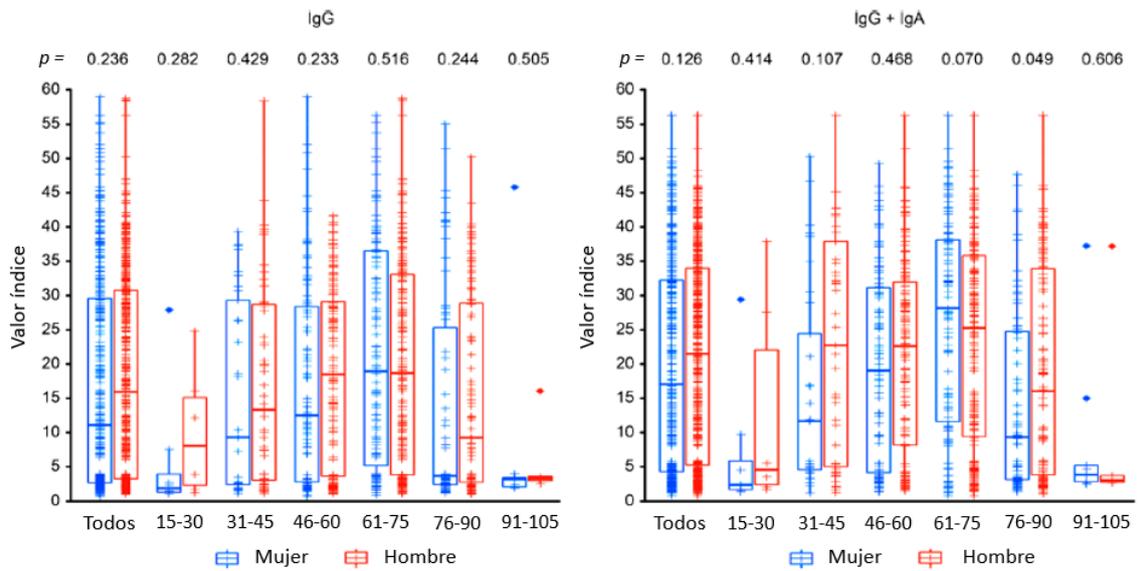


Figura 14. Diagrama de cajas y bigotes. En el eje de las X, los pacientes con PCR positiva, distinguiendo entre mujeres y hombres y agrupados por edad. En el eje de las Y, el valor del índice de IgG e IgM + IgA (10 X suero/corte). Las cajas abarcan el 90 % de los datos y los bigotes presentan los percentiles del 95 % y del 5 %.

1.5. DISCUSIÓN

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico en el que se evaluó la utilidad de las pruebas serológicas para ayudar en el diagnóstico de la COVID-19 durante la primera ola. En ese momento, al inicio de la pandemia, el desarrollo de la respuesta inmune frente al virus jugaba un papel desconocido. Aunque se podía comparar con otras infecciones víricas, no se sabía a ciencia cierta qué tipo de inmunidad desencadenaba el SARS-CoV-2 ni durante cuánto tiempo. Además, tampoco había opciones de vacunas desarrolladas ni disponibles en el mercado que hubiesen demostrado su efectividad frente al virus. Por eso, cualquier estudio que se centrara en el estudio de la respuesta inmune era de suma importancia. En este estudio se contó con una gran cantidad de muestras recogidas de 1.236 pacientes en 18 hospitales españoles durante el pico de la primera ola de la pandemia. Se observaron altos valores de sensibilidad, sobre todo para la determinación de IgM + IgA, en los primeros días tras la hospitalización (61,7 % presentaron una serología positiva en los primeros 4 días del diagnóstico y 90,5 %, tras la primera semana). Estos datos respaldaron el uso de ensayos serológicos como pruebas diagnósticas complementarias para el manejo clínico de la COVID-19 en ese primer momento de la pandemia. También se detectó una menor sensibilidad de la serología en pacientes de edad avanzada en muestras recogidas al inicio de la enfermedad. Para el estudio, se utilizaron dos kits comerciales para medir las respuestas IgM + IgA e IgG frente a dos componentes antigénicos principales del virus, las proteínas N y S. Hasta ese momento, pocas pruebas comerciales se basaban en el estudio simultáneo de ambas proteínas. Otra peculiaridad de los ensayos utilizados en este estudio fue la determinación conjunta de IgM e IgA para la detección precoz de la enfermedad, basándonos en varios estudios que habían descrito una buena sensibilidad de esta clase de inmunoglobulina, mejor que la de la IgG, aunque con una menor especificidad (259–263).

La especificidad de la prueba fue establecida por el fabricante del kit a partir de muestras recogidas en poblaciones prepandémicas (98,8 %; IC₉₅: 95,52-99,68). Los altos niveles de sensibilidad comunicados en el presente estudio, superiores a los comunicados en otros (264–266), pudieron estar relacionados con las características especiales ya

mencionadas: el uso de dos antígenos víricos y la inclusión de IgA. El porcentaje de pacientes IgM + IgA positivos con niveles de IgG negativos fue mayor en las muestras recogidas en fases tempranas de la enfermedad, como cabría esperar para estas clases de inmunoglobulinas. Sin embargo, no se observó una disminución de los valores de IgM + IgA, como habían demostrado otros autores (267), probablemente debido a que la mayoría de muestras recogidas en el estudio pertenecía solo al periodo de hospitalización y no después del alta. La positividad de las pruebas serológicas aumentó con el tiempo, alcanzando valores cercanos al 100 % en muestras tomadas 10 días o más después del primer resultado de PCR. Por el contrario, en artículos publicados en otros estudios realizados con pacientes de MERS, el 20 % de los pacientes no mostraron una respuesta serológica detectable tras más de 30 días de evolución (268). En el caso del SARS, todos los pacientes desarrollaron anticuerpos (269), pero el 28 % mostraron IgM negativas a los 60 días (270), y la mayoría de los pacientes habían perdido la respuesta de anticuerpos a los seis años (271).

Por otro lado, fue sorprendente que la gran proporción de pacientes con niveles positivos de IgG en las muestras se agruparan tan cerca de los primeros resultados positivos de la PCR: 45 % en los 3 primeros días. Algunos de los pacientes, incluso, debutaron con un patrón IgG positivo / IgM + IgA negativo. Este hallazgo podría estar relacionado con el contacto previo de esos pacientes con otros coronavirus que muestran similitudes antigénicas con el nuevo SARS-CoV-2, como han encontrado autores que estudian las respuestas de las células inmunitarias (272), y también podría explicarse por el hecho de que estos pacientes que acuden a urgencias necesitan hospitalización, lo que sugiere una enfermedad avanzada. Sin embargo, no concuerda con los bajísimos niveles de IgG contra la proteína de la espícula y la de la nucleocápside encontrados en la población prepandémica que se traduce en la altísima especificidad de los ensayos serológicos utilizados en éste y otros estudios (273).

Debido a la gran cantidad de sueros estudiados, los resultados serológicos pudieron estratificarse en función de la edad de los pacientes. Se observó un menor número de pacientes con serología positiva entre los pacientes de más edad para las muestras recogidas al principio de la enfermedad. Sin embargo, la proporción aumentó hasta casi

el 100 % de positividad en todos los grupos de edad para las muestras recogidas en la segunda semana o más tarde tras el primer resultado positivo de la PCR. Algunos autores han sugerido una relación entre este retraso en la respuesta en individuos de edad avanzada, con una evolución menos favorable de la enfermedad en este grupo de población (274). En cuanto a la comparación de las respuestas serológicas entre hombres y mujeres, no se observaron diferencias significativas globales ni en la proporción de resultados positivos ni en los niveles de inmunoglobulinas alcanzados en cada grupo. El escaso número de muestras en algunos de los subgrupos pudo haber limitado la potencia estadística de las comparaciones.

En resumen, en el momento de la realización de este estudio, en el que se desconocía la respuesta inmune frente al virus y no había vacunas frente a SARS-CoV-2 disponibles, los elevados valores de sensibilidad alcanzados desde un periodo de tiempo relativamente temprano tras la hospitalización apoyaban el uso de los ensayos serológicos evaluados como pruebas diagnósticas complementarias para el manejo clínico del COVID-19. Además, el gran número de muestras confirió una especial solidez a la evaluación en comparación con otras publicadas anteriormente. Sin embargo, la falta de datos clínicos y evolutivos de los pacientes, así como haber utilizado el tiempo desde el resultado positivo de la PCR en lugar del tiempo desde el inicio de los síntomas, constituyeron sus principales limitaciones.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Actividad neutralizante *in vitro* de anticuerpos inducidos por la vacuna de ARNm BNT162b2 contra la variante B.1.351 completa de SARS-CoV-2.

2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

A finales de 2020, un año después de los primeros casos de neumonía por SARS-CoV-2 declarados en el mundo y con un balance de 1.656.444 casos y 45.511 muertes en España y más de 61 millones de casos y 1,4 millones de muertes a nivel mundial (datos recogidos a fecha 1 de diciembre de 2020) (275,276), empezaron a desarrollarse las primeras vacunas (213). En ese momento, la variante circulante mayoritaria en España era la B.1.1.7 (Alfa), pero empezaban a aparecer los primeros contagios por las nuevas variantes de preocupación: la variante B.1.351 (Beta) y la variante P.1 (Gamma) (186).

La primera vacuna contra SARS-CoV-2 autorizada por la EMA que se aprobó para su uso en España fue la desarrollada por Pfizer/BioNTech: BNT162b2, comercializada con el nombre de Comirnaty® y con una posología de dos dosis con una diferencia de 21 días (277). A partir del 27 de diciembre de 2020 fue administrada en nuestro país a la población que comprendía grupos de riesgo, como eran los residentes y personal en centros de mayores y de atención a grandes dependientes, personal sanitario y sociosanitario y grandes dependientes no institucionalizados (278).

2.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo fue:

- Evaluar la capacidad *in vitro* de los anticuerpos generados después de la vacunación con BNT162b2 contra la cepa salvaje y las variantes B.1, B.1.1.7 (Alfa) y B.1.351 (Beta) utilizando un ensayo de neutralización de virus completo.

2.3 MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1 Participantes

En este estudio participaron noventa y nueve trabajadores sanitarios que recibieron la pauta de dos dosis de la vacuna de ARN mensajero BNT162b2 (Comirnaty®, de Pfizer y BioNTech) separadas 21 días según la posología autorizada en el momento de la comercialización de la vacuna. De ellos, 76 (76,77 %) eran mujeres, con una edad media de 46 años (25-66) y 23 (23,23 %), hombres, con una media de 44 años (27-60). Once (11,11%) de los participantes resultaron haber tenido infección por SARS-CoV-2 antes de la vacunación. Estos formaron el grupo de los preexpuestos.

Se recogieron tres muestras de suero de cada participante en tres momentos del estudio: el día de la primera dosis, el día de la segunda dosis y 14 días después de la segunda dosis. Todas las muestras de suero se inactivaron posteriormente en un termobloque a 56 °C durante 30 minutos antes de su estudio.

2.3.2 Ensayo de neutralización

2.3.2.1 Virus

Para llevar a cabo este estudio se han empleado virus vivos completos, a diferencia de otros estudios que emplean pseudovirus como adenovirus. El uso de virus vivos completos implica un mayor riesgo para el operario que trabaja con ellos, por eso debe trabajarse en un laboratorio de bioseguridad 3, a diferencia de los pseudovirus, que pueden manipularse en uno de nivel 2. A pesar del riesgo, aporta unos resultados *in vitro* más cercanos al comportamiento *in vivo* que los pseudovirus. SARS-CoV-2 hCoV-19/España/MD-FISABIO-Vircell001/2020 del linaje B.1, hCoV-19/España/AN-HUSC-24581802/2020 del linaje B.1.1.7, y hCoV-19/España/GA-CHUVI-19118872/2020 del

linaje B.1.351 se utilizaron en este estudio y se trabajaron en un laboratorio de bioseguridad 3 con todas las medidas de seguridad pertinentes. Las cepas se cultivaron a partir de muestras faríngeas y nasofaríngeas en transporte de medio de virus positivas para SARS-CoV-2 confirmadas por PCR y con un Ct menor de 25.

2.3.2.2 *Línea celular*

El cultivo celular se llevó a cabo con células Vero C1008 [Vero 76, clon E6, Vero E6] (ECACC 85020206) que se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC) y se cultivaron durante 72 horas en medio MEM Eagle con BSS de Earle, con tampón HEPES a una concentración de 25 mM, L-glutamina a una concentración de 2 mM (LONZA™ (Verviers, Bélgica)) y una mezcla de antibiótico-antimicótico 1× (GIGCO™ (NY, EE. UU.)) suplementada con suero fetal bovino (FBS) al 10% (BioWest™ (Nuaille, Francia)) antes de la infección con el virus en placas microtiter de 96 pocillos (Corning™ (Maine, EE. UU.)). A las 72 horas y a través del microscopio se confirmó que las monocapas celulares estaban correctamente formadas.

Las células Vero E6 son un tipo de células ampliamente utilizado en cultivos celulares para el crecimiento de diversos virus, incluido el SARS-CoV-2. En el caso de estudios con este virus en particular, se ha visto que estas células son adecuadas para su replicación, llegando a alcanzar títulos altos (279–282). Esto podría explicarse porque estas células son ricas en ACE-2 (281). Frecuentemente se emplean células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) como células Vero E6 (280,282).

2.3.2.3 *Ensayo*

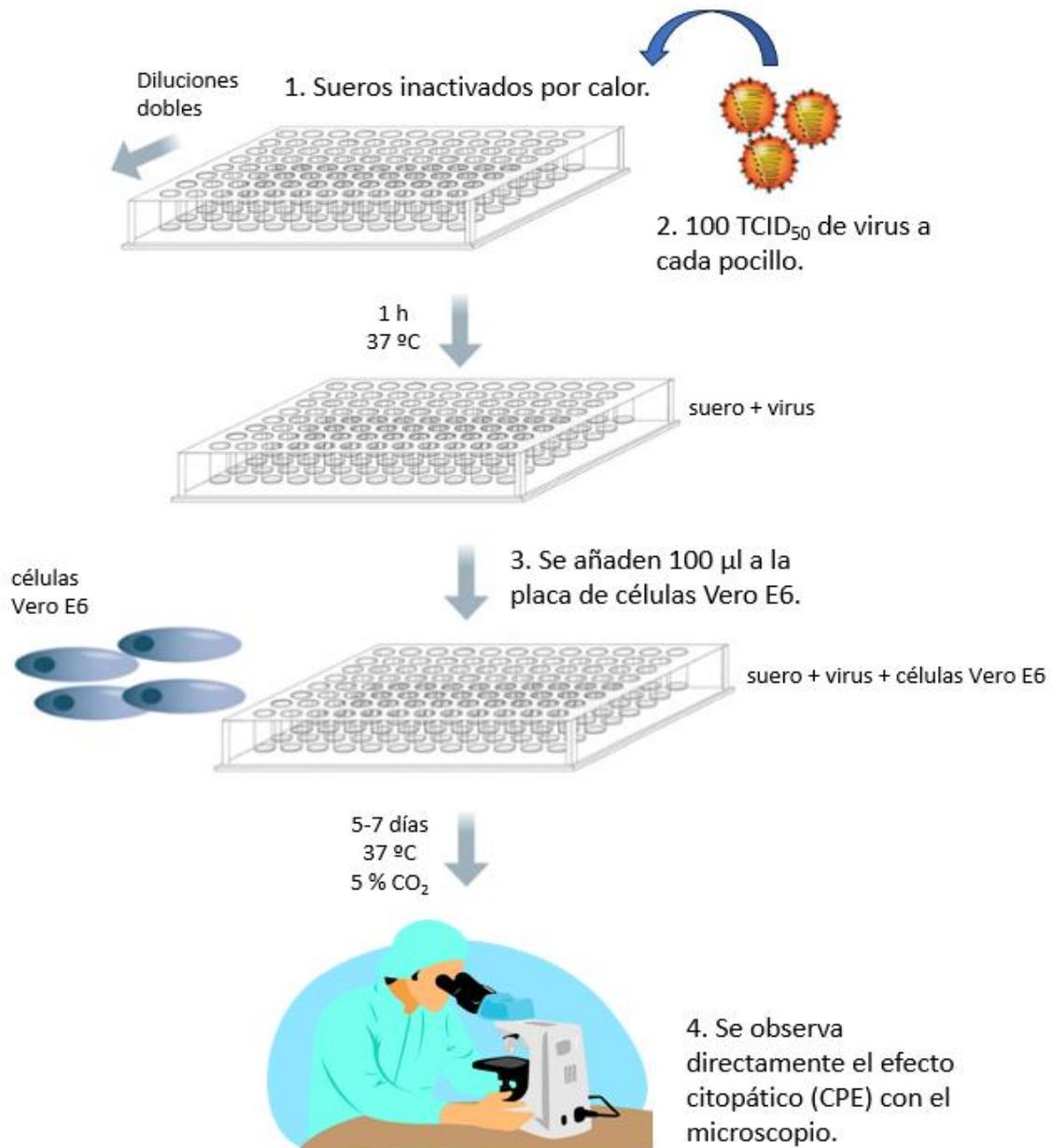
El ensayo se realizó con 70 µl de cada suero que se diluyeron dos veces en serie en el medio de cultivo con FBS al 2 %, desde una dilución de 1:20 a 1:2560. Se añadió la misma cantidad de medio de cultivo celular (70 µl) que contenía 100 dosis infecciosas al 50 % de cultivo de tejido (TCID₅₀) del virus a cada pocillo que contenía suero diluido. Para el

cálculo de los títulos de virus de cada variante se aplicaron las ecuaciones de Reed-Muench determinando la TCID₅₀.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente en una cabina de bioseguridad durante 1 hora y se añadieron 100 µl de cada mezcla de dilución de suero y virus a un pocillo de placa Vero E6 del que se había retirado previamente el medio de cultivo. Después de 5-7 días de incubación a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %, el efecto citopático completo (CPE) se evaluó mediante examen directo microscópico. La dilución de suero más alta que inhibió completamente el CPE se consideró como el título de neutralización (NT). Se analizó el NT en cada muestra de suero con las siguientes tres cepas de SARS-CoV-2: B.1, B.1.1.7 y B.1.351.

El efecto citopático es el resultado visible al microscopio o por observación directa de alteraciones producidas por virus citopatogénicos en la morfología de las células. Estos cambios pueden ser en su fisiología, en su biosíntesis o en su genética y las consecuencias son una alteración en el metabolismo y en la multiplicación celular (283). Pueden observarse desde sincitios (células multinucleadas originadas a partir de la fusión de células adyacentes a través de sus membranas), cuerpos de inclusión (estructuras anormales en los núcleos celulares o en el citoplasma que se tiñen de forma característica dependiendo del colorante empleado), crecimiento acelerado de células provocando tumores, lisis celular (que se observa por la rotura de la monocapa que forman las células) (284,285) y hasta apoptosis (muerte celular programada) debido a la replicación viral (286).

El primer estándar internacional de la OMS para inmunoglobulina anti-SARS-CoV-2 (humana), código NIBSC 20/136, se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos.



Imágenes cedidas por Vircell S. L.

Esquema 10. Procedimiento de neutralización. Primero se inactivan los sueros por calor y se añaden a una placa microtiter de 96 pocillos en diluciones dobles seriadas. Después, se añaden 100 TCID₅₀ del SARS-CoV-2 cultivado en cada pocillo y se deja incubando 1 hora a temperatura ambiente en una cabina de bioseguridad. Posteriormente, 100 µl de esa mezcla suero-virus se añaden a la placa de microtiter, donde se encuentra el cultivo celular con las células Vero E6, y se incuba entre 5 y 7 días a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Finalmente, transcurrido ese periodo, se observa directamente el efecto citopático al microscopio.

2.3.3 Análisis estadístico

La normalidad de los datos se comparó mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon o la prueba de Wilcoxon para muestras no pareadas para comparar conjuntos de datos porque los datos no tenían una distribución normal. El análisis se realizó en R. Para la representación gráfica, los títulos se transformaron a $\log_2 (1/(\text{título}/10))$ con títulos $<1/20$ asignados al valor 0 y títulos $\geq 1/2560$, al 8.

2.3.4 Comité ético

Este estudio se llevó a cabo tras la autorización por parte del Comité Ético de Investigación de Granada (anexo 3).

2.4. RESULTADOS

En el caso de la variante B.1, se alcanzaron títulos altos de neutralización después de la segunda dosis en todos los participantes del estudio: el título medio geométrico (GMT) fue de 1/38 después de la primera dosis y aumentó a 1/731 en la segunda muestra 2 semanas después de la segunda dosis. Los individuos vacunados pertenecientes al grupo de los preexpuestos (con antecedentes de infección por SARS-CoV-2 confirmada por un resultado positivo a la PCR), mostraron títulos más altos que los individuos no preexpuestos después de la primera (GMT de 1/387 versus 1/28, respectivamente) y la segunda dosis (1/995 frente a 1/703, respectivamente). Hasta el 72% de los vacunados preexpuestas presentaron títulos $>1/80$ tras una sola dosis de vacuna, mientras que solo el 11% de las personas vacunadas no preexpuestas tuvieron títulos análogos (tabla 12).

Los títulos contra las tres variantes se representan en la figura 15 para participantes vacunados preexpuestos y no preexpuestos. Los títulos de NT contra B.1 y la variante B.1.1.7 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Wilcoxon, pero sí que fueron significativamente más altos que los títulos contra la variante B.1.351 en todos los grupos del estudio (vacunados preexpuestos y no preexpuestos, $p < 0,01$). Mientras que todos los vacunados presentaron anticuerpos neutralizantes contra B.1 después de la segunda dosis (43 % con títulos $>1/620$), el 14 % fueron negativos contra la variante B.1.351 y el 76 % solo tenían títulos 1/20-1/80.

El cambio entre los títulos de NT contra B.1 y B.1.531 después de la segunda dosis en comparación con los de después de la primera dosis fue menor en los individuos vacunados preexpuestos (alrededor de 3 títulos) que en los vacunados no preexpuestos (casi 5 títulos) como se muestra en la tabla 12. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en una prueba de Wilcoxon para muestras no pareadas a pesar del bajo número de personas vacunadas preexpuestas en el estudio. Más de la mitad de los vacunados preexpuestos tenían títulos neutralizantes $>1/80$, mientras que solo el 3 % de los vacunados no expuestos tenían títulos $>1/80$ y solo el 13 % eran positivos.

El primer estándar internacional de la OMS para anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se analizó en la prueba de neutralización de CPE utilizada en el estudio con fines comparativos con otros estudios. Se obtuvieron títulos de 1/640, 1/1280 y 1/160 para las variantes B.1, B.1.1.7 y B.1.351, respectivamente.

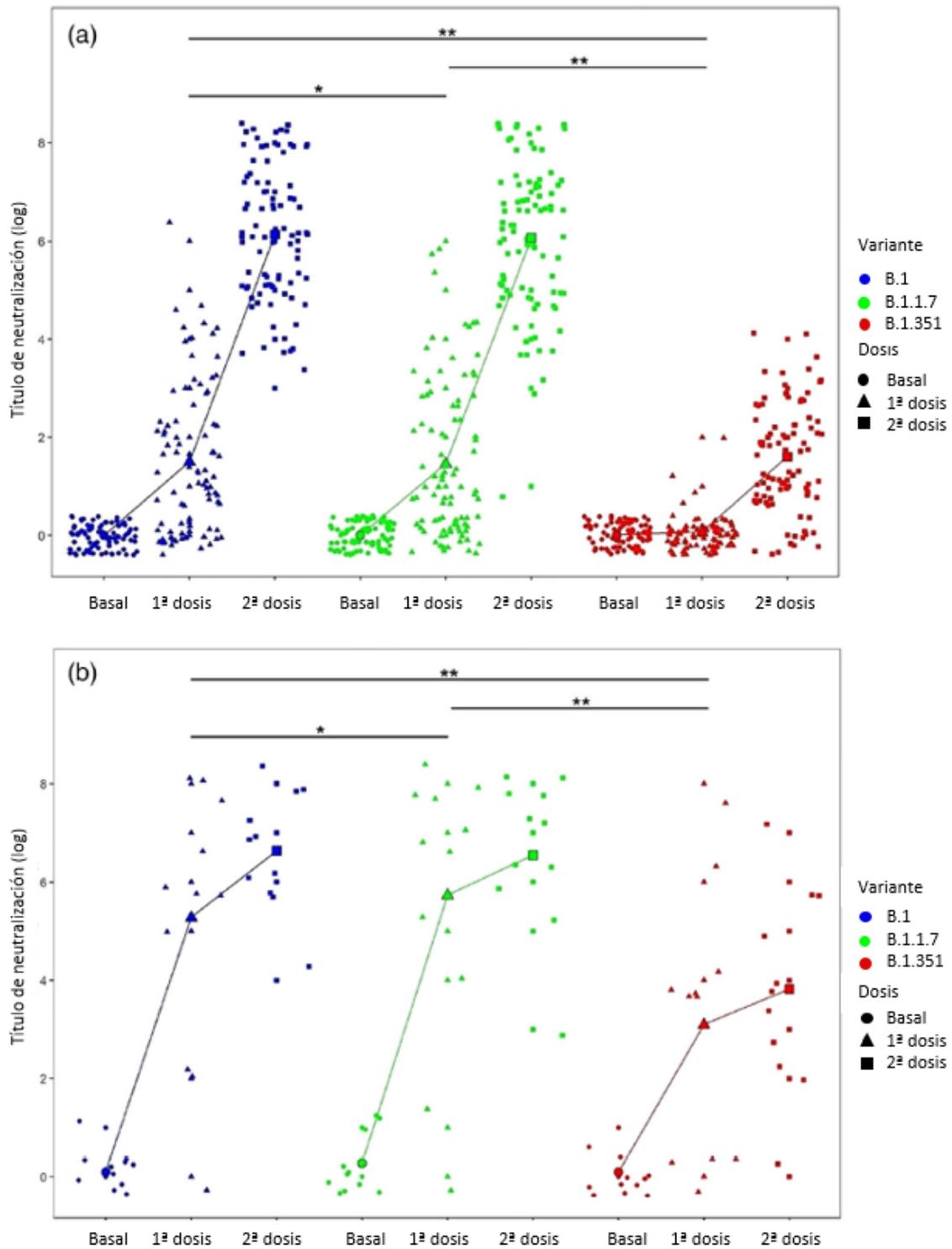


Figura 15. Títulos de neutralización (log, transformados como se describe anteriormente) para cada individuo de los grupos no preexpostos (A) y preexpostos (B). Los títulos contra diferentes cepas se representan con diferentes colores (azul para

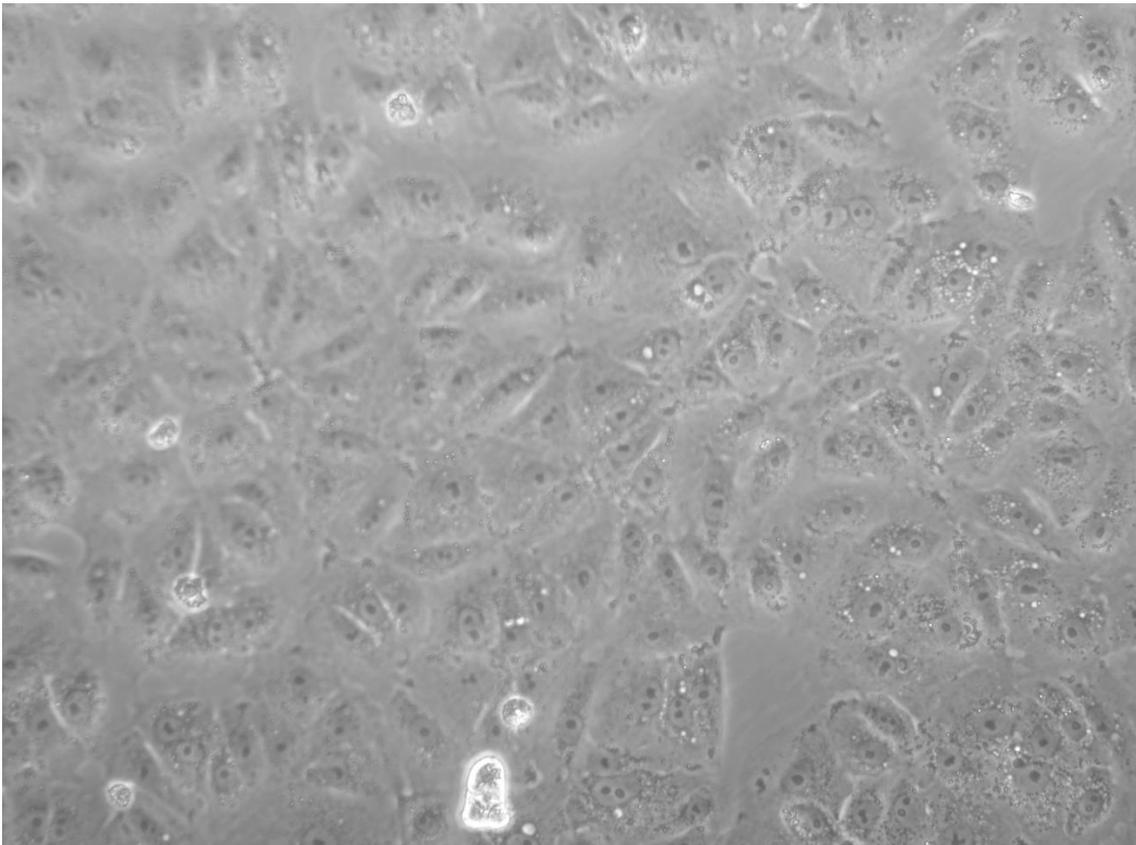
B.1, verde para B.1.1.7, rojo para B.1.351). Las muestras se separan por tiempo de recolección: muestras recolectadas antes de la vacunación (basal, ●), muestras recolectadas el mismo día en que se administró la segunda dosis correspondientes a los anticuerpos desencadenados por la primera dosis de la vacuna (dosis 1, ▲), muestras recolectadas 2 semanas después administración de la segunda dosis de vacuna (dosis 2, ■). Los títulos medios geométricos para cada subgrupo se representan con marcadores grandes. La evolución entre los títulos medios geométricos de anticuerpos basales, dosis 1 y dosis 2 se representa mediante líneas continuas para cada subgrupo. Los títulos de cada grupo se compararon entre cada par de cepas mediante una prueba de Wilcoxon. Los grupos emparejados significativamente diferentes están marcados con ** ($p < 0.01$) mientras que los grupos pareados no significativamente diferentes están marcados con * ($p > 0.05$).

		B.1					B.1.1.7					B.1.351				
		<1/20	1/20-1/80	1/160-1/640	>1/640	GMT	<1/20	1/20-1/80	1/160-1/640	>1/640	GMT	<1/20	1/20-1/80	1/160-1/640	>1/640	GMT
Basal	PEV	10 (0.91)	1 (0.09)	0	0	<1/20	8 (0.73)	3 (0-27)	0	0	<1/20	10 (0.91)	1 (0.09)	0	0	<1/20
	NPEV	88 (1.00)	0	0	0	<1/20	88 (1.00)	0	0	<1/20	88 (1.00)	0	0	0	<1/20	
1ª dosis	PEV	1 (0.09)	2 (0.18)	4 (0.36)	4 (0.36)	1/387	1 (0.09)	1 (0.09)	2 (0.18)	7 (0.64)	1/530	4 (0.36)	0	6 (0.55)	1 (0.09)	1/85
	NPEV	29 (0.33)	48 (0.55)	11 (0.13)	0	1/28	34 (0.39)	43 (0.49)	11 (0.13)	0	1/27	84 (0.95)	4 (0.05)	0	0	<1/20
2ª dosis	PEV	0	0	5 (0.45)	6 (0.55)	1/995	0	1 (0.09)	4 (0.36)	6 (0.55)	1/934	1 (0.09)	4 (0.36)	5 (0.45)	1 (0.09)	1/141
	NPEV	0	1 (0.01)	50 (0.57)	37 (0.42)	1/703	0	3 (0.03)	45 (0.51)	40 (0.45)	1/671	13 (0.15)	72 (0.82)	3 (0.03)	0	1/30

GMT: título medio geométrico; NPEV: vacunados no preexpuestos; PEV: vacunados preexpuestos. Los datos se expresan como frecuencias absolutas (las frecuencias relativas se muestran entre paréntesis).

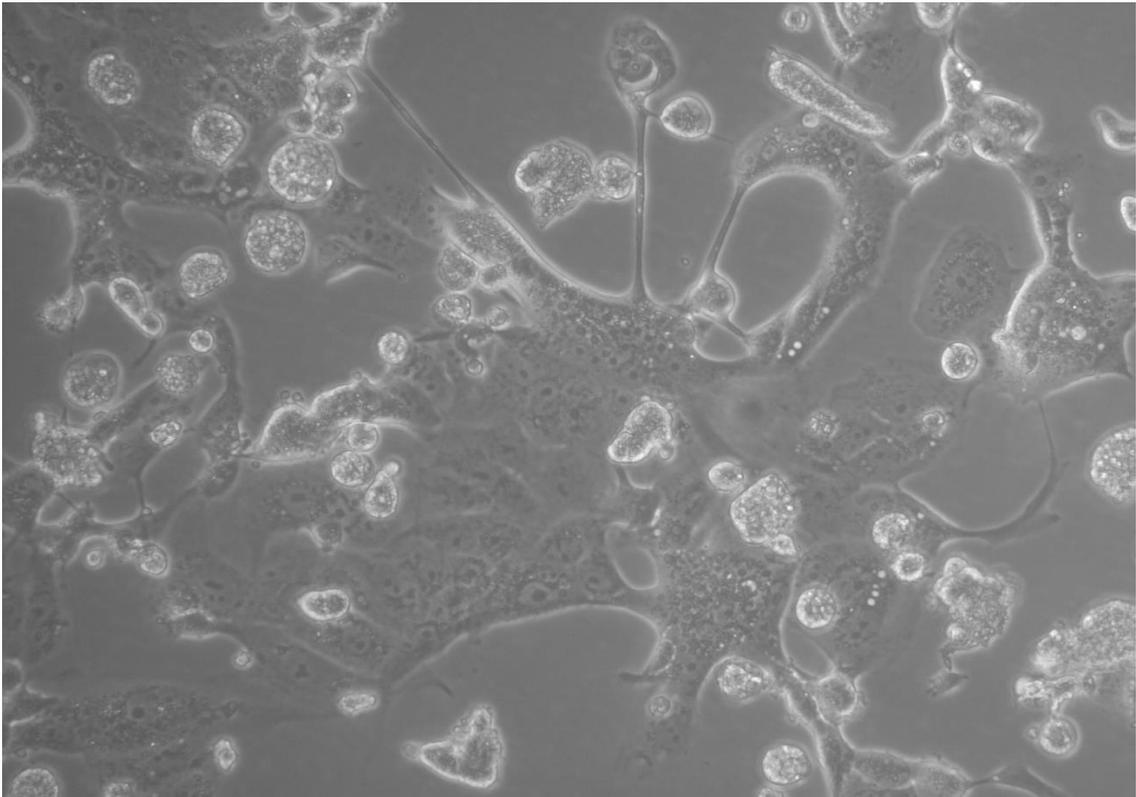
Tabla 12. Títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes después de la vacunación con ARNm de BNT162b2 de 99 participantes (11 preexpuestos al SARS-CoV-2) al inicio, 21 días después (el día que recibieron la segunda dosis) y 14 días después de recibir la segunda dosis, contra B.1, B.1.1.7 y B.1.351 SARS-CoV-2.

Los resultados de titulación de anticuerpos se establecieron observando por microscopía el efecto citopático producido por el SARS-CoV-2 en las células Vero E6.



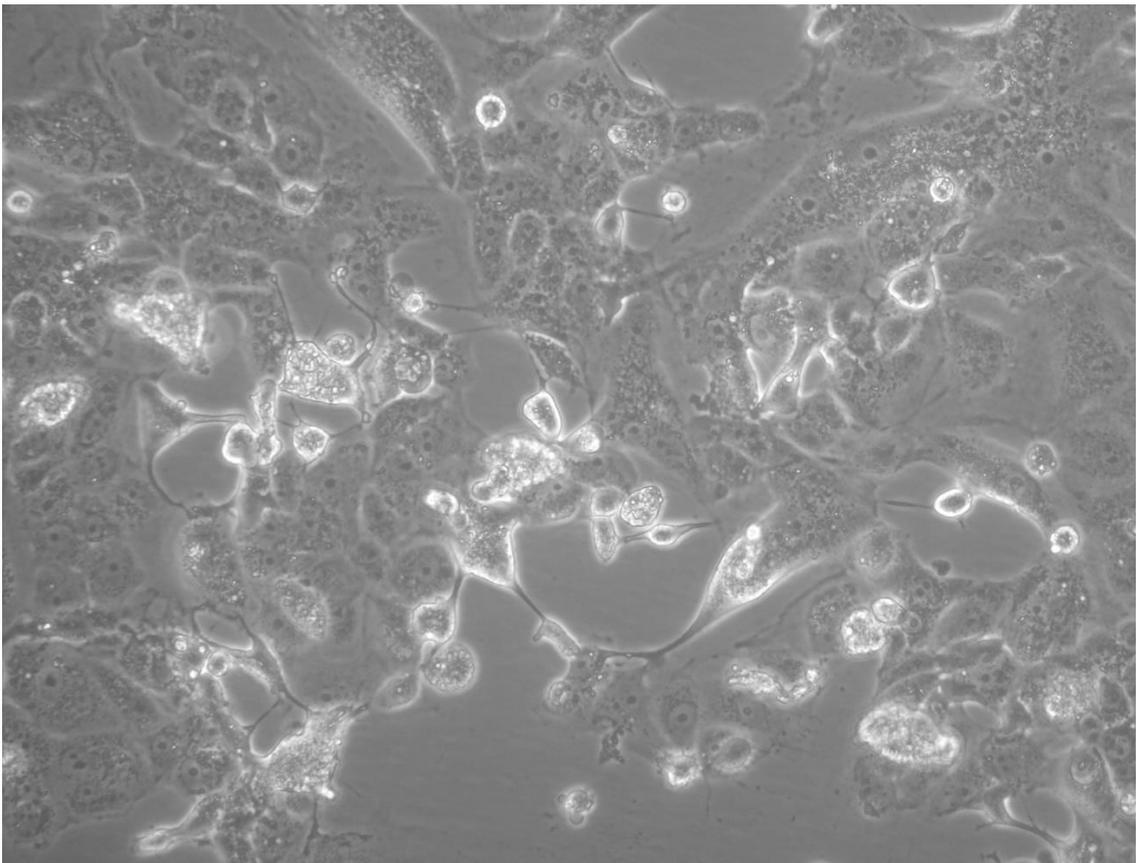
Imágenes cedidas por Vircell S. L.

Imagen 12. Línea celular Vero E6 sin infectar.



Imágenes cedidas por Vircell S. L.

Imagen 13. Línea celular Vero E6 infectada por SARS-CoV-2 de la cepa salvaje.



Imágenes cedidas por Vircell S. L.

Imagen 14. Línea celular Vero E6 infectada por SARS-CoV-2 variante Alfa (B.1.1.7).

2.5. DISCUSIÓN

Las variantes del SARS-CoV-2 surgidas a partir de mutaciones representaron en su momento y, aún hoy, siguen representando un desafío para las vacunas contra la COVID-19. Cada nueva variante ha conseguido un mayor escape vacunal que la anterior. Informes preliminares sugerían que las variantes B.1.351 y P1/P2, las que empezaban a aparecer en el momento del estudio, podrían escapar a la actividad neutralizante de los anticuerpos generados por las vacunas de ARNm BNT162b2 y ARNm-1273, como se confirmó posteriormente. En nuestro estudio, reclutamos a 99 participantes que recibieron dos dosis de vacunación con ARNm de BNT162b2; los participantes fueron muestreados al inicio de la vacunación, el día que recibieron la segunda dosis y 14 días después de la segunda dosis. Once de los participantes habían sido infectados previamente con SARS-CoV-2. En este estudio, mostramos que los anticuerpos inducidos por ARNm de BNT162b2 tenían una actividad neutralizante *in vitro* más baja contra la variante B.1.351 en comparación con la neutralización contra las variantes B.1.1.7 o B.1. También mostramos que, curiosamente, para las personas preexpuestas al SARS-CoV-2, una sola dosis de ARNm de BNT162b2 podía ser adecuada para producir anticuerpos neutralizantes para B.1.

El porcentaje de participantes que lograron títulos de anticuerpos neutralizantes (1/20–1/80) y también el título medio fueron significativamente mayores en el momento de recibir la segunda dosis de ARNm de BNT162b2 en las tres variantes de SARS-CoV-2 estudiadas (B.1, B.1.1.7 y B.1.351) para el grupo preexpuesto. Nuestros resultados fueron consistentes con los encontrados por Saadat et al. (287), quienes demostraron que los trabajadores de la salud con infección previa por COVID-19 tenían respuestas de títulos de anticuerpos más altos a una dosis única de vacuna de ARNm que aquellos que no estaban infectados previamente, y con los de Ebinger et al. (288) que mostraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos IgG específicos contra la espícula y las respuestas de inhibición de la unión de anticuerpos ACE-2 provocadas por una sola dosis de vacuna en personas con infección previa por SARS-CoV-2 (n = 35) fueron similares a las encontradas después de dos dosis de vacuna en individuos sin infección

previa (n=228). Además de los datos proporcionados en estos estudios, proporcionamos datos sobre la actividad neutralizante contra las variantes B.1.1.7 (la circulante mayoritaria en el momento del estudio) y B.1.351 (la variante que parecía que empezaba a desplazar a la B.1.1.7 como circulante mayoritaria) del SARS-CoV-2 y, aunque una dosis única de vacuna a las personas con antecedentes confirmados de SARS-CoV-2 parecía ser eficaz para neutralizar B.1 y B1.1.7, podía no ser suficiente para B.1.351 y, tal vez, para otras nuevas variantes que también llevan mutaciones específicas de “escape de vacuna” en la espícula, como se propuso para E484K, presente en los linajes B.1.351, P1/P2 y Ómicron (211,289). La variante B.1.351 incorpora E484K en el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S (290,291). Esta mutación afecta la unión de anticuerpos neutralizantes policlonales séricos (289) debido a que potencia la afinidad de unión entre RBD y ACE-2 en células humanas; también se ha demostrado que reduce la actividad de neutralización e incluso puede escapar de los anticuerpos neutralizantes en el plasma convaleciente de pacientes con COVID-19, lo que puede debilitar la efectividad de las vacunas y la eficacia de las terapias de anticuerpos neutralizantes en desarrollo. Este efecto también ha sido probado para las variantes P1/P2 y podría ser similar para todas las variantes que albergan este cambio.

Todos los participantes del estudio mostraron títulos altos de anticuerpos neutralizantes contra las variantes B.1 y B.1.1.7 14 días después de recibir la segunda dosis de ARNm de BNT162b2. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas tanto en el título medio como en el porcentaje de participantes con títulos de neutralización con actividad frente a la variante B.1.352. De acuerdo con nuestros resultados, estudios recientes han demostrado una menor actividad de las vacunas de ARNm frente a la espícula en la variante B 1.352 que en las otras variantes del SARS-CoV-2 (292). Estos estudios han demostrado que la incorporación de la mutación E484K en un modelo de pseudovirus de B.1.1.7 con N501Y + D614G dio como resultado una capacidad de neutralización ligeramente inferior (de 0,81 a 1,41 veces) que con la cepa salvaje. Wang et al., (291) mediante un ensayo de neutralización de pseudotipos de SARS-CoV-2, estudió a 20 voluntarios que recibieron las vacunas Moderna (ARNm-1273) o Pfizer-BioNTech (BNT162b2), y encontró que la actividad contra las variantes de SARS-CoV-2 que

contienen las mutaciones E484K, N501Y o la combinación K417N:E484K:N501Y se redujo por un pequeño, pero significativo margen. Wu et al., (293) utilizaron los pseudovirus ARNm-1273 que portan la proteína de la espícula del aislamiento original de Wuhan-Hu-1, la variante D614G y las variantes B.1.1.7 y B.1.351 y encontraron una disminución en los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la variante B.1.351 y un subconjunto de sus mutaciones que afectan a la región RBD del SARS-CoV-2. Tada et al. (294) también analizaron muestras de suero de pseudovirus de individuos vacunados con la vacuna de ARNm BNT162b2 y se encontró una reducción promedio del título de tres veces para la variante B.1.351, reducción que se atribuyó a la mutación E484K en el RBD. Liu et al. (295) diseñaron mutaciones en la espícula de pseudovirus, incluidas todas las mutaciones en B.1.1.7, P.1 y B.1.351, y estudiaron la actividad neutralizante del suero de los participantes vacunados con BNT162b2. La neutralización de las variantes B.1.1.7- y P.1 fue aproximadamente equivalentes en comparación con la neutralización de USA-WA1/2020, mientras que la neutralización de la variante B.1.351 fue menor. García-Beltrán et al. (181) evaluaron la potencia de neutralización de 48 sueros de receptores de vacunas BNT162b2 y ARNm-1273 frente a pseudovirus portadores de proteínas de la espícula derivadas de 10 cepas de SARS-CoV-2. De nuevo, B.1.351 y otras cuatro variantes que albergaban mutaciones en la región RBD, incluidas K417N/T, E484K y N501Y, fueron muy resistentes a la neutralización. En cambio, según Stamatatos et al., (296), utilizando pseudovirus que expresaban la espícula del virus Wuhan Hu1 de longitud completa o una espícula que contenía las mutaciones D80A, D215G, K417N, E484K, N501Y y D614G del linaje B.1.351 y A701V, se examinó si los sueros y los anticuerpos monoclonales de donantes convalecientes, antes y después de una sola inmunización con las vacunas de ARNm de Pfizer o Moderna, neutralizaron la cepa Wuhan-Hu-1 y una variante, B.1.351 de Sudáfrica y se encontró con un aumento de 1000 veces en los títulos de anticuerpos neutralizantes contra ambas cepas y SARS-CoV-1.

De acuerdo con lo anterior, otros estudios también han mostrado un escape de neutralización de B.1.351 al plasma convaleciente. Wibmer et al. (297) encontraron que casi la mitad (21 de 44 (48 %)) de las muestras analizadas no tenían actividad neutralizante detectable contra el virus 501Y.V2. Las diferencias en la magnitud de la

respuesta frente a las nuevas variantes pueden explicarse por el uso de diferentes tipos de virus en los ensayos de neutralización: pseudovirus, mutantes creados en laboratorio o mutantes de tipo salvaje. En ese sentido, los mutantes de tipo salvaje pueden albergar mutaciones adicionales a las presentes en la espícula que explican tales diferencias (181). Si bien los ensayos de pseudovirus ofrecen una mejor comprensión del papel de cada mutación en las respuestas diferenciales contra cada variante, la neutralización con variantes de tipo salvaje puede reflejar más de cerca los desafíos que plantean las nuevas variantes para las campañas de vacunación en curso. La falta de homogeneidad en los ensayos de neutralización es otro factor que dificulta la comparación entre varios estudios. Por lo tanto, hemos incluido valores para el estándar internacional para facilitar la comparación con estudios futuros y promover el uso de dicho estándar (298).

Curiosamente, la caída en la respuesta de anticuerpos neutralizantes fue significativamente menor en el pequeño subgrupo de vacunados que habían sufrido una infección previa confirmada por un resultado positivo de PCR. García-Beltrán et al. (181) informaron de que los anticuerpos tienen una unión reducida pero detectable al RBD mutante, lo que sugiere que una respuesta mayor en los vacunados preexposados explica esta diferencia. Además, una infección previa ha enfrentado al sistema inmunitario del paciente con una variedad de epítomos (299) que han desencadenado una respuesta inmunitaria más diversificada tras la vacunación. Finalmente, una maduración más avanzada de la respuesta inmune de estos individuos preexposados también puede ser un factor diferencial para esta mayor respuesta neutralizante. Como lo muestran Gaebler et al. (299), los anticuerpos expresados por las células B de memoria mostraron una mayor resistencia a las mutaciones en RBD 6 meses después de la infección. En ese sentido, sería interesante, siempre que fuera posible, estudiar las respuestas inmunes de las vacunas después de un período más largo desde la última dosis de inmunización.

Nuestro estudio pudo tener algunas limitaciones, como el bajo número de participantes inscritos que habían sufrido una infección previa por SARS-CoV-2, y el hecho de no haber incluido otras VOC, como la variante Gamma, la Delta o la última variante circulante, Ómicron y sus sublinajes.

A pesar de las limitaciones anteriores, pudimos confirmar los resultados de estudios previos realizados con pseudovirus aportando con un mayor número de participantes y utilizando aislados reales de las variantes B.1, B.1.1.7 y B.1.351 del SARS-CoV-2. El impacto clínico de la resistencia a la neutralización al inicio de la vacunación era incierto; sin embargo, nuestros resultados mostraron el potencial de la variante B 1.351 para escapar de la neutralización de la inmunidad humoral en un momento en el que las vacunas eran la única forma de detener la propagación del virus y demostraron la necesidad de administrar la pauta completa de vacunación en contra de la administración de una sola dosis en los pacientes preexpuestos planteada para hacer frente al inicial desabastecimiento de vacunas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los altos valores de sensibilidad alcanzados en el estudio desarrollado en el capítulo 1 apoyaron el uso de los ensayos serológicos evaluados como pruebas diagnósticas complementarias para el manejo clínico del COVID-19 al inicio de la pandemia.
2. Se observó un menor número de pacientes con serología positiva entre los pacientes de más edad para las muestras recogidas al principio de la enfermedad. Sin embargo, la proporción aumentó hasta casi el 100 % de positividad en todos los grupos de edad para las muestras recogidas en la segunda semana o más tarde tras el primer resultado positivo de la PCR.
3. No se observaron diferencias significativas ni en la proporción de resultados positivos ni en los niveles de inmunoglobulinas alcanzados en los grupos separados por sexo. El escaso número de muestras en algunos de los subgrupos pudo haber limitado la potencia estadística de las comparaciones.
4. Todos los participantes del estudio desarrollado en el capítulo 2 mostraron títulos altos de anticuerpos neutralizantes contra las variantes B.1, B.1.1.7 (Alfa) y B.1.351 (Beta) 14 días después de recibir la segunda dosis de ARNm de BNT162b2. Sin embargo, se encontraron niveles menores, estadísticamente significativos, tanto en el título medio como en el porcentaje de pacientes con títulos de neutralización frente a la actividad contra la variante B.1.352.
5. El porcentaje de participantes que lograron títulos de anticuerpos neutralizantes y también el título medio de estos fueron significativamente mayores en el grupo de los preexpuestos en el momento de recibir la segunda dosis de ARNm de BNT162b2 para las tres variantes de SARS-CoV-2 estudiadas (B.1, B.1.1.7 y B.1.351).

6. Al inicio de la pandemia, cuando había un desconocimiento sobre el impacto clínico de la resistencia a la neutralización y las vacunas eran la única forma efectiva de frenar la propagación del virus, nuestros resultados mostraron el potencial de la variante B 1.351 para escapar de la neutralización de la inmunidad humoral y plantearon la necesidad de proporcionar una pauta de vacunación de dos dosis en lugar de solo una como se planteó ante la falta de suministro a los pacientes preexpuestos vacunados con BNT162b2.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Sanidad (Gobierno de España). (2020). *Enfermedad por coronavirus, COVID-19. Actualización 17 de abril de 2020*. Madrid. [Internet]. 2020 [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/noticiasEventos/actualidad/2020_Coronavirus/pdf/20200421_INFORME_CIENTIFICO_SANIDAD_COVID-19.pdf
2. Instituto de Salud Carlos III (Gobierno de España). (2020). *Informe del Grupo de Análisis Científico de Coronavirus del ISCIII (GACC-ISCIII). Origen del SARS-CoV-2*. Madrid. [Internet]. 2020 [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.conprueba.es/sites/default/files/noticias/2020-04/ORIGEN%20DEL%20SARS-COV-2_3.pdf
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, 27 de abril). *COVID-19: cronología de la actuación de la OMS* [Comunicado de prensa] [Internet]. 2020 [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Los nombres de la enfermedad por coronavirus (COVID-19) y del virus que la causa*. [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: [https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
5. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. *COVID-19 map*. [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
6. Organización mundial del Comercio. (2020). *Desarrollo y distribución de vacunas contra la COVID-19 en todo el mundo*. [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.wto.org/spanish/tratop_s/covid19_s/vaccine_report_s.pdf
7. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, 31 de diciembre). *La OMS publica su primera validación para uso en emergencias de una vacuna contra la COVID-19 y hace hincapié en la necesidad de un acceso mundial equitativo* [Comunicado de prensa]. [Internet]. 2020 [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/31-12-2020-who-issues-its-first-emergency-use-validation-for-a-covid-19-vaccine-and-emphasizes-need-for-equitable-global-access>
8. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). (2021, 23 de agosto). *La FDA aprueba la primera vacuna contra el COVID-19* [Comunicado de prensa]. [Internet]. 2021 [citado 11 de julio de 2023]. Disponible

en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-la-primera-vacuna-contra-el-covid-19>

9. Organización Mundial de la Salud (OMS). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing – 5 May 2023* [Internet]. 2023 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing---5-may-2023>
10. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. *Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies*. Sig Transduct Target Ther. 2022;7(1):26.
11. Cilla Eguiluz G, Navarro Mari JM, Galán Montemayor JC, Folgueira López MD, Pumarola Suñé T. *Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2*. 73. Tomás Pumarola (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021.
12. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. *SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development*. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:587269.
13. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19*. Nat Rev Microbiol. 2021;19(3):141-54.
14. Case JB, Bailey AL, Kim AS, Chen RE, Diamond MS. *Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2*. Virology. 2020;548:39-48.
15. Ministerio de Sanidad (Gobierno de España). (2020). *Información microbiológica acerca del SARS-CoV-2. Actualización 25 de marzo de 2021*. Madrid. [Internet]. 2021 [citado 11 de julio de 2023]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Documento_MICROBIOLOGIA.pdf
16. Fundación iO. *Por qué es importante conocer la estructura del SARS-CoV-2* [Internet]. [citado 11 de julio de 2023]. Disponible en: <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/virus/coronavirus-covid-19/por-que-es-importante-conocer-la-estructura-del-sars-cov2/>
17. Salazar D, Uzquiano M, Rivera G, Velasco E. *Mecanismos de transmisión del SARS-CoV-2*. Acta Nova. 2020;9(5-6):773-92.
18. Jamison DA, Anand Narayanan S, Trovão NS, Guarnieri JW, Topper MJ, Moraes-Vieira PM, et al. *A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, part 1: intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection*. Eur J Hum Genet. 2022;30(8):889-98.

19. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. *The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome*. Cell. 2020;181(4):914-921.e10.
20. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. *Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19*. Cells. 2021;10(4):821.
21. Sotomayor Lugo F, Corbacho Padilla JM, Valiente Linares AM, Benítez Cordero Y, Viera González T, Sotomayor Lugo F, et al. *Aspectos generales sobre la estructura del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2)*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Internet]. 2020 [citado 11 de julio de 2023];39(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-03002020000300025&lng=es&nrm=iso&tlng=en
22. Guo Z, Zhang C, Zhang C, Cui H, Chen Z, Jiang X, et al. *SARS-CoV-2-related pangolin coronavirus exhibits similar infection characteristics to SARS-CoV-2 and direct contact transmissibility in hamsters*. iScience [Internet]. 2022 [citado 11 de julio de 2023];25(6). Disponible en: [https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042\(22\)00621-6](https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042(22)00621-6)
23. Pastrian-Soto G. *Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune*. Int J Odontostomat. 2020;14(3):331-7.
24. Gruell H, Vanshylla K, Weber T, Barnes CO, Kreer C, Klein F. *Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2*. Immunity. 2022;55(6):925-44.
25. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. *Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly*. Nat Commun. 2022;13(1):4399.
26. Fang E, Liu X, Li M, Zhang Z, Song L, Zhu B, et al. *Advances in COVID-19 mRNA vaccine development*. Signal Transduct Target Ther. 2022;7:94.
27. Mousavizadeh L, Ghasemi S. *Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis*. J Microbiol Immunol Infect. 2021;54(2):159-63.
28. Duart G, García-Murria MJ, Grau B, Acosta-Cáceres JM, Martínez-Gil L, Mingarro I. *SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes*. Open Biol. 2020;10(9):200209.
29. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. *Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers*. Nat Struct Mol Biol. 2020;27(12):1202-8.
30. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. *Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19*. Viruses. 2020;12(4):372.

31. Alcamí Pertejo J, López-Collazo E. *Coronavirus, ¿la última pandemia?* 1.^a ed. OBRERON; p 76-77.
32. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, Dhama K, Yattoo MI, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. *SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview*. Infez Med. 2020;28(2):174-184.
33. Díaz-Armas MT, Sánchez-Artigas R, Matute-Crespo TZ, Llumiquinga-Achi RA. *Proteína de la espícula del virus SARS-CoV-2 y su relación con la enzima convertidora de angiotensina-2*. Rev Inf Cient [Internet]. 2021 [citado 12 de julio de 2023];100(5):e3633. Disponible en: <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/3633>
34. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2022;23(1):3-20.
35. Ismail AM, Elfiky AA. *SARS-CoV-2 spike behavior in situ: a cryo-EM images for a better understanding of the COVID-19 pandemic*. Sig Transduct Target Ther. 2020;5(1):1-2.
36. Coronavirus Annotation. *Coronavirus biological cycle* [Internet]. [citado 12 de julio de 2023]. Disponible en: <https://coronavirus-annotation-3.sci.utah.edu/>
37. SAVALnet. *Nanocuerpos para la COVID-19*. SAVALnet [Internet]. 2021 [citado 12 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.savalnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/nanocuerpos-para-la-covid-19.html>
38. Chen Y, Liu Q, Guo D. *Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis*. J Med Virol. 2020;92(4):418-23.
39. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. *The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status*. Mil Med Res. 2020;7:11.
40. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. *Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS*. Rev Med Virol. 2020;30(3):e2107.
41. RAED. *Las pandemias en la historia de la humanidad*. Real Academia Europea de Doctores [Internet]. 2021 [citado 31 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://raed.academy/las-pandemias-en-la-historia-de-la-humanidad/>
42. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. [Internet]. [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://covid19.who.int>

43. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. *SARS-CoV-2 infection in children*. N Engl J Med. 2020;NEJMc2005073.
44. Zhang YZ, Holmes EC. *A Genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2*. Cell. 2020;181(2):223-7.
45. 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;579(7798):270-3.
46. Zhou H, Chen X, Hu T, Li J, Song H, Liu Y, et al. *A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein*. Curr Biol. 8 de junio de 2020;30(11):2196-2203.e3.
47. Hul V, Delaune D, Karlsson EA, Hassanin A, Tey PO, Baidaliuk A, et al. *A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia*. Nat Commun. 2021;12(1):6563.
48. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, et al. *Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in malayan pangolins*. Nature. 2020;583(7815):282-5.
49. Li X, Giorgi EE, Marichannelgowda MH, Foley B, Xiao C, Kong XP, et al. *Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection*. Sci Adv. 2020;6(27):eabb9153.
50. Wong MC, Javornik Cregeen SJ, Ajami NJ, Petrosin JF. *Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019*. bioRxiv [preprint]. 2020.
51. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. *Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from malayan pangolins*. Nature. 2020;583(7815):286-9.
52. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. *On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2*. Natl Sci Rev. 2020;7(6):1012-23.
53. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. *From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses*. Infect Genet Evol. 2020;85:104502.
54. Rothan HA, Byrareddy SN. *The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak*. J Autoimmun. 2020;109:102433.
55. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Vías de transmisión del virus de la COVID-19: repercusiones para las recomendaciones relativas a las precauciones en materia de prevención y control de las infecciones* [Internet]. [citado 31 de agosto de 2022]. Disponible en:

<https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>

56. Ge Z yu, Yang L ming, Xia J jia, Fu X hui, Zhang Y zhen. *Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry*. J Zhejiang Univ Sci B. 2020;21(5):361-8.
57. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study*. Lancet Infect Dis. 2020;20(5):565-74.
58. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. *Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019*. Nature. 2020;581(7809):465-9.
59. Bai Y, Yao L, Wei T, Tian F, Jin DY, Chen L, et al. *Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19*. JAMA. 2020;323(14):1406-7.
60. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. *Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents*. Journal of Hospital Infection. 2020;104(3):246-51.
61. Lai MYY, Cheng PKC, Lim WWL. *Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. Clin Infect Dis. 2005;41(7):e67-71.
62. Chan KH, Peiris JSM, Lam SY, Poon LLM, Yuen KY, Seto WH. *The effects of temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus*. Adv Virol. 2011;2011:734690.
63. Casanova L, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. *Survival of surrogate coronaviruses in water*. Elsevier Enhanced Reader [Internet], vol. 43, issue 7, p.1893-1898. 2009 [citado 1 de septiembre de 2022].
64. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. *Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1*. N Engl J Med. 2020;382(16):1564-7.
65. Xu D, Zhang Z, Jin L, Chu F, Mao Y, Wang H, et al. *Persistent shedding of viable SARS-CoV in urine and stool of SARS patients during the convalescent phase*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24(3):165-71.
66. Turban JL, Keuroghlian AS, Mayer KH. *Sexual health in the SARS-CoV-2 era*. Ann Intern Med. 2020;M20-2004.

67. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. *Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn*. JAMA. 2020;323(18):1846-8.
68. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. *Antibodies in infants born to mothers with COVID-19 pneumonia*. JAMA. 2020;323(18):1848-9.
69. Nomura T, Nazmul T, Yoshimoto R, Higashiura A, Oda K, Sakaguchi T. *Ethanol susceptibility of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses*. Biocontrol Science. 2021;26(3):177-80.
70. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Información básica sobre la COVID-19* [Internet]. [citado 13 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19>
71. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *COVID-19* [Internet]. [citado 13 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19>
72. Vaira LA, Salzano G, Deiana G, De Riu G. *Anosmia and ageusia: common findings in COVID-19 patients*. Laryngoscope. 2020;130(7):1787.
73. European Medicines Agency (EMA). *COVID-19 vaccines: key facts* [Internet]. 2020 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines/covid-19-vaccines-key-facts>
74. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. *Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome*. Lancet Respir Med. 2020;8(4):420-2.
75. Hu B, Huang S, Yin L. *The cytokine storm and COVID-19*. J Med Virol. 2021;93(1):250-6.
76. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. *The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease*. Autoimmun Rev. 2020;19(6):102537.
77. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, Hasebe R, Tanaka Y, Murakami M, et al. *How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality*. Inflamm Regen. 2020;40:37.
78. Copaescu A, Smibert O, Gibson A, Phillips EJ, Trubiano JA. *The role of IL-6 and other mediators in the cytokine storm associated with SARS-CoV-2 infection*. J Allergy Clin Immunol. 2020;146(3):518-534.e1.

79. Zhou JJ, Fang DY, Fu J, Tian J, Zhou JM, Yan HJ, et al. *Infection and replication of avian influenza H5N1 virus in an infected human*. *Virus Genes*. 2009;39(1):76-80.
80. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
81. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. *Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019*. *J Clin Invest*. 130(5):2620-9.
82. Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpirt W, et al. *Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19*. *Theranostics*. 2021;11(1):316-29.
83. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, qi Y, et al. *Aberrant pathogenic GM-CSF⁺ T cells and inflammatory CD14⁺ CD16⁺ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus*. *Immunology*; 2020 feb.
84. Du F, Liu B, Zhang S. *COVID-19: the role of excessive cytokine release and potential ACE2 down-regulation in promoting hypercoagulable state associated with severe illness*. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;51(2):313-29.
85. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. *Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients*. *EBioMedicine*. 2020;55:102763.
86. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. *Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19)*. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
87. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. *Mild or moderate COVID-19*. *N Engl J Med*. 2020;383:1757-1766.
88. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). *Fact sheet for patients and caregivers. Emergency use authorization (EUA) of LAGEVRIO™ (molnupiravir) capsules for coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. Merck Sharp & Dohme (MSD) [Internet]. 2023 [citado 21 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/155055/download>
89. Bernal AJ, Gomes da Silva M, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. *Molnupiravir for oral treatment of COVID-19 in nonhospitalized patients*. *N Engl J Med*. 2022;386:509-520.

90. Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, et al. *Remdesivir, molnupiravir and nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 omicron and other variants of concern*. Antiviral Research. 2022;198:105252.
91. Mahase E. *COVID-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports*. BMJ. 2021;n2713.
92. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). Fact sheet for patients, parents, and caregivers. Emergency use authorization (EUA) of paxlovid for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Pfizer Labs. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/155051/download>
93. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. *Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro*. Cell Res. 2020;30(3):269-71.
94. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. National Institutes of Health. [citado 21 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
95. Centers for Disease Control and Prevention. *COVID-19 and your health* [Internet]. 2020 [citado 21 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>
96. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, et al. *Early remdesivir to prevent progression to severe COVID-19 in outpatients*. N Engl J Med. 2020; 386:305-315.
97. Al-Awwal N, Dweik F, Mahdi S, El-Dweik M, Anderson SH. *A review of SARS-CoV-2 disease (COVID-19): pandemic in our time*. Pathogens. 2022;11(3):368.
98. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). *Technical data sheet for veklury* [Internet]. 2020 [citado 21 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/medicines/covid-19/veklury/veklury_pi.pdf
99. Romero A. SARS-CoV-2: papel de las variantes y novedades terapéuticas. *Tratamiento de la COVID-19, ¿qué hemos aprendido hasta ahora?* I Congreso de la Sociedad Andaluza de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (SAMICE); 2022; Málaga (España).
100. Takashita E, Yamayoshi S, Simon V, van Bakel H, Sordillo EM, Pekosz A, et al. *Efficacy of antibodies and antiviral drugs against Omicron BA.2.12.1, BA.4, and BA.5 subvariants*. N Engl J Med. 2022;387(5):468-70.
101. Zhou H, Yang J, Zhou C, Chen B, Fang H, Chen S, et al. *A review of SARS-CoV-2: compared with SARS-CoV and MERS-CoV*. Frontiers in Medicine. 2021;8.

102. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *Información acerca del uso de hidroxiclороquina para el tratamiento de COVID-19* [Internet]. 2020 [citado 14 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/informacion-acerca-del-uso-de-hidroxiclороquina-para-el-tratamiento-de-covid-19/>
103. 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;382(19):1787-99.
104. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. *The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro*. Antiviral Research. 2020;178:104787.
105. López-Medina E, López P, Hurtado IC, Dávalos DM, Ramirez O, Martínez E, et al. *Effect of ivermectin on time to resolution of symptoms among adults with mild COVID-19: a randomized clinical trial*. JAMA. 2021;325(14):1426-35.
106. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, et al. *Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial*. JAMA. 2021;325(7):632-44.
107. Baum A, Ajithdoss D, Copin R, Zhou A, Lanza K, Negron N, et al. *REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters*. Science. 2020;370(6520):1110-5.
108. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. *REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with COVID-19*. N Engl J Med. 2021;384:238-251.
109. Stanford University. *Coronavirus antiviral and resistance database. Susceptibility summaries (tabla 1)*. [Internet]. 2023 [citado 15 de junio de 2023]. Disponible en: <https://covdb.stanford.edu/susceptibility-data/table-mab-susc/>
110. Levin MJ, Ustianowski A, de Wit S, Launay O, Avila M, Templeton A, et al. *Intramuscular AZD7442 (tixagevimab–cilgavimab) for prevention of COVID-19*. N Engl J Med 2022; 386:2188-2200.
111. Dougan M, Azizad M, Chen P, Feldman B, Frieman M, Igbinador A, et al. *Bebtelovimab, alone or together with bamlanivimab and etesevimab, as a broadly neutralizing monoclonal antibody treatment for mild to moderate, ambulatory COVID-19*. medRxiv; 2022;p.2022.03.10.22272100.
112. Zumbrun EE, Kaku CI, Dillinger L, Zak SE, Kuehne AI, Bakken RR, et al. *Prophylactic administration of the monoclonal antibody adintrevimab protects against SARS-CoV-2 in hamster and non-human primate models of COVID-19*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2022;67(1):e01353-22.

113. Mungmunpantipantip R, Wiwanitkit V. *Regdanvimab treatment of COVID-19*. Infect Chemother. 2022;54(3):547.
114. Hong SI, Ryu BH, Hong KW, Bae IG, Cho OH. *Real world experience with regdanvimab treatment of mild-to-moderate coronavirus disease-19 in a COVID-19 designated hospital of Korea*. Infect Chemother. 2022;54(1):114.
115. Ji Y, Zhang Q, Cheng L, Ge J, Wang R, Fang M, et al. *Preclinical characterization of amubarvimab and romlusevimab, a pair of non-competing neutralizing monoclonal antibody cocktail, against SARS-CoV-2*. Frontiers in Immunology. 2022;13.
116. Hoy SM. *Amubarvimab/romlusevimab: first approval*. Drugs. 2022;82(12):1327-31.
117. Monk PD, Marsden RJ, Tear VJ, Brookes J, Batten TN, Mankowski M, et al. *Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial*. The Lancet Respiratory Medicine. 2021;9(2):196-206.
118. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Susceptibilidad de la variante ómicron a los anticuerpos monoclonales y otros antivirales* [Internet]. 2023 [citado 15 de junio de 2023]. Disponible en: https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2023/03/SEIMC-Susceptibilidad-de-la-variante-omicron-a-los-anticuerpos-monoclonales-y-otros-antivirales_Marzo2023.pdf
119. Emani VR, Goswami S, Nandanoor D, Emani SR, Reddy NK, Reddy R. *Randomised controlled trials for COVID-19: evaluation of optimal randomisation methodologies—need for data validation of the completed trials and to improve ongoing and future randomised trial designs*. Int J Antimicrob Agents. 2021;57(1):106222.
120. RECOVERY Collaborative Group. *Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19*. N Engl J Med. 2021;384(8):693-704.
121. Huet T, Beaussier H, Voisin O, Jouveshomme S, Dauriat G, Lazareth I, et al. *Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study*. Lancet Rheumatol. 2020;2(7):e393-400.
122. Cellina M, Orsi M, Bombaci F, Sala M, Marino P, Oliva G. *Favorable changes of CT findings in a patient with COVID-19 pneumonia after treatment with tocilizumab*. Diagnostic and Interventional Imaging. 2020;101(5):323-4.
123. Michot JM, Albiges L, Chaput N, Saada V, Pommeret F, Griscelli F, et al. *Tocilizumab, an anti-IL-6 receptor antibody, to treat COVID-19-related respiratory failure: a case report*. Annals of Oncology. 2020;31(7):961-4.

124. RECOVERY Collaborative Group. *Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial*. Lancet. 2021;397(10285):1637-45.
125. REMAP-CAP Investigators; Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, Rowan KM, Nichol AD, et al. *Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with COVID-19*. N Engl J Med. 2021;384(16):1491-1502.
126. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S, et al. *Tocilizumab in hospitalized patients with severe COVID-19 pneumonia*. N Engl J Med. 2021;384(16):1503-1516.
127. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, Fernandes AD, Harvey L, Foulkes AS, et al. *Efficacy of tocilizumab in patients hospitalized with COVID-19*. N Engl J Med. 2020;383(24):2333-2344.
128. Lescure FX, Honda H, Fowler RA, Lazar JS, Shi G, Wung P, et al. *Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet Respiratory Medicine. 2021;9(5):522-532.
129. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. *Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease*. The Lancet. 2020;395(10223):e30-1.
130. Stebbing J, Phelan A, Griffin I, Tucker C, Oechsle O, Smith D, et al. *COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments*. The Lancet Infectious Diseases. 2020;20(4):400-2.
131. Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, Tomashek KM, Wolfe CR, Ghazaryan V, et al. *Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with COVID-19*. N Engl J Med. 2021;384(9):795-807.
132. Cao Y, Wei J, Zou L, Jiang T, Wang G, Chen L, et al. *Ruxolitinib in treatment of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a multicenter, single-blind, randomized controlled trial*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2020;146(1):137-146.e3.
133. Guimarães PO, Quirk D, Furtado RH, Maia LN, Saraiva JF, Antunes MO, et al. *Tofacitinib in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia*. N Engl J Med. 2021;385(5):406-15.
134. Roschewski M, Lionakis MS, Sharman JP, Roswarski J, Goy A, Monticelli MA, et al. *Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19*. Sci Immunol. 2020;5(48):eabd0110.
135. Lazniewski M, Dermawan D, Hidayat S, Muchtaridi M, Dawson WK, Plewczynski D. *Drug repurposing for identification of potential spike inhibitors for SARS-CoV-*

- 2 using molecular docking and molecular dynamics simulations. *Methods*. 2022;203:498-510.
136. Zafirlukast. Vademécum [Ficha técnica]. [Internet]. 2016 [citado 14 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-zafirlukast-r03dc01-us>
 137. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. *Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from COVID-19*. *N Engl J Med*. 2021;1015-27.
 138. Joyner MJ, Bruno KA, Klassen SA, Kunze KL, Johnson PW, Lesser ER, et al. *Safety update: COVID-19 convalescent plasma in 20,000 hospitalized patients*. *Mayo Clinic Proceedings*. 2020;95(9):1888-97.
 139. Simonovich VA, Burgos Prats LD, Scibona P, Beruto MV, Vallone MG, Vázquez C, et al. *A randomized trial of convalescent plasma in COVID-19 severe pneumonia*. *N Engl J Med*. 2021;384(7):619-29.
 140. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J, et al. *Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and life-threatening COVID-19: a randomized clinical trial*. *JAMA*. 2020;324(5):460-70.
 141. Agarwal A, Mukherjee A, Kumar G, Chatterjee P, Bhatnagar T, Malhotra P. *Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial)*. *BMJ*. 2020;371:m3939.
 142. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. *Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(2):441-55.
 143. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. *Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection*. *Clin Microbiol Rev*. 2021 May 12;34(3):e00228-20.
 144. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, Powis J, Li AX, Paterson A, et al. *Sensitivity of nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*. *Clin Infect Dis*. 2021 Mar 15;72(6):1064-1066.
 145. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. *Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2*. *N Engl J Med*. 2020;383(13):1283-6.
 146. Khurshid Z, Zohaib S, Joshi C, Moin SF, Zafar MS, Speicher DJ. *Saliva as a non-invasive sample for the detection of SARS-CoV-2: a systematic review*. medRxiv; 2020. p. 2020.05.09.20096354.

147. Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, Kamada K, Yamashita Y, Fukumoto T, et al. *Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva*. J Infect. 2020;81(2):e145-7.
148. Zheng S, Yu F, Fan J, Zou Q, Xie G, Yang X, et al. *Saliva as a diagnostic specimen for SARS-CoV-2 by a PCR-based assay: a diagnostic validity study* [preprint]. Rochester, NY; 2020.
149. Becker D, Sandoval E, Amin A, Hoff PD, Diets A, Leonetti N, et al. *Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting*. medRxiv [preprint]; 2020.
150. DiaSorin Molecular. *Liaison® SARS-CoV-2 trimers IgG assay*. [Internet]. [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/liaisonr_sars-cov-2_trimers_igg_assay_m0870004408_a_lr_0.pdf
151. Zhou C, Zhang T, Ren H, Sun S, Yu X, Sheng J, et al. *Impact of age on duration of viral RNA shedding in patients with COVID-19*. Aging (Albany NY). 2020;12(22):22399-404.
152. Li N, Wang X, Lv T. *Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: not a rare phenomenon*. Journal of Medical Virology. 2020;92(11):2286-7.
153. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. *COVID-19 diagnosis - A review of current methods*. Biosensors and Bioelectronics. 2021;172:112752.
154. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 7.^a ed. Elsevier; p.33.
155. Cevik M, Bamford CGG, Ho A. *COVID-19 pandemic - a focused review for clinicians*. Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(7):842-7.
156. Loeffelholz MJ, Tang YW. *Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art*. Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):747-756.
157. Fernandez-Montells Rodriguez R, Nuñez Vazquez A. *Enfermedad por coronavirus 2019 (SARS-CoV-2)*. Guía Fisterra [Internet]. 2023 Disponible en: <https://www.fisterra.com/guias-clinicas/covid-19/>
158. de Salazar A, Aguilera A, Trastoy R, Fuentes A, Alados JC, Causse M, et al. *Sample pooling for SARS-CoV-2 RT-PCR screening*. Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(12):1687.e1-1687.e5.
159. Brito-Mutunayagam S, Maloney D, McAllister G, Dewar R, McHugh M, Templeton K. *Rapid detection of SARS-CoV-2 variants using allele-specific PCR*. Journal of Virological Methods. 2022;303:114497.

160. Garson JA, Badru S, Parker E, Tedder RS, McClure MO. *Highly sensitive and specific detection of the SARS-CoV-2 Delta variant by double-mismatch allele-specific real time reverse transcription PCR*. Journal of Clinical Virology. 2022;146:105049.
161. Ratcliff J, Al-Beidh F, Bibi S, Bonsall D, Costa Clemens SA, Estcourt L, et al. *Highly sensitive lineage discrimination of SARS-CoV-2 variants through allele-specific probe PCR*. Journal of Clinical Microbiology. 2022;60(4):e02283-21.
162. Møller MS, Cockburn DW, Wilkens C. *Surface plasmon resonance analysis for quantifying protein-carbohydrate interactions*. Methods Mol Biol. 2023;2657:141-150.
163. Yoo HM, Kim IH, Kim S. *Nucleic acid testing of SARS-CoV-2*. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(11):6150.
164. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health* [Internet]. 2021 [citado 22 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240018440>
165. Telenti A, Hodcroft EB, Robertson DL. *The evolution and biology of SARS-CoV-2 variants*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2022;12(5):a041390.
166. Thomson EC, Rosen LE, Shepherd JG, Spreafico R, Da Silva Filipe A, Wojcechowskyj JA, et al. *Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity*. Cell. 2021;184(5):1171-1187.e20.
167. Liu T, Chen Z, Chen W, Chen X, Hosseini M, Yang Z, et al. *A benchmarking study of SARS-CoV-2 whole-genome sequencing protocols using COVID-19 patient samples*. iScience [Internet]. 2021.
168. Payne A, Holmes N, Rakyan V, Loose M. *BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files*. Bioinformatics. 2019;35(13):2193-8.
169. Wang M, Fu A, Hu B, Tong Y, Liu R, Liu Z, et al. *Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses*. Small. 2020;16(32):2002169.
170. Caliendo AM, Hanson KE. *COVID-19: diagnosis*. UpToDate [Internet]. 2022. Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/covid-19-diagnosis?search=inmunidad%20humoral%20COVID-19%C3%A7&source=search_result&selectedTitle=13~150&usage_type=default&display_rank=13

171. DiaSorin Molecular. *Simplexa™ COVID-19 direct kit*. [citado 23 de junio de 2023]. Disponible en: <https://molecular.diasorin.com/international/kit/simplexa-covid-19-direct-kit/>
172. Zhen W, Manji R, Smith E, Berry GJ. *Comparison of four molecular in vitro diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens*. Journal of Clinical Microbiology. 2020;58(8):10.1128/jcm.00743-20.
173. Roche Diagnostics. *Cobas® liat system*. [Internet]. [citado 23 de junio de 2023]. Disponible en: <https://diagnostics.roche.com/es/es/products/instruments/cobas-liat-ins-6050.html>
174. bioMérieux España. Panel Respiratorio FilmArray™. [Internet]. [citado 23 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/panel-respiratorio-filmarraytm>
175. Qiagen. QIAstat-Dx. [Internet]. [citado 23 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/infectious-disease/qiastat-dx-syndromic-testing/qiastat-dx-na>
176. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. *Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus*. Cell. 2020;182(4):812-827.e19.
177. Centers for Disease Control and Prevention. *Enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19)* [Internet]. 2020 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
178. Wong Chew RM, Díaz Ramírez JB, Vite Velázquez X, Cortázar Maldonado LA, García Osorno ZR, Perón Medina LÁ, et al. *Caracterización genómica y variantes del virus SARS-CoV-2*. Acta Médica Grupo Ángeles. 2021;19(3):445-56.
179. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. *Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 variants*. Frontiers in Immunology. 2022;13.
180. Ministerio de Sanidad (Gobierno de España). (2023). *Actualización de la situación epidemiológica de las variantes de SARS-CoV-2 en España*. Actualización 22 de mayo de 2023. Madrid. [Internet]. 2023 [citado 13 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20230522.pdf
181. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Denis KS, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. *Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity*. Cell. 2021;184(9):2372-2383.e9.

182. Wang Q, Iketani S, Li Z, Liu L, Guo Y, Huang Y, et al. *Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants*. Cell. 2023;186(2):279-286.e8.
183. Nextstrain. *SARS-CoV-2 clade naming strategy for 2022* [Internet]. 2022 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://nextstrain.org//blog/2022-04-29-SARS-CoV-2-clade-naming-2022>
184. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. *Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution*. Kelso J, editor. Bioinformatics. 2018;34(23):4121-3.
185. CoVariants. *Overview of variants in countries* [Internet]. 2023 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://covariants.org/per-country>
186. Our World in Data. *SARS-CoV-2 sequences by variant*. [Internet]. [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/grapher/covid-variants-bar>
187. Arkhipova-Jenkins I, Helfand M, Armstrong C, Gean E, Anderson J, Paynter RA, et al. *Antibody response after SARS-CoV-2 infection and implications for immunity*. Ann Intern Med. 2021;174(6):811-21.
188. Wang B, Wang L, Kong X, Geng J, Xiao D, Ma C, et al. *Long-term coexistence of SARS-CoV-2 with antibody response in COVID-19 patients*. Journal of Medical Virology. 2020;92(9):1684-9.
189. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Pavelić E, Molnar V, Matišić V, et al. *Adaptive Immune responses and immunity to SARS-CoV-2*. Frontiers in Immunology. 2022;13.
190. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. *SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19*. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(3):1716.
191. Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. *Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development*. Adv Virus Res. 2016;96:245-286.
192. Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. *CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer*. Nat Med. 2021;27(7):1280-9.
193. Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA, Potekhin A, Bachmann F, Straub-Hohenbleicher H, et al. *Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV-2 BNT162b2 (tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients*. J Clin Invest. 2021 Jul 15;131(14):e150175.

194. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olagne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. *Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses.* JAMA. 2021;326(11):1063-5.
195. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. *The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection.* Nat Immunol. 2022;23(7):1008-20.
196. Lee E, Oh JE. *Humoral immunity against SARS-CoV-2 and the impact on COVID-19 pathogenesis.* Molecules and Cells. 2021;44(6):392-400.
197. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019.* Clin Infect Dis. 2020;71(16):2027-34.
198. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. *Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection.* JCI Insight. 2019 [citado 5 de julio de 2023];4(4).
199. Asociación de Pacientes con EPOC (APEPOC). *Anticuerpos COVID "traidores": relacionados con el empeoramiento de la enfermedad [Internet].* 2021 [citado 6 de julio de 2023].
200. Rodda LB, Morawski PA, Pruner KB, Fahning ML, Howard CA, Franko N, et al. *Imprinted SARS-CoV-2-specific memory lymphocytes define hybrid immunity.* Cell. 2022;185(9):1588-1601.e14.
201. Fluidic Analytics. *What are neutralizing antibodies – the immune system's superheroes.* [Internet]. [citado 14 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.fluidic.com/resources/what-are-neutralizing-antibodies/>
202. Zeng B, Gao L, Zhou Q, Yu K, Sun F. *Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern: a systematic review and meta-analysis.* BMC Medicine. 2022;20(1):200.
203. Yang WT, Huang WH, Liao TL, Hsiao TH, Chuang HN, Liu PY. *SARS-CoV-2 E484K Mutation narrative review: epidemiology, immune escape, clinical implications, and future considerations.* Infect Drug Resist. 2022;15:373-85.
204. Boehm E, Kronig I, Neher RA, Eckerle I, Vetter P, Kaiser L. *Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic.* Clinical Microbiology and Infection. 2021;27(8):1109-17.
205. Jiménez-Morales S, Pérez-Amado CJ, Montúfar-Robles I, Fragoso JM, Aranda-Uribe IS, Ramos-Puga DA, et al. *Importancia del genoma y de la proteína espiga del SARS-CoV-2 en la inmunopatogénesis de la COVID-19 y en la eficacia de las vacunas.* Cirugía y cirujanos. 2023;91(2):268-76.

206. Greaney AJ, Starr TN, Gilchuk P, Zost SJ, Binshtein E, Loes AN, et al. *Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition*. Cell Host & Microbe. 2021;29(1):44-57.e9.
207. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Group P study, Krammer F, et al. *The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera*. medRxiv; 2021 [citado 14 de julio de 2023]. p. 2021.01.26.21250543.
208. Paiva MHS, Guedes DRD, Docena C, Bezerra MF, Dezordi FZ, Machado LC, et al. *Multiple introductions followed by ongoing community spread of SARS-CoV-2 at one of the largest metropolitan areas of Northeast Brazil*. Viruses. 2020;12(12):1414.
209. Resende PC, Bezerra JF, Teixeira de Vasconcelos RH, Arantes I, Appolinario L, Mendonça AC, et al. *Spike E484K mutation in the first SARS-CoV-2 reinfection case confirmed in Brazil*. Virological [Internet]. 2021 [citado 14 de julio de 2023].
210. Naveca F, da Costa C, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, et al. *SARS-CoV-2 reinfection by the new Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil*. Virological [Internet]. 2021 [citado 14 de julio de 2023].
211. Nonaka CKV, Franco MM, Gräf T, Mendes AVA, Aguiar RS de, Giovanetti M, et al. *Genomic evidence of a SARS-CoV-2 reinfection case with E484K spike mutation in Brazil*. Emerg Infect Dis. 2021.
212. Faria NR, Morales Claro I, Candido D, Moyses Franco LA, Andrade PS, Coletti TM, et al. *Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings*. Virological [Internet]. 2021 [citado 14 de julio de 2023].
213. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Enfermedad por el coronavirus (COVID-19): vacunas y seguridad de las vacunas*. [Internet]. [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
214. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *Desarrollo de vacunas* [Internet]. 2020 [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%e2%80%91119/vacunas-contra-la-covid%e2%80%91119/desarrollo-de-vacunas/>
215. Agencia Europea del Medicamento (EMA). *EMA and ECDC statement on updating COVID-19 vaccines to target new SARS-CoV-2 virus variants* [Internet]. 2023 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-ecdc-statement-updating-covid-19-vaccines-target-new-sars-cov-2-virus-variants>

216. Agencia Europea del Medicamento (EMA). *ECDC-EMA statement on updating COVID-19 vaccines composition for new SARS-CoV-2 virus variants*. 2023 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/ecdc-ema-statement-updating-covid-19-vaccines-composition-new-sars-cov-2-virus-variants_en.pdf
217. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Eficacia teórica, eficacia real y protección de las vacunas* [Internet]. 2021 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/vaccine-efficacy-effectiveness-and-protection>
218. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Vacunarse contra la COVID-19* [Internet]. 2021 [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/getting-the-covid-19-vaccine>
219. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Methot N, et al. *SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron*. *Cell*. 2022;185(5):847-859.e11.
220. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Understanding how COVID-19 vaccines work* [Internet]. 2023 [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/how-they-work.html>
221. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. *Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine*. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603-15.
222. Antonelli M, Penfold RS, Merino J, Sudre CH, Molteni E, Berry S, et al. *Risk factors and disease profile of post-vaccination SARS-CoV-2 infection in UK users of the COVID Symptom Study app: a prospective, community-based, nested, case-control study*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2022;22(1):43-55.
223. Mayo Clinic. *¿Cómo funcionan los diferentes tipos de vacunas contra la COVID-19?* [Internet]. [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/coronavirus/in-depth/different-types-of-covid-19-vaccines/art-20506465>
224. Langel SN, Johnson S, Martinez CI, Tedjakusuma SN, Peinovich N, Dora EG, et al. *Adenovirus type 5 SARS-CoV-2 vaccines delivered orally or intranasally reduced disease severity and transmission in a hamster model*. *Science Translational Medicine*. 2022;14(658):eabn6868.
225. Brenner S, Jacob F, Meselson M. *An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis*. *Nature*. 1961;190(4776):576-81.

226. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Los distintos tipos de vacunas que existen* [Internet]. 2021 [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
227. Spain – COVID19 Vaccine Tracker [Internet]. [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://covid19.trackvaccines.org/country/spain/>
228. *Comirnaty 30 mcg/dosis Concent. para dispersión iny.* Vademecum [Ficha técnica]. [Internet]. [citado 27 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-comirnaty+30+mcg%2Fdosis+concent.+para+dispersion+iny._prospecto-49214
229. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. *Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine.* N Engl J Med. 2021;384(5):403-16.
230. Li G, Cappuccini F, Marchevsky NG, Aley PK, Aley R, Anslow R, et al. *Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in children aged 6–17 years: a preliminary report of COV006, a phase 2 single-blind, randomised, controlled trial.* The Lancet. 2022;399(10342):2212-25.
231. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. *Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant.* N Engl J Med. 2021;385(7):585-94.
232. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, et al. *COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant.* N Engl J Med. 2022;386(16):1532-46.
233. Kirsebom FCM, Andrews N, Sachdeva R, Stowe J, Ramsay M, Lopez Bernal J. *Effectiveness of ChAdOx1-S COVID-19 booster vaccination against the Omicron and Delta variants in England.* Nat Commun. 2022;13(1):7688.
234. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. *Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against COVID-19.* N Engl J Med. 2021;384(23):2187-201.
235. Kitchin D, Richardson SI, Mescht MA van der, Motlou T, Mzindle N, Moyo-Gwete T, et al. *Ad26.COV2.S breakthrough infections induce high titers of neutralizing antibodies against Omicron and other SARS-CoV-2 variants of concern.* CR Med. 2022;3(3).
236. Organización Mundial de la Salud (OMS). *The Novavax vaccine against COVID-19: what you need to know* [Internet]. 2022 [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-novavax-vaccine-against-covid-19-what-you-need-to-know>

237. Goyal L, Zapata M, Ajmera K, Chourasia P, Pandit R, Pandit T. *A Hitchhiker's guide to worldwide COVID-19 vaccinations: a detailed review of monovalent and bivalent vaccine schedules, COVID-19 vaccine side effects, and effectiveness against Omicron and Delta variants*. *Cureus*. 14(10):e29837.
238. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *COVID-19 vaccination* [Internet]. 2023 [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/stay-up-to-date.html>
239. Bhiman JN, Richardson SI, Lambson BE, Kgagudi P, Mzindle N, Kaldine H, et al. *Novavax NVX-COV2373 triggers neutralization of Omicron sub-lineages*. *Sci Rep*. 2023;13(1):1222.
240. Ai J, Zhang H, Zhang Y, Lin K, Zhang Y, Wu J, et al. *Omicron variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARS-CoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost*. *Emerging Microbes & Infections*. 2022;11(1):337-43.
241. Kaabi NA, Yang YK, Du LF, Xu K, Shao S, Liang Y, et al. *Safety and immunogenicity of a hybrid-type vaccine booster in BBIBP-CorV recipients in a randomized phase 2 trial*. *Nat Commun*. 2022;13(1):3654.
242. Vadrevu KM, Ganneru B, Reddy S, Jogdand H, Raju D, Sapkal G, et al. *Persistence of immunity and impact of third dose of inactivated COVID-19 vaccine against emerging variants*. *Sci Rep*. 2022;12(1):12038.
243. Ahmed TI, Rishi S, Irshad S, Aggarwal J, Happa K, Mansoor S. *Inactivated vaccine Covaxin/BBV152: a systematic review*. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2022 [citado 30 de junio de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.863162>
244. Actualización de COVID-19: vacunas bivalentes de Pfizer y Moderna COVID-19 para inmunización de refuerzo. La Carta Médica Inc. [Internet]. [citado 30 de junio de 2023]. Disponible en: <https://secure.medicalletter.org/TML-article-1660c>
245. Hause AM. *Safety monitoring of bivalent COVID-19 mRNA vaccine booster doses among persons aged ≥12 years — United States*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2022 [citado 30 de junio de 2023];71. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/71/wr/mm7144a3.htm>
246. Wagenhäuser I, Reusch J, Gabel A, Krone LB, Kurzai O, Petri N, et al. *Bivalent BNT162b2 mRNA original/omicron BA.4-5 booster vaccination: adverse reactions and inability to work compared with the monovalent COVID-19 booster*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2023;29(4):554-6.
247. *Comirnaty Original/Omicron Ba.1 (15 mcg/15 mcg) - Dispersión inyectable*. Vademecum. [Internet]. [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en:

- <https://www.vademecum.com/medicamentos/comirnaty-original-omicron-ba-1-35444.html>
248. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Comirnaty Original/Omicron BA.4-5 (15/15 microgramos)/dosis dispersión inyectable [Ficha técnica]. [Internet]. 2022 [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/1201528008/P_1201528008.html
249. Agencia Europea del Medicamento (EMA). *Comirnaty*. [Internet]. [citado 3 de julio de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/comirnaty-epar-medicine-overview_es.pdf
250. Winokur P, Gayed J, Fitz-Patrick D, Thomas SJ, Diya O, Lockhart S, et al. *Bivalent Omicron BA.1-adapted BNT162b2 booster in adults older than 55 years*. *N Engl J Med*. 2023;388(3):214-27.
251. Yamin D, Yechezkel M, Arbel R, Beckenstein T, Sergienko R, Duskin-Bitan H, et al. *Safety of monovalent and bivalent BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine boosters in at-risk populations in Israel: a large-scale, retrospective, self-controlled case series study*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2023;0(0).
252. Scheaffer SM, Lee D, Whitener B, Ying B, Wu K, Liang CY, et al. *Bivalent SARS-CoV-2 mRNA vaccines increase breadth of neutralization and protect against the BA.5 Omicron variant in mice*. *Nat Med*. 2023;29(1):247-57.
253. Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, Walsh SR, Essink B, Brosz A, et al. *A bivalent Omicron-containing booster vaccine against COVID-19*. *N Engl J Med*. 2022;387(14):1279-91.
254. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Estado de vacuna contra la COVID-19* [Internet]. 2021 [citado 26 de junio de 2023]. Disponible en: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_16Feb2021.pdf
255. *Virus frente a vacunas, una batalla evolutiva que debe ganar la ciencia*. Vacunación COVID-19 Gobierno de España [Internet]. [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <http://www.vacunacovid.gob.es/voces-expertas/virus-frente-vacunas-una-batalla-evolutiva-que-debe-ganar-la-ciencia>
256. Gutiérrez-Álvarez J, Honrubia J, Sanz-Bravo A, González-Miranda E, Fernández-Delgado R, Rejas MT, et al. *Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccine based on a propagation-defective RNA replicon elicited sterilizing immunity in mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(43):e2111075118.
257. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Luis Enjuanes: “Vamos a por una vacuna intranasal y de una sola dosis muy potente”. [Entrevista]. 2021

[citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/luis-enjuanes-vamos-por-una-vacuna-intranasal-y-de-una-sola-dosis-muy-potente>

258. Instituto de Salud Carlos III (Gobierno de España). *El ISCIII y la COVID-19: labor durante la pandemia*. Madrid [Internet]. 2020 [citado 8 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.isciii.es/Noticias/Noticias/Documents/INFORME%20FINAL%20ISCIII%20PANDEMIA.pdf>
259. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients*. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1478-88.
260. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Yang Y, Jiang D, et al. *COVID-19 diagnosis and study of serum SARS-CoV-2 specific IgA, IgM and IgG by chemiluminescence immunoanalysis*. medRxiv; 2020 [citado 18 de julio de 2023]. p. 2020.04.17.20064907.
261. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. *Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19)*. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(15):778-85.
262. Yu H qiong, Sun B qing, Fang Z fu, Zhao J cun, Liu X yu, Li Y min, et al. *Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients*. *Eur Respir J*. 2020;56(2):2001526.
263. Montesinos I, Gruson D, Kabamba B, Dahma H, Van den Wijngaert S, Reza S, et al. *Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies*. *Journal of Clinical Virology*. 2020;128:104413.
264. Tang MS, Hock KG, Logsdon NM, Hayes JE, Gronowski AM, Anderson NW, et al. *Clinical performance of two SARS-CoV-2 serologic assays*. *Clin Chem*. 2020;66(8):1055-62.
265. Yang HS, Racine-Brzostek SE, Lee WT, Hunt D, Yee J, Chen Z, et al. *SARS-CoV-2 antibody characterization in emergency department, hospitalized and convalescent patients by two semi-quantitative immunoassays*. *Clin Chim Acta*. 2020;509:117-25.
266. Zhang G, Nie S, Zhang Z, Zhang Z. *Longitudinal change of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies in patients with coronavirus disease 2019*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020;222(2):183-8.
267. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. *Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting*

- antibodies against SARS-CoV-2*. Journal of Clinical Microbiology. 2020;58(6):10.1128/jcm.00461-20.
268. Victor M. Corman, Ali M. Albarrak, Ali Senosi Omrani, Mohammed M. Albarrak, Mohamed Elamin Farah, Malak Almasri, et al. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2016. Vol. 62, issue 4, p. 477–483.
 269. Chan KH, Cheng VCC, Woo PCY, Lau SKP, Poon LLM, Guan Y, et al. *Serological responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection and cross-reactivity with human coronaviruses 229E, OC43, and NL63*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2005;12(11):1317-21.
 270. Shi Y, Wan Z, Li L, Li P, Li C, Ma Q, et al. *Antibody responses against SARS-coronavirus and its nucleocapsid in SARS patients*. *Journal of Clinical Virology*. 2004;31(1):66-8.
 271. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. *Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study*. *The Journal of Immunology*. 2011;186(12):7264-8.
 272. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. *Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed Individuals*. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15.
 273. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG. *Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-analysis*. *Diagnostics*. 2020;10(5):319.
 274. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. *Causes, consequences, and reversal of immune system aging*. *J Clin Invest*. 2013;123(3):958-65.
 275. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. Spain - COVID-19 Overview. [Internet]. [citado 13 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/region/spain>
 276. Organización Mundial de la Salud (OMS). Weekly epidemiological update - 1 December 2020 [Internet]. 2020 [citado 13 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---1-december-2020>
 277. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *La EMA recomienda la autorización de la primera vacuna frente a la COVID-19* [Internet]. 2020 [citado 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/la-ema-recomienda-la-autorizacion-de-la-primera-vacuna-frente-a-la-covid-19/>

278. ¿Cuándo me vacuno? Vacunación COVID-19 Gobierno de España [Internet]. [citado 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.vacunacovid.gob.es/preguntas-y-respuestas/cuando-me-vacuno>
279. Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE. *Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells*. Journal of General Virology. 2003;84(12):3291-303.
280. Qinfen Z, Jinming C, Xiaojun H, Huanying Z, Jicheng H, Ling F, et al. *The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells*. Journal of Medical Virology. 2004;73(3):332-7.
281. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RWAL, van der Meer Y, Caly L, et al. *SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology*. J Gen Virol. 2020;101(9):925-40.
282. Zupin L, Fontana F, Gratton R, Milani M, Clemente L, Pascolo L, et al. *SARS-CoV-2 short-time infection produces relevant cytopathic effects in Vero E6 cell line*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021;18(17):9020.
283. Pereira HG. *The cytopathic effect of animal viruses*. Adv Virus Res. 1961;8:245-85.
284. Gómez-Lucía E. *Cytopathic effect*. Diagnosis in virology course. Innovirology Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <https://www.ucm.es/innovirology/17-cytopathic-effect>
285. Katze MG, Korth MJ, Law GL, Nathanson N, editores. Front Matter. En: Viral Pathogenesis (Third Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2016 [citado 25 de julio de 2023]. p. iii. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009642010016>
286. Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennet: Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 8ª ed. Elsevier; p.235.
287. Saadat S, Rikhtegaran Tehrani Z, Logue J, Newman M, Frieman MB, Harris AD, et al. *Binding and neutralization antibody titers after a single vaccine dose in health care workers previously infected with SARS-CoV-2*. JAMA. 2021;325(14):1467-9.
288. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, et al. *Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2*. Nat Med. 2021;27(6):981-4.
289. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Krammer F, Simon V, et al. *SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation*. Lancet Microbe. 2021;2(7):e283-4.

290. Cheng MH, Krieger JM, Kaynak B, Arditi M, Bahar I. *Impact of South African 501.V2 variant on SARS-CoV-2 spike infectivity and neutralization: a structure-based computational assessment*. bioRxiv [preprint]; 2021 [citado 19 de julio de 2023]. p. 2021.01.10.426143.
291. Wang WB, Liang Y, Jin YQ, Zhang J, Su JG, Li QM. *E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: binding free energy calculation studies*. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2021;109:108035.
292. Xie X, Liu Y, Liu J, Zhang X, Zou J, Fontes-Garfias CR, et al. *Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera*. Nat Med. 2021;27(4):620-1.
293. Wu K, Werner AP, Koch M, Choi A, Narayanan E, Stewart-Jones GBE, et al. *Serum neutralizing activity elicited by mRNA-1273 vaccine*. N Engl J Med. 2021;384:1468-1470.
294. Tada T, Dcosta BM, Samanovic-Golden M, Herati RS, Cornelius A, Mulligan MJ, et al. *Neutralization of viruses with European, South African, and United States SARS-CoV-2 variant spike proteins by convalescent sera and BNT162b2 mRNA vaccine-elicited antibodies*. bioRxiv [preprint]; 2021 [citado 19 de julio de 2023]. p. 2021.02.05.430003.
295. Liu Y, Liu J, Xia H, Zhang X, Fontes-Garfias CR, Swanson KA, et al. *Neutralizing activity of BNT162b2-elicited serum*. N Engl J Med. 2021;384:1466-1468.
296. Stamatatos L, Czartoski J, Wan YH, Homad LJ, Rubin V, Glantz H, et al. *mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection*. Science. 2021;372(6549):1413-8.
297. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. *SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma*. Nat Med. 2021;27(4):622-5.
298. Huang KYA, Tan TK, Chen TH, Huang CG, Harvey R, Hussain S, et al. *Breadth and function of antibody response to acute SARS-CoV-2 infection in humans*. PLOS Pathogens. 2021;17(2):e1009352.
299. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. *Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2*. Nature. 2021;591(7851):639-644.
300. CoVariants. Shared mutations [Internet]. [citado 6 de julio de 2023]. Disponible en: <https://covariants.org/shared-mutations>

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características epidemiológicas de SARS-CoV, MERS y SARS-CoV-2	33
Tabla 2. Comparación del tiempo de permanencia entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 sobre ciertas superficies	51
Tabla 3. Síntomas, secreción de citoquinas y linfopenia de células T por COVID-19	54
Tabla 4. Diferencias entre remdesivir, nirmatrelvir/ritonavir y molnupiravir	58
Tabla 5. Eficacia <i>in vitro</i> de fármacos antivirales frente a la variante Ómicron	59
Tabla 6. Anticuerpos monoclonales usados para la COVID-19 aprobados por la FDA	66
Tabla 7. Anticuerpos monoclonales usados para la COVID-19 en otros estudios	67
Tabla 8. Clasificación de las variantes de SARS-CoV-2 y sus nomenclaturas	101
Tabla 9. Variantes de preocupación, mutaciones en la proteína espícula	132
Tabla 10. Resultados positivos de IgG e IgM + IgA	174
Tabla 11. Tasas positivas de detección de IgA + IgM e IgG	176
Tabla 12. Títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes	196

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2	34
Figura 2. Estructura genómica del SARS-CoV-2	34
Figura 3. Esquema de las poliproteínas pp1a y pp1ab	35
Figura 4. Estructura de la espícula de SARS-CoV-2	38
Figura 5. Estructura de la proteína M	40
Figura 6. Unión de RBD a ACE-2 en la célula huésped	42
Figura 7. Unión de furina entre los dominios S1 y S2	43
Figura 8. Conformación pre y postfusión de la espícula del SARS-CoV-2	43
Figura 9. Entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped	44
Figura 10. Mecanismo de patogénesis de SARS-CoV-2	46
Figura 11. Representación esquemática de transmisión zoonótica de SARS-CoV-1, MERS y SARS-CoV-2	49
Figura 12. Tendencia dinámica de la tasa de positividad para IgM + IgA e IgG	175
Figura 13. Resultados de las pruebas serológicas por edad	177
Figura 14. Diagrama de cajas y bigotes	178
Figura 15. Títulos de neutralización	195

ÍNDICE DE IMÁGENES

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Mutaciones en la secuencia de la espícula del SARS-CoV-2	96
Imagen 2. Árbol filogenético de variantes de SARS-CoV-2	102
Imagen 3. Distribución de variantes en el mundo	103
Imagen 4. Distribución de variantes circulantes de SARS-CoV-2 en España	104
Imagen 5. Distribución de variante Ómicron en España	105
Imagen 6. Respuesta humoral y celular	111
Imagen 7. Comparativa de inmunidad de memoria específica	120
Imagen 8. Clasificación de anticuerpos neutralizantes	123
Imagen 9. Mecanismo de acción de anticuerpos neutralizantes	124
Imagen 10. Relación entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de la vacuna y el riesgo de infectarse con SARS-CoV-2	136
Imagen 11. Diferencia entre inmunidad natural	136
Imagen 12. Línea celular Vero E6 sin infectar	197
Imagen 13. Línea celular Vero E6 infectada por SARS-CoV-2 de la cepa salvaje	198
Imagen 14. Línea celular Vero E6 infectada por SARS-CoV-2 Alfa (B.1.1.7)	199

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Relación filogenética entre los coronavirus de murciélagos, pangolín y SARS-CoV-2	48
Esquema 2. Tormenta de citoquinas en la COVID-19	74
Esquema 3. Ensayo ELISA	78
Esquema 4. Técnicas para la secuenciación del genoma	85
Esquema 5. Pruebas de ácidos nucleicos para el SARS-CoV-2	87
Esquema 6. Métodos analíticos para la detección de SARS-CoV-2	88
Esquema 7. Desarrollo de células B	114
Esquema 8. Vacuna de ARNm	140
Esquema 9. Vacuna de vector viral	143
Esquema 10. Vacuna de subunidades proteicas	145
Esquema 11. Procedimiento de neutralización	191

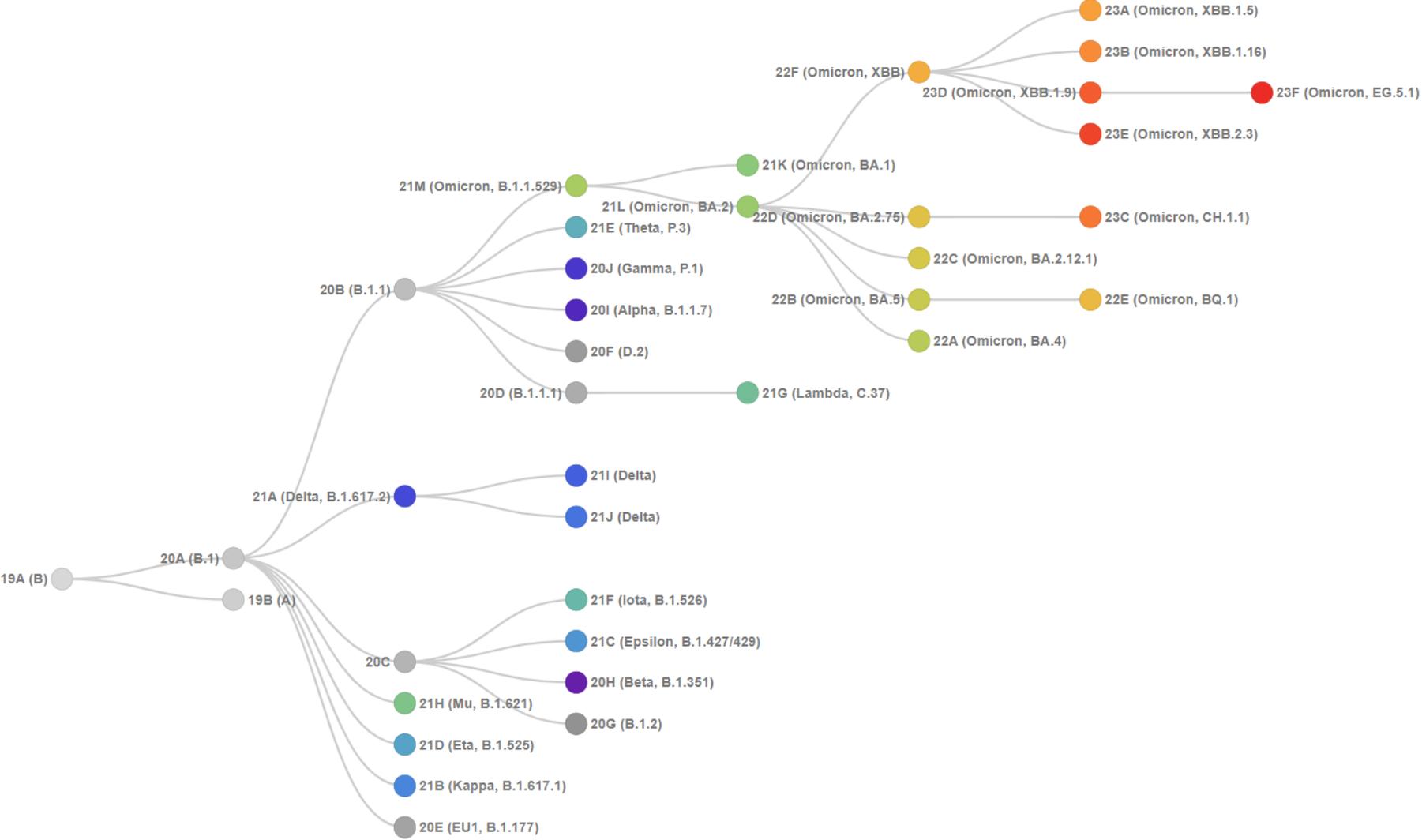
ANEXOS

ANEXO 1. Mutaciones de sublinajes de Ómicron (actualizado a día 24 de enero de 2024 (300).

21K (Omicron) (BA.1)	21L (Omicron) (BA.2)	22A & 22B (Omicron) (BA.4&5)	22D (Omicron) (BA.2.75)	22E (Omicron) (BQ.1)	22F (Omicron) (XBB)	23A (Omicron) (XBB.1.5)	23C (Omicron) (CH.1.1)	23F (Omicron) (EG.5.1)	23G (Omicron) (XBB.1.5.70)	23H (Omicron) (HK.3)	23I (Omicron) (BA.2.86)
Shared mutations											
Sort by: Commonness <input checked="" type="radio"/> Position											
S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T	S: T 19 T
S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24	S: L 24
S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25	S: P 25
S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26	S: P 26
S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S	S: A 27 S
S: H 69	S: H 69			S: H 69				S: Q 52 H		S: Q 52 H	
S: V 70	S: V 70			S: V 70							S: H 69
					S: V 83 A	S: V 83 A		S: V 83 A	S: V 83 A	S: V 83 A	S: V 83 A
S: G 142	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D	S: G 142 D
S: Y 144					S: Y 144	S: Y 144		S: Y 144	S: Y 144	S: Y 144	S: Y 144
					S: H 146 Q	S: H 146 Q		S: H 146 Q	S: H 146 Q	S: H 146 Q	S: H 146 Q
			S: K 147 E				S: K 147 E				
			S: W 152 R				S: W 152 R				
			S: F 157 L				S: F 157 L				S: F 157 S
					S: Q 183 E	S: Q 183 E		S: Q 183 E	S: Q 183 E	S: Q 183 E	S: Q 183 E
			S: T 210 V				S: T 210 V				
S: N 211											S: N 211
S: L 212 T											S: L 212 T
	S: V 213 G	S: V 213 G	S: V 213 G	S: V 213 G	S: V 213 E	S: V 213 E	S: V 213 G	S: V 213 E	S: V 213 E	S: V 213 E	S: V 213 G
						S: G 252 V		S: G 252 V	S: G 252 V	S: G 252 V	S: G 252 V
			S: G 257 S				S: G 257 S				
S: G 339 D	S: G 339 D	S: G 339 D	S: G 339 H	S: G 339 D	S: G 339 H	S: G 339 H	S: G 339 H	S: G 339 H	S: G 339 H	S: G 339 H	S: G 339 H
					S: R 346 T	S: R 346 T	S: R 346 T	S: R 346 T	S: R 346 T	S: R 346 T	S: R 346 T
					S: L 368 T	S: L 368 T		S: L 368 T	S: L 368 T	S: L 368 T	S: L 368 T
S: S 371 L	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F	S: S 371 F
S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P	S: S 373 P
S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F	S: S 375 F
	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A	S: T 376 A
	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N	S: D 405 N
	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S	S: R 408 S
S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N	S: K 417 N
S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K	S: N 440 K
				S: K 444 T			S: K 444 T				
					S: V 445 P	S: V 445 P		S: V 445 P	S: V 445 P	S: V 445 P	S: V 445 H
S: G 446 S			S: G 446 S		S: G 446 S	S: G 446 S		S: G 446 S	S: G 446 S	S: G 446 S	S: G 446 S
		S: L 452 R		S: L 452 R			S: L 452 R				S: L 452 W
								S: L 455 F	S: L 455 F	S: L 455 F	
			S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K	S: N 460 K
S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N	S: S 477 N
S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K	S: T 478 K
S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 A	S: E 484 K
		S: F 486 V		S: F 486 V	S: F 486 S	S: F 486 P	S: F 486 S	S: F 486 P	S: F 486 P	S: F 486 S	S: F 486 P
					S: F 490 S	S: F 490 S		S: F 490 S	S: F 490 S	S: F 490 S	
S: Q 493 R	S: Q 493 R		S: R 493 Q	S: Q 493 Q	S: R 493 Q	S: Q 493 Q	S: R 493 Q	S: R 493 Q	S: R 493 Q	S: R 493 Q	S: R 493 Q
S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R	S: Q 498 R
S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y
S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H	S: Y 505 H
S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G	S: D 614 G
S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y	S: H 655 Y
S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K	S: N 679 K
S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H	S: P 681 H
S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K	S: N 764 K
S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y	S: D 796 Y
S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H	S: Q 954 H
S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K	S: N 969 K

21K (Omicron) (BA.1)	21L (Omicron) (BA.2)	22A & 22B (Omicron) (BA.4&5)	22D (Omicron) (BA.2.75)	22E (Omicron) (BQ.1)	22F (Omicron) (XBB)	23A (Omicron) (XBB.1.5)	23C (Omicron) (CH.1.1)	23F (Omicron) (EG.5.1)	23G (Omicron) (XBB.1.5.70)	23H (Omicron) (HK.3)	23I (Omicron) (BA.2.86)
Shared mutations											
Sort by: Commonness <input type="radio"/> Position <input checked="" type="radio"/>											
Other mutations											
S: A 67 V											S: R 21 T
S: T 95 I											S: S 50 L
S: V 143 I											S: V 127 F
S: Y 145 D											S: R 158 G
S: G 496 S											S: L 216 F
S: T 547 K											S: H 245 N
S: N 856 K											S: A 264 D
S: L 981 F											S: I 332 V
											S: K 356 T
											S: R 403 K
											S: N 450 D
											S: N 481 K
											S: V 483 I
											S: E 554 K
											S: A 570 V
											S: P 621 S
											S: S 939 F
											S: P 1143 L

ANEXO 2. Árbol filogenético de variantes del SARS-CoV-2 clasificadas por clados (actualizado a 20 de octubre de 2023) (183).



ANEXO 3. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 2.

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a. ANTONIO SALMERON GARCIA como secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Capacidad de neutralización de los anticuerpos generados tras la vacunación frente a las nuevas variantes de SARS-CoV-2
Protocolo, Versión: 1
HIP, Versión: 1
CI, Versión: 1

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la Investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Granada a 24/03/2021

D/D^a. ANTONIO SALMERON GARCIA, como Secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada



Código Seguro De Verificación:	d796c13babcb53ff198c01ca818c03a1743031f3	Fecha	24/03/2021
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.		
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia		
Url De Verificación	http://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificaFirmaDocumento.1faca/code/d796c13babcb53ff198c01ca818c03a1743031f3	Página	1/3



ANEXO 4. Concesión de premio de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Andalucía Oriental por el artículo publicado en el capítulo 2.



LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA
DE
ANDALUCÍA ORIENTAL

CERTIFICA

Que el trabajo científico titulado “IN VITRO NEUTRALIZING ACTIVITY OF BNT162B2 MRNA-INDUCED ANTIBODIES AGAINST FULL B.1.351 SARS-COV-2 VARIANT” del que son autores *Esther Serrano Conde; Alba Leyva; Ana Fuentes; Adolfo De Salazar; Natalia Chueca; Sonia Pérez Castro; Benito Regueiro; Almudena Rojas; Joaquín Mendoza; José Rojas; Federico García*, ha merecido EX AEQUO el PREMIO “REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE ANDALUCÍA ORIENTAL”, convocado por la Real Academia en el curso 2022, y ha sido entregado en Granada, el día veintisiete de enero de dos mil veintitrés en la solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2023.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente en Granada a veintisiete de enero de dos mil veintitrés.


Armando Zuluaga Gómez
Presidente




Manuel García Morillas
Académico Secretario

ANEXO 5. Concesión de título de Académica Correspondiente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Andalucía Oriental por el artículo publicado en el capítulo 2.



*Real Academia de Medicina y Cirugía
de Andalucía Oriental, Ceuta y Melilla*

**TÍTULO DE
ACADÉMICO CORRESPONDIENTE**

*A favor de la DRA. D^a. ESTHER
SERRANO - CONDE SÁNCHEZ por su
relevante personalidad científica, y a tenor
de lo previsto en el artículo 26.3 de los
Estatutos, se ha hecho acreedora de tan
honrosa distinción.*

Granada 28 de septiembre de 2023

*El Presidente
Armando Zuluaga Gómez*



*El Secretario
Manuel García Morillas*

