



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

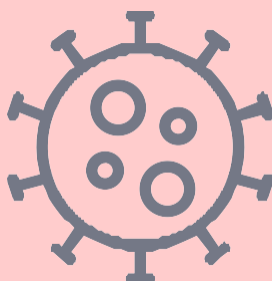
Doctorado en Medicina

**CINÉTICA DE LA CARGA VIRAL (ARN) DEL
SARS-COV-2 EN EL TRACTO RESPIRATORIO
SUPERIOR DE PACIENTES CON COVID-19**

TESIS DOCTORAL

Rosa Costa Primo

Dirigida por David Navarro Ortega



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA [Logo]
Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Mayo 2023



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA [ò 人]
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**CINÉTICA DE LA CARGA VIRAL (ARN) DEL SARS-
COV-2 EN EL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR DE
PACIENTES CON COVID-19**



David Navarro Ortega, jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la graduada Rosa María Costa Primo, titulado “*Cinética de la carga viral (ARN) del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes con COVID-19*” ha sido realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisada y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a mayo de 2023,

A handwritten signature in dark ink, consisting of a stylized 'D' followed by a horizontal line and a curved flourish.

David Navarro Ortega

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos los que me han acompañado en este largo camino de mi tesis doctoral en Microbiología, llevada a cabo en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Cada uno de ustedes ha sido fundamental para alcanzar este importante hito en mi carrera académica.

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, mi hermano y mi pareja por su incondicional apoyo durante todo este tiempo. Sin su amor, comprensión y paciencia, este desafío no habría sido posible. Su apoyo emocional me ha brindado la fuerza necesaria para superar los momentos más difíciles.

También deseo mencionar a los residentes con los que he compartido la residencia, especialmente a Paula, David y Carmelo, quienes han hecho que esta experiencia sea aún más gratificante y enriquecedora. Aprecio su amistad, las risas compartidas, las experiencias vividas y los conocimientos que me han transmitido. Ha sido un verdadero placer conocerlos.

Además, quiero expresar mi gratitud a Bea, Felipe, Eliseo y Estela con los que he tenido la suerte de trabajar durante estos 4 años. Cada uno de ellos ha dejado una huella imborrable en mi desarrollo profesional. He aprendido mucho y siempre valoraré la valiosa experiencia compartida.

Por último, quisiera dedicar un agradecimiento especial a mi director de tesis, el doctor David Navarro, por su dedicación y constancia. Gracias por ser un modelo a seguir, por enseñarme a pensar de forma crítica y por motivarme constantemente con tu pasión por la ciencia.

En resumen, agradezco a todos por ser parte de este importante logro en mi carrera. Vuestras palabras de aliento, vuestra presencia y sabiduría han sido una fuente constante de inspiración para mí. Espero seguir contando con vuestra amistad y apoyo en el futuro.

A mis padres

Presentación

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones en virtud del nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Los resultados de esta tesis doctoral se encuentran resumidos en los siguientes artículos científicos:

- I. Costa R, Bueno F, Albert E, Torres I, Carbonell-Sahuquillo S, Barrés-Fernández A, Sánchez D, Padrón C, Colomina J, Lázaro Carreño MI, Bretón-Martínez JR, Martínez-Costa C, Navarro D. Upper respiratory tract SARS-CoV-2 RNA loads in symptomatic and asymptomatic children and adults. Clin Microbiol Infect. 2021 Dec;27(12): 1858.e1-1858.e7.
- II. Costa R, Bueno F, Giménez E, Bracho A, Albert E, Carretero D, de Michelena P, Martínez-Costa C, González-Candelas F, Navarro D. Initial viral load and decay kinetics of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the upper respiratory tract of adults and children. J Infect. 2021 oct;83(4):496-522.
- III. Costa R, Olea B, Bracho MA, Albert E, de Michelena P, Martínez-Costa C, González-Candelas F, Navarro D. RNA viral loads of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants in nasopharyngeal specimens at diagnosis stratified by age, clinical presentation and vaccination status. J Infect. 2022 Apr;84(4):579-613.
- IV. Costa R, Alberola J, Olea B, Gozalbo-Rovira R, Giménez E, Cuevas-Ferrando E, Torres I, Albert E, Carbonell N, Ferreres J, Sánchez G, Rodríguez-Díaz J, Blasco ML, Navarro D. Combined kinetic analysis of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and virus-specific antibodies in critically ill adult COVID-19 patients. Sci Rep. 2022 May 18;12(1):8273.

- V. Costa R, Signes-Costa J, Olea B, Tarraso J, Carbonell N, Blasco ML, Navarro D. Initial SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens is not associated with severity and midterm resolution of pneumonia in COVID-19 patients. *J Infect.* 2022 Dec;85(6):702-769.

Abreviaturas y Acrónimos

- °C: Grados centígrados
- ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2
- AcNt: Anticuerpos neutralizantes
- ARN: Ácido ribonucleico
- CoV: Coronavirus
- COVID-19: Coronavirus 2019
- CT: Cycle threshold, Umbral de ciclo
- CV: Carga viral
- CVF: Capacidad Vital Forzada
- DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono
- E: Proteína de envoltura
- ENF: Exudado nasofaríngeo
- GUSB: B-glucuronidasa
- HCoV: Coronavirus humanos
- HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia
- LFIC: Dispositivo inmunocromatografía de flujo lateral
- M: Membrana
- MERS: Síndrome respiratorio de Oriente Medio
- N: Nucleocápside
- ND: No detectado
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: Odds ratio
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RALE: Evaluación radiográfica del edema pulmonar
- RBD: Dominio de unión al receptor.
- RE: Retículo endoplasmático
- RT: Real time
- Rx: Radiografía de tórax.
- S: Espícula
- SARS-CoV-2: Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2
- SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

- TM2: Transmembrana 2
- TMPRSS2: Serina proteasa celular de transmembrana 2
- TRS: Tracto respiratorio superior
- UCI: Unidad de cuidados intensivos
- VEF1: Volumen Espiratorio Forzado en 1 segundo
- VOC: Variante de preocupación

Índice

Agradecimientos	V
Presentación	VIII
Abreviaturas y Acrónimos.....	X
Índice	XIII
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Origen del SARS-CoV-2	3
I.2 Taxonomía	4
I.3 Estructura y virología del SARS-CoV-2	4
I.4 Transmisión	7
I.5 Presentación clínica	8
I.6 Carga viral (CV)	8
I.7 Diagnóstico	10
I.8 Variantes	11
I.8.1 Variante Alfa B.1.1.7	11
I.8.2 Variante Delta B.1.617.2	12
I.8.3 Variante Ómicron B.1.1.529	12
I.9 Vacunas	13
I.9.1 BNT162b2 (Pfizer-BioNtech)	14
I.9.2 ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca)	14
I.9.3 Ad26.COV.2.S (Johnson & Johnson)	14
I.9.4 mRNA-1273 (Moderna)	14
I.10 Tratamiento	15
I.11 Gravedad clínica de pacientes hospitalizados con COVID-19	16
I.12 Anticuerpos en la infección por SARS-CoV-2	16
I.13 N-antigenemia del SARS-CoV-2	17
I.14 ARNemia viral del SARS-CoV-2	17
I.15 Resolución de neumonía en pacientes con COVID-19	18
II. HIPÓTESIS	22
III. OBJETIVOS.....	25
III.1 Comparar la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores de niños y adultos, tanto asintomáticos como sintomáticos, infectados con las variantes Wuhan-Hu-1 y Alfa (B.1.1.7).	25
III.2 Definir las cargas virales de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico, estratificándolas por edad, presentación clínica y estado de vacunación.	26

III.3 Evaluar la relación entre la cinética del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior y el compartimento sistémico.	27
III.4 Determinar si la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas se relaciona con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19.	27
IV. METODOLOGÍA	31
IV.1 Pacientes	31
IV.1.1 Cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores de niños y adultos, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos (Artículo I). 32	
IV.1.2 Carga viral inicial y cinética de la variante Alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de adultos y niños (Artículo II).....	32
IV.1.3 Cargas virales de ARN de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico estratificadas por edad, presentación clínica y estado de vacunación (Artículo III)34	
IV.1.4 Análisis cinético combinado de RNAemia, N-Antigenemia y anticuerpos específicos del virus SARS-CoV-2, en adultos con COVID-19 en estado crítico (Artículo IV).....	35
IV.1.5 La carga viral inicial de ARN de SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas no está asociada con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19 (Artículo V)	37
IV.2 Muestras.....	38
IV.2.1 Muestras de exudados nasofaríngeos.....	38
IV.2.2 Muestras de plasma.....	38
IV.3 Detección de ARN de SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas mediante RT-qPCR.....	38
IV.4 Detección de ARN de SARS-CoV-2 plasma mediante RT-PCR.....	39
IV.5 Prueba RT-PCR de ARN de b-glucuronidasa	39
IV.6 Secuenciación del genoma completo del ARN del SARS-CoV-2	39
IV.7 Ensayo de viabilidad de ARN del SARS-CoV-2 mediante PCR	40
IV.8 Detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en plasma	40
IV.9 Inmunoensayo de detección de anticuerpos	40
IV.10 Recopilación de datos y resultados clínicos	41
IV.11 Definiciones.....	41
IV.12 Análisis estadístico	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
V.1 Cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores de niños y adultos sintomáticos y asintomáticos (Artículo I)	45
V.2 Carga viral inicial y cinética de la variante Alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de adultos y niños (Artículo II)	54

V.3 Cargas virales de ARN de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.1.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico estratificadas por edad, presentación clínica y estado de vacunación (Artículo III)	59
V.4 Análisis cinético combinado de RNAemia, N-Antigenemia y anticuerpos específicos del virus SARS-CoV-2 en adultos en estado crítico con COVID-19 (Artículo IV)	63
V.5 La carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas no está asociada con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19 (Artículo V).....	74
VI. CONCLUSIONES.....	80
VII. BIBLIOGRAFÍA	83
VIII. ANEXOS.....	94
VIII.1 Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral.....	94
VIII.2 Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral	99
IX. ARTÍCULOS.....	100

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus constituyen un conjunto de virus que tienen la capacidad de provocar infecciones respiratorias en seres humanos y animales. En el pasado, se han registrado dos tipos de coronavirus altamente patógenos: el SARS-CoV y el MERS-CoV, los cuales emergieron en seres humanos y ocasionaron enfermedades graves. Dichos acontecimientos han puesto de manifiesto la relevancia de los coronavirus emergentes como una preocupación de salud pública.

A finales del año 2019, surgió en Wuhan, China, un nuevo coronavirus conocido como SARS-CoV-2, que desencadenó un brote de neumonía viral. La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se propagó a nivel mundial debido a su alta capacidad de transmisión, superando en número de casos y extensión geográfica a los brotes de SARS y MERS. La pandemia por COVID-19 sigue siendo una amenaza significativa para la salud pública global (1).

I.1 Origen del SARS-CoV-2

A finales de diciembre de 2019, se reportaron en varios centros de salud en Wuhan, China, grupos de pacientes con neumonía de causa desconocida. La mayoría de los casos estaban vinculados al Mercado Mayorista de Mariscos de Huanan. El agente causante de esta enfermedad emergente se identificó como un *Betacoronavirus* que nunca se había visto antes. La enfermedad se extendió a otras ciudades de la provincia de Hubei y a otras partes de China, incluso en pacientes sin antecedentes de exposición al mercado (1).

En enero de 2020, se registró un aumento repentino de casos de neumonía de causa desconocida en Wuhan, China. Los científicos identificaron el nuevo *Betacoronavirus* como la causa y, el 30 de enero, la OMS declaró el brote una emergencia de salud pública de preocupación internacional. El 11 de febrero, el virus fue nombrado oficialmente SARS-CoV-2 y la enfermedad como COVID-19. El brote se extendió rápidamente a otras partes de China y se declaró una pandemia mundial el 11 de marzo. Aunque se cree que el virus es de origen natural, todavía no se sabe con certeza cómo y cuándo se transmitió de animales a humanos (1).

I.2 Taxonomía

Los coronavirus (CoV) son virus de ARN monocatenario de polaridad positiva, envueltos, que se encuentran en humanos y otros mamíferos, como perros, gatos, pollos, vacas, cerdos y aves, y causan enfermedades respiratorias, gastrointestinales y neurológicas. Los coronavirus humanos (HCoV) son responsables de múltiples enfermedades respiratorias, como el resfriado común, la bronquiolitis y la neumonía (1).

En la actualidad, la familia *Coronaviridae* cuenta con 39 especies de CoV distribuidas en 27 subgéneros, 5 géneros y 2 subfamilias, las cuales se clasifican en el suborden *Cornidovirineae*, el orden *Nidovirales* y el reino *Riboviria*. Los HCoV, se encuentran dentro de la subfamilia *Coronavirinae* de la familia *Coronaviridae* y se agrupan genotípica y serológicamente en cuatro géneros principales: *AlphaCoV*, *BetaCoV*, *GammaCoV* y *DeltaCoV* (2).

El SARS-CoV-2 es un virus de la familia *Coronaviridae*, clasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus en el subgénero *Sarbecovirus* del género *Betacoronavirus*. Este virus tiene un genoma de ARN de cadena simple y sentido positivo y muestra una estrecha relación filogenética con el SARS-CoV y otros coronavirus asociados al SARS presentes en murciélagos. Además, el virus se agrupa en una rama distinta junto con cuatro aislamientos de coronavirus de murciélagos y nuevos coronavirus identificados recientemente en pangolines (3). A diferencia de otros coronavirus presentes en murciélagos y pangolines, el SARS-CoV-2 es único en esta especie. El virus comparte un 79% de similitud genómica con el SARS-CoV y un 50% con el MERS-CoV (4).

El SARS-CoV-2 posee una característica genómica particular: la inserción de cuatro residuos de aminoácidos (PRRA) en la proteína S. Además, la proteína S del SARS-CoV-2 es distinta a la de la mayoría de los miembros del subgénero *Sarbecovirus* (3).

I.3 Estructura y virología del SARS-CoV-2

Los coronavirus, tienen una apariencia similar a una corona, son los virus de ARN más grandes conocidos y se cree que infectan principalmente a vertebrados. El SARS-CoV-2 tiene un tamaño de genoma que varía de 29,8 a 29,9 kb. Los genomas de los coronavirus humanos consisten en un número variable de marcos de lectura abiertos

(ORFs). Siguiendo el orden típico de 5'a 3', los dos tercios iniciales del genoma del SARS-CoV-2 contienen dos ORFs (ORF1a y ORF1b) que, dentro de la célula huésped, se traducen en la proteína poli 1a (pp1a) en el retículo endoplásmico rugoso. y poliproteína 1ab (pp1ab), respectivamente (5). Estas poliproteínas se dividen en 16 proteínas no estructurales (nsp): nsp1-11, a partir de pp1a; y nsp12-16, a partir de pp1ab. La liberación proteolítica de nsp1 ocurre rápidamente, lo que le permite interferir con los procesos de traducción de la célula huésped al inducir la degradación del ARNm celular (6). Las nsp2-16 contienen el complejo de replicación y transcripción del virus y codifican múltiples enzimas con muchas funciones, incluyendo proteasas, helicasa, polimerasa, exonucleasa y endonucleasa, N7-metiltransferasa y 2'O-metiltransferasa, y enzimas de ubiquitinación (7).

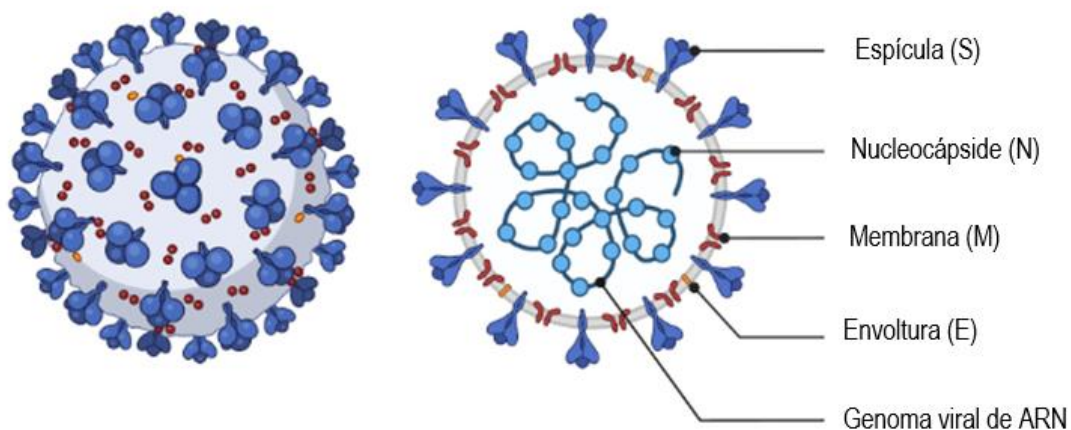


Figura I.1. Estructura de SARS-CoV-2.

El último tercio de los genomas de los coronavirus humanos contiene genes que codifican proteínas estructurales y accesorias. Las cuatro proteínas estructurales (**figura I.1**) principales codificadas aquí son la nucleocápside (N), la membrana (M), la envoltura (E) y la proteína de espícula (S) (8). La proteína N, asociada con el genoma del ARN viral, está involucrada en la regulación de la síntesis de ARN e interactúa con la proteína M durante la gemación viral (9). La proteína M es importante para el ensamblaje viral, contiene un dominio N-terminal corto que se proyecta sobre la superficie externa de la envoltura y un largo C-terminal interno (10). La función de la proteína E es en gran parte desconocida; sin embargo, junto con las proteínas N y M, es necesaria para el ensamblaje y la liberación viral (10). Por último, la proteína S le da a los coronavirus sus

características púas que componen su apariencia en forma de corona. Esta proteína se proyecta a través de la envoltura viral, está fuertemente glicosilada y regula la unión del receptor de la membrana celular huésped y la fusión de la membrana viral y celular (11). Las funciones de las 11 proteínas accesorias codificadas dentro del tercio más cercano al extremo 3' del genoma del SARS-CoV-2 no se comprenden completamente. Estas proteínas accesorias son codificadas por los genes ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10. Algunas de estas proteínas, incluyendo ORF3b, ORF6, ORF7a y ORF8, son antagonistas de interferón que interfieren con la respuesta inmunitaria de la célula huésped (12), mientras que ORF3a podría promover la liberación del virus (13) y está involucrada en la apoptosis de las células huésped a través de la activación de caspasa-3. Se sabe que ORF9b y ORF9c suprimen la respuesta antiviral de las células huésped.

La proteína S está compuesta por dos subunidades funcionalmente distintas (S1 y S2) y es esencial para la entrada viral en las células huésped. El dominio N-terminal S1 de la proteína contiene el dominio de unión al receptor (RBD) que interactúa directamente con el receptor ACE2 en la célula huésped (**figura I.2**), que es el receptor primario que SARS-CoV-2 utiliza para la entrada celular (14). El dominio C-terminal S2 fusiona las membranas virales y huésped para permitir la entrada del genoma viral en la célula huésped (15). Las subunidades del complejo S trimérico están en una conformación cerrada (etapa de prefusión) o abierta (etapa de postfusión) (16), con una subunidad siempre en una conformación abierta para permitir el reconocimiento y la unión al ACE2 (17). El RBD en sí mismo consiste en cinco hebras β antiparalelas rodeadas por varias hélices α (18). Desde la conformación cerrada a la abierta, el RBD experimenta una reorganización estructural en la que la región de la cabeza globular gira en el sentido de las agujas del reloj, lo que altera su superficie electrostática (18). Una vez posicionado, numerosos residuos dentro del RBD forman enlaces de hidrógeno o puentes de sal con residuos del receptor ACE2, permitiendo una unión fuerte (19), mientras que la estructura cóncava del RBD permite tres regiones de unión distintas (18). Después de la unión entre la proteína S y el receptor celular huésped, las proteasas celulares huésped cortan la proteína S, lo que provoca la liberación del dominio S2 que permite la fusión y la entrada celular (20).

El receptor ACE2 se expresa en numerosos tipos celulares en todo el cuerpo humano, incluyendo los pulmones, las mucosas oral y nasal, el corazón, el tracto gastrointestinal, los riñones, el hígado, el bazo y el cerebro (21), lo que destaca la

infección generalizada que SARS-CoV-2 puede causar. Mientras tanto, TMPRSS2, una proteasa celular huésped, facilita la fusión de las membranas virales y celulares huésped, y podría tener un papel en la propagación del virus en las vías respiratorias (22). La cathepsina L de la célula huésped también podría ayudar en la entrada celular de SARS-CoV-2 mediante la clivación de la proteína S. De hecho, se ha demostrado que un inhibidor de proteasa clínicamente aprobado bloquea la entrada celular de SARS-CoV-2 (23).

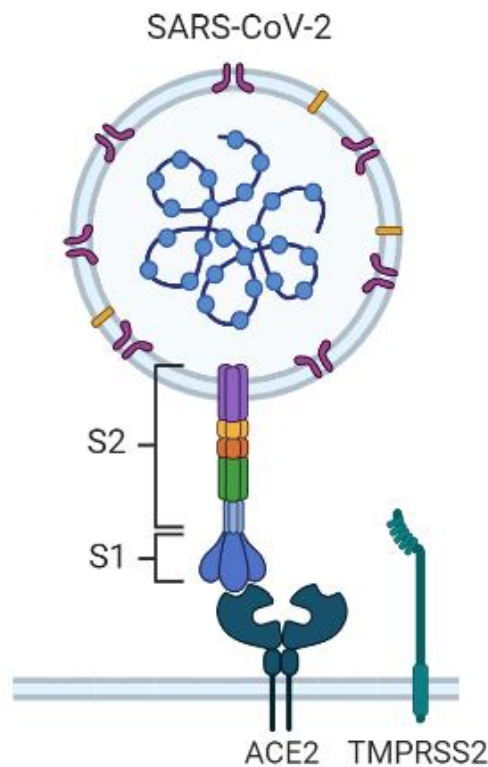


Figura I.2. Unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 en la célula huésped.

I.4 Transmisión

El virus SARS-CoV-2 se propaga principalmente a través de gotas respiratorias que se transmiten de persona a persona mediante el contacto cercano, la tos o los estornudos. Además, el virus puede propagarse por el aire, objetos contaminados y otros medios, como la orina y las heces, y puede sobrevivir en superficies y en el aire durante largos períodos de tiempo (24). Aunque el virus puede permanecer en superficies inanimadas durante horas y días, la concentración del virus disminuye rápidamente debido a la evaporación de las gotas de agua (25).

Tanto los pacientes sintomáticos como los asintomáticos pueden ser fuente de infección y la transmisión puede ocurrir en diferentes entornos, como en la familia, el hospital, la comunidad y otros lugares concurridos. Existe la posibilidad de propagación durante el período de incubación (26).

Para limitar la propagación del virus, se recomiendan medidas de protección, como el uso de equipo de protección personal, el mantenimiento de la ventilación interior y la desinfección de manos y superficies (27).

I.5 Presentación clínica

La infección por SARS-CoV-2 parece afectar a todas las edades de la población, con una mediana de edad de infección de alrededor de los 50 años (28). Sin embargo, los síntomas y manifestaciones clínicas varían según la edad. En general, los hombres mayores de 60 años con comorbilidades tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria grave, mientras que la mayoría de los jóvenes y niños presentan enfermedades leves o son asintomáticos (29).

Los síntomas más comunes al infectarse son fiebre, fatiga y tos seca (30), mientras que los menos comunes incluyen producción de esputo, dolor de cabeza, hemoptisis, diarrea, anorexia, dolor de garganta, dolor en el pecho, escalofríos, náuseas y vómitos. La mayoría de las personas muestran signos de enfermedad después de un período de incubación de 1 a 14 días, con una mediana de 5 días, y la disnea y la neumonía se desarrollan en una mediana de 8 días desde el inicio de la enfermedad (28).

Los casos graves se definen como aquellos que requieren ventilación en una unidad de cuidados intensivos (UCI), mientras que los pacientes críticos presentan insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o disfunción o fallo multiorgánico. En los pacientes que ingresan, un hallazgo común en la tomografía computarizada de tórax es la opacidad en vidrio esmerilado (31). Además, muchos pacientes desarrollan linfopenia. Los pacientes de la UCI tienen niveles más altos de citocinas plasmáticas, lo que sugiere un proceso inmunopatológico causado por una tormenta de citocinas (31).

I.6 Carga viral (CV)

Se ha detectado ARN del SARS-CoV-2 en diferentes partes del cuerpo aparte del tracto respiratorio, como la sangre periférica, heces, orina y secreciones oculares. Sin

embargo, se ha observado que las cargas virales en estas partes son significativamente más bajas que en las muestras del tracto respiratorio, lo que sugiere que la presencia de virus infecciosos en estas áreas es improbable (32).

El diagnóstico de laboratorio de una infección del tracto respiratorio se realiza mediante la detección del ARN viral a través de una prueba de RT-qPCR específica para el virus (33). La CV determinada por RT-qPCR se expresa como el número de copias de ARN viral por mililitro de medio de transporte viral o por hisopo, o por el valor de Ct específico de la prueba (34). El Ct, está inversamente correlacionado con la concentración del ARN viral objetivo en la muestra clínica (es decir, cuanto mayor es el valor, menor es el ARN objetivo en la muestra). Al utilizar un estándar externo con un número definido de copias de ARN, los valores de Ct pueden transformarse en números absolutos de copias de ARN viral por mililitro (35).

Aunque la RT-qPCR no puede determinar directamente la capacidad de infección, debido a su incapacidad para diferenciar entre virus competentes para la replicación (infecciosos) y ARN viral residual (no infeccioso), se ha buscado una correlación entre la CV de ARN y la presencia de virus infecciosos. Varios estudios han intentado correlacionar la cantidad de ARN viral con la capacidad de infección. Se ha observado una disminución escalonada en la probabilidad de aislamiento del virus con el aumento de los valores de Ct en muestras recolectadas durante los primeros 8 días después del inicio de los síntomas (35).

La CV en el tracto respiratorio alcanza su pico alrededor del inicio de los síntomas y disminuye dentro de una a tres semanas, aunque la duración y magnitud varían entre pacientes. En general, el ARN viral se vuelve indetectable en el tracto respiratorio superior (TRS) aproximadamente dos semanas después del inicio de los síntomas. Sin embargo, la relación entre la detección de la CV y la infectividad no se comprende completamente, ya que la presencia de ARN viral puede no representar un virus vivo transmisible (36).

Se dispone de poca información sobre la transmisión en pacientes asintomáticos. Algunas investigaciones sugieren que la transmisibilidad del virus es alta cerca del inicio de los síntomas e incluso antes de que aparezcan (37). En dos estudios, no se encontraron diferencias significativas en la CV entre pacientes sintomáticos y asintomáticos (38). Quedan importantes preguntas por responder acerca del momento y la duración de la infectividad en pacientes asintomáticos (39).

La detección de la CV es importante para prevenir la posible transmisión de la infección. Es relevante considerar que el medio de transporte utilizado para la muestra, las condiciones de almacenamiento y la calidad de la muestra pueden influir en la detección del ARN viral y en su utilidad y limitaciones al extrapolar a la posible infectividad (32).

I.7 Diagnóstico

Actualmente, la detección molecular del ácido nucleico del SARS-CoV-2 mediante qRT-PCR es considerada el estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19. Existen numerosos kits comerciales disponibles que se dirigen a diferentes genes, tales como ORF1b (que incluye RdRp), N, E o S (40). El procedimiento implica tomar una muestra con un hisopo en la nariz o la garganta del paciente y el tiempo de detección varía desde varios minutos hasta horas, dependiendo de la tecnología utilizada (41). Sin embargo, es importante destacar que la carga viral puede ser baja al inicio de la enfermedad (42), lo que aumenta la probabilidad de falsos negativos al utilizar hisopos orales. Por lo tanto, se recomienda adoptar múltiples métodos de detección para confirmar un diagnóstico de COVID-19 (43).

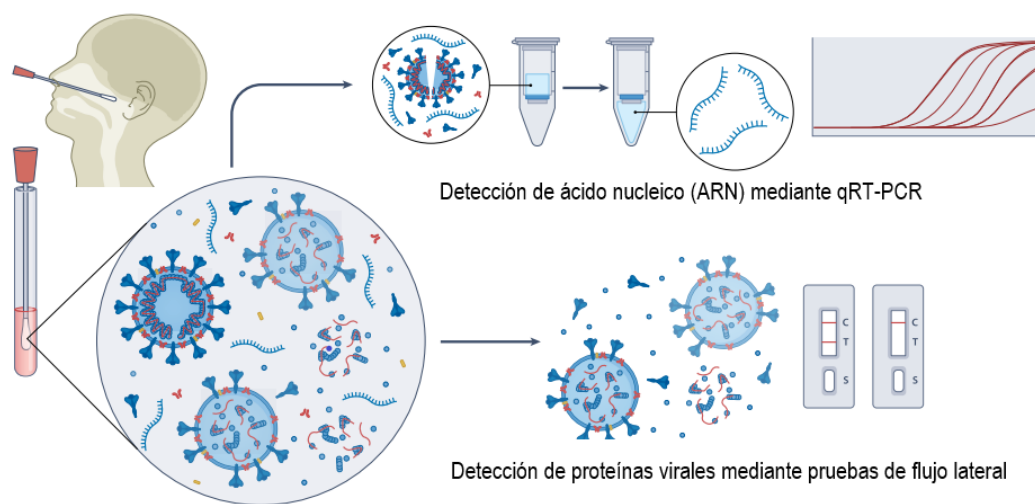


Figura I.3. Diagnóstico de COVID-19 mediante pruebas de qRT-PCR y detección de antígenos.

Otro método diagnóstico es la detección de antígenos, que se realiza mediante un test rápido de inmunocromatografía y detecta la presencia de proteína N (nucleocápside) del virus SARS-CoV-2 en una muestra tomada de la nariz o la garganta del paciente.

Las pruebas serológicas de SARS-CoV-2 que detectan anticuerpos contra las proteínas N o S podrían complementar el diagnóstico molecular, especialmente en las fases tardías después del inicio de la enfermedad o para estudios retrospectivos (44). Sin embargo, aún no se conoce completamente el alcance y la duración de las respuestas inmunitarias, y las pruebas serológicas disponibles presentan diferencias en su sensibilidad y especificidad, lo que debe ser considerado al decidir sobre las pruebas serológicas y la interpretación de sus resultados.

I.8 Variantes

Desde su aparición en Wuhan, China a finales de 2019, el virus SARS-CoV-2 ha experimentado múltiples mutaciones en su genoma, algunas de las cuales han alterado la estructura tridimensional de la proteína S, que es esencial para su capacidad de infectar células humanas. Aunque la mayoría de estas mutaciones tienen un impacto limitado en la capacidad del virus para infectar y replicarse, algunas pueden conferir una ventaja competitiva a una cepa viral y permitirle volverse dominante mediante la selección natural. En este contexto, las mutaciones que se localizan en el RBD o en el Dominio N-terminal de la proteína S son particularmente importantes, ya que pueden alterar su capacidad de transmisión y permitirle evadir mejor la respuesta inmunitaria (26).

La cepa principal de SARS-CoV-2 es la que surgió por primera vez en Wuhan, China, a fines de 2019 y se propagó por todo el mundo en la primera ola de infecciones. A esta cepa también se la conoce como Wuhan Hu-1, B.1., o cepa de tipo salvaje (26).

I.8.1 Variante Alfa B.1.1.7

La variante Alfa del SARS-CoV-2 perteneciente al linaje B.1.1.7, fue descubierta por primera vez en el Reino Unido en septiembre de 2020. El 18 de diciembre del mismo año fue clasificada como una variante preocupante (45). Esta variante presenta mutaciones en la proteína S que podrían tener efectos biológicos significativos (46). En primer lugar, la mutación N501Y aumenta la afinidad de unión del RBD al receptor ACE2. Además, la mutación P681H, ubicada en el sitio de escisión de furina 682-685 y adyacente a los dominios S1 y S2, hace que el sitio de escisión de furina sea menos ácido y se reconozca y escinda con mayor eficacia (47). El sitio de escisión de furina S1/S2 es crucial para la entrada del virus en las células epiteliales respiratorias y determina en parte su

transmisibilidad. La variante Alfa también tiene una mutación D614G en el sitio de escisión de furina S1/S2, lo que aumenta su afinidad de unión al receptor ACE2 y su infectividad (48). Además, otras mutaciones en la variante Alfa mejoran la capacidad del virus para escapar de la detección de anticuerpos, como la eliminación de dos aminoácidos en los sitios 69-70 del dominio N-terminal de la proteína S (49).

La variante Alfa se ha asociado con un aumento del 50-70 % en la transmisibilidad y un aumento del 30-60 % en el riesgo de hospitalización y muerte en comparación con la cepa original (50). Sin embargo, se ha demostrado que esta variante tiene un impacto mínimo en la efectividad de las vacunas actuales y el riesgo de reinfección se mantiene similar al de las variantes anteriores (51).

1.8.2 Variante Delta B.1.617.2

La variante Delta, de la línea B.1.617.2, fue documentada por primera vez en India en octubre de 2020 y se clasificó como una variante de preocupación el 11 de mayo de 2021. Las mutaciones en la proteína S, P681R y D614G, de la variante Delta, afectan a la afinidad de unión al receptor ACE2 y su transmisibilidad (52). A diferencia de la mutación E484K presente en variantes anteriores, la variante Delta contiene la mutación E484Q, que junto con la mutación L452R, también ubicada en el RBD, causa una afinidad significativamente mayor para el receptor ACE2 que la cepa primaria o la mutación E484K sola (53). La mutación L452R por sí sola resulta en una mayor afinidad de unión RBD-receptor ACE2 y una mayor capacidad de escape de los anticuerpos neutralizantes. Por último, la variante Delta contiene la mutación T478K, ubicada en la interfaz entre la proteína S y el receptor ACE2 cuando se unen, lo que aumenta el potencial electrostático de la proteína S y mejora la afinidad de unión (54).

La variante Delta se convirtió rápidamente en la variante dominante en el Reino Unido, EE. UU., Europa y en todo el mundo. Las mutaciones presentes en la variante Delta mejoraron la transmisibilidad del virus como resultado del aumento de la afinidad de unión al receptor ACE2 (55).

1.8.3 Variante Ómicron B.1.1.529

La variante Ómicron pertenece a la línea B.1.1.529 y fue descubierta por primera vez en noviembre de 2021 en Sudáfrica y Botswana antes de ser detectada en múltiples países y clasificada como una variante de preocupación el 26 de noviembre de 2021. Esta

variante contiene más de 30 mutaciones en la proteína S, 23 de las cuales han sido identificadas previamente, incluyendo K417N, T478K, E484A, D614G, H655Y, P681H y N501Y (56). Quince mutaciones de Ómicron están contenidas dentro del RBD, lo que proporciona a la variante una afinidad de unión sustancialmente mejorada al receptor ACE2 (56). Además, varias mutaciones individuales en el RBD de la variante Ómicron afectan la efectividad de los anticuerpos neutralizantes, incluyendo K417N, N440K, G446S, E484A, Q493K, G496S, G339D, S371L y S375F (57).

Las mutaciones en la variante Ómicron que mejoran su afinidad de unión y su capacidad para evadir los anticuerpos neutralizantes probablemente impulsaron su rápida propagación, al igual que su rápida tasa de replicación, que es alrededor de 70 veces más rápida que las cepas Delta y primarias. La tasa de reinfección de la variante Ómicron también se ha encontrado que es más de diez veces mayor que la de variantes anteriores (58).

I.9 Vacunas

En respuesta a la pandemia por COVID-19, se han desarrollado y aprobado rápidamente vacunas seguras y efectivas para el virus SARS-CoV-2, con un enfoque en la proteína S (59). Hasta enero de 2022, se han aprobado 33 vacunas y hay 194 en desarrollo preclínico y 140 en desarrollo clínico. Sin embargo, se han reportado grandes variaciones en la eficacia de las vacunas aprobadas, debido a factores como el país, la fecha y el tamaño de la población del estudio, así como las variantes del SARS-CoV-2. Debido a esto, puede ser difícil comparar y entender completamente la eficacia de las vacunas (26).

En España, la campaña de vacunación contra el COVID-19 comenzó el 27 de diciembre de 2020, cuando se administró la primera dosis de la vacuna de Pfizer-BioNTech. Desde entonces, España ha estado utilizando diferentes tipos de vacunas en su campaña de vacunación, incluyendo las vacunas de Pfizer-BioNTech, Moderna, AstraZeneca y Janssen. La selección de la vacuna a administrar depende de la disponibilidad de cada una y de la población a la que se destine, siguiendo las recomendaciones del Ministerio de Sanidad y de las autoridades sanitarias de cada comunidad autónoma (26).

I.9.1 BNT162b2 (Pfizer-BioNtech)

La vacuna BNT162b2 (Comirnaty) es una vacuna de ARNm modificado con nucleósidos formulada en nanopartículas lipídicas que codifica una proteína S del SARS-CoV-2 modificada y que fue desarrollada a través de un esfuerzo colaborativo entre Pfizer (Nueva York, EE. UU.) y BioNTech (Mainz, Alemania) (16).

La vacuna BNT162b es bien tolerada, con una reactividad limitada (60).

I.9.2 ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca)

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222, Vaxzevria) es un vector no replicante del adenovirus de chimpancé ChAdOx1, modificado para codificar la proteína S del SARS-CoV-2 (61). Fue desarrollada a través de una colaboración entre la Universidad de Oxford y AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido).

La picazón, el dolor, el enrojecimiento, la hinchazón, la sensibilidad y el calor leves y moderados son reacciones locales comunes, mientras que los escalofríos, la fatiga, la fiebre, el dolor de cabeza, el dolor muscular y la náusea son reacciones sistémicas comúnmente reportadas después de la vacunación (62,63).

I.9.3 Ad26.COV.2.S (Johnson & Johnson)

La vacuna Ad26.COV.2.S es un vector de adenovirus no replicante, modificado para contener la proteína S del SARSCoV-2 en una conformación pre-fusión estabilizada y requiere solo una dosis. Este vector fue desarrollado por la compañía farmacéutica Janssen de Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ, EE. UU.), a partir del adenovirus humano recombinante tipo 26, y fue listado por la OMS para uso de emergencia el 12 de marzo de 2021 (26). La Ad26.COV.2.S es segura y bien tolerada (26).

I.9.4 mRNA-1273 (Moderna)

La vacuna mRNA-1273 (Spikevax) desarrollada por Moderna (MA, EE. UU.) es una vacuna de ARNm encapsulada en nanopartículas lipídicas que expresa la proteína S del SARS-CoV-2 que ha sido pre-fusión estabilizada (64).

La fatiga, el dolor muscular, el dolor de cabeza, los escalofríos, el dolor articular y el dolor/reacción en el sitio de la inyección son efectos adversos comunes causados (64).

I.10 Tratamiento

El tratamiento y manejo del COVID-19 se encuentra en constante evolución, y las autoridades sanitarias han publicado y actualizado continuamente guías y recomendaciones para abordar la enfermedad (26). Entre los fármacos recomendados se encuentran el Remdesivir y el Tocilizumab, los cuales han sido objeto de numerosos estudios clínicos para evaluar su eficacia y seguridad en diferentes contextos clínicos (65). El Tocilizumab ha sido utilizado en algunos países para tratar la inflamación severa asociada con el COVID-19, aunque su efectividad ha sido objeto de debate en algunos lugares. En Estados Unidos, por ejemplo, se ha utilizado en el tratamiento de pacientes hospitalizados con COVID-19 y niveles elevados de IL-6 (66).

Un tema de debate y estudio es el uso de corticoides en pacientes con COVID-19. Los corticoides se han utilizado para reducir la inflamación en los pulmones y otros órganos afectados por el virus. En junio de 2020, se publicaron los resultados de un ensayo clínico aleatorizado llamado "Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy" (RECOVERY), en el que se evaluó el efecto de la dexametasona en pacientes hospitalizados con COVID-19 que requerían oxígeno suplementario o ventilación mecánica (67). Estos resultados llevaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a actualizar sus recomendaciones para incluir el uso de corticoides en el tratamiento de pacientes hospitalizados con COVID-19 que necesitan oxígeno. Desde entonces, se han realizado otros estudios que han confirmado los beneficios de los corticoides en el tratamiento de pacientes con COVID-19 grave (68).

Es importante tener en cuenta que la situación de la pandemia sigue evolucionando, por lo que los protocolos de tratamiento y las recomendaciones pueden cambiar con el tiempo en función de los resultados de investigación y la evolución de la situación clínica. Las autoridades sanitarias, como la OMS, el ECDC, los Institutos Nacionales de Salud y los CDC de los Estados Unidos, proporcionan orientación y actualizan regularmente las pautas y recomendaciones para el tratamiento y manejo del COVID-19 (26).

I.11 Gravedad clínica de pacientes hospitalizados con COVID-19

La gravedad clínica de los pacientes hospitalizados con COVID-19 se diferencia de otras enfermedades infecciosas respiratorias por presentar algunas particularidades. La insuficiencia respiratoria aguda es la principal causa de ingreso en la UCI y mortalidad, pudiendo requerir ventilación mecánica invasiva. Asimismo, algunos pacientes pueden experimentar hipoxemia silenciosa, lo que dificulta el diagnóstico y tratamiento temprano. Las complicaciones trombóticas son más frecuentes en estos pacientes, debido a la activación de la coagulación y la inflamación sistémica (69). Además, la respuesta inflamatoria excesiva puede provocar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y fallo multiorgánico. Por último, las comorbilidades como enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y EPOC, aumentan el riesgo de presentar una enfermedad más grave y complicaciones (70).

El SARS-CoV-2 se replica en una amplia variedad de órganos y tejidos, lo que contribuye a explicar la naturaleza multisistémica del COVID-19. Es posible que el virus supere la barrera epitelial y se disemine a través del torrente sanguíneo, llegando a sitios extrapulmonares (28). La RNAemia y la antigenemia del virus se detectan con frecuencia en pacientes con COVID-19, especialmente en aquellos con enfermedad grave, y se asocian con malos resultados clínicos. Los anticuerpos funcionales, especialmente los que tienen capacidad de neutralización del virus, pueden contribuir a la eliminación del SARS-CoV-2 del torrente sanguíneo, minimizando su diseminación (71).

I.12 Anticuerpos en la infección por SARS-CoV-2

Se cree que los anticuerpos neutralizantes (AcNt) desempeñan un papel crucial en la protección contra la infección por SARS-CoV-2. El dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S es un objetivo altamente específico de los AcNt más potentes en COVID-19. Todavía no se sabe exactamente cómo los anticuerpos afectan a la eliminación del virus y a la gravedad de la enfermedad. Los estudios en modelos experimentales indican que los anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden reducir la CV en el pulmón, mejorar la inflamación local y disminuir la mortalidad (72).

Se encontró una correlación entre los niveles de anticuerpos específicos y los títulos de anticuerpos neutralizantes. Los niveles de anticuerpos específicos aumentaron con el tiempo y alcanzaron su pico en la segunda y tercera semana después del inicio de

los síntomas. La avidéz de los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 fue baja en la mayoría de los sueros recolectados y mostró un aumento mínimo con el tiempo. No se encontró correlación entre los niveles de anticuerpos específicos y los biomarcadores inflamatorios. Se cree que la síntesis desregulada de citoquinas proinflamatorias es un sello patogénico de las formas más graves de COVID-19 y que los niveles de anticuerpos específicos se correlacionan con los niveles de biomarcadores inflamatorios (72).

I.13 N-antigenemia del SARS-CoV-2

La N-antigenemia, se refiere a la detección de la proteína N del virus en la sangre de una persona infectada con COVID-19. La proteína N es una de las proteínas estructurales del virus y está presente en grandes cantidades en las células infectadas.

La detección de la N-antigenemia del SARS-CoV-2 es relativamente común en los pacientes de la UCI y parece asociarse con un aumento de los niveles plasmáticos de inflamación y marcadores daño tisular (73).

Se encontró que la CV de ARN del virus era mayor en pacientes con N-antigenemia positiva en comparación con los negativos. La N-antigenemia también se asoció con niveles séricos elevados de marcadores de inflamación y daño tisular. Aunque se necesitan más investigaciones, la N-antigenemia podría ser un biomarcador de mal pronóstico clínico en pacientes críticos con COVID-19 (73).

Ni el tratamiento con Remdesivir ni con Tocilizumab parece tener un impacto importante en la tasa de detección de N- antigenemia SARS-CoV-2. Esto está en línea con estudios previos que muestran que ninguno de estos fármacos tuvo un efecto tangible sobre la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS incluso cuando se administra poco después de la aparición de los síntomas (74).

I.14 ARNemia viral del SARS-CoV-2

La ARNemia viral se refiere a la detección ARN viral, en la sangre de una persona infectada. El ARN del SARS-CoV-2 se detecta en muestras respiratorias, así como en sangre, heces y orina. La enfermedad por COVID-19 grave se caracteriza por una respuesta desregulada del huésped frente a este virus, y se ha observado que la presencia de ARN viral en el plasma (ARNemia) está asociada con formas críticas de la enfermedad. Esta correlación sugiere un papel importante de la replicación viral

descontrolada en la patogenia del COVID-19, y apunta hacia respuestas desreguladas del huésped como posibles mecanismos subyacentes(26).

Se ha informado que el virus SARS-CoV-2 es difícil de cultivar a partir de sangre. Los métodos basados en PCR pueden detectar y cuantificar la presencia de material genómico del virus en suero o plasma, lo que representa un enfoque útil para evaluar el impacto de la diseminación extrapulmonar de material viral en la enfermedad (75).

El SARS-CoV-2 puede acceder al sistema sistémico después de la infección. De hecho, dependiendo de la gravedad de la clínica, la ARNemia del SARS-CoV-2 se puede detectar en hasta el 88% de pacientes con COVID-19 dentro de la primera semana después del inicio de los síntomas y se ha asociado con la admisión en la UCI, la necesidad de ventilación mecánica invasiva, fallo multiorgánico y tasa de mortalidad (76).

I.15 Resolución de neumonía en pacientes con COVID-19

La pandemia por COVID-19 ha afectado a millones de personas en todo el mundo y ha dado lugar a una gran cantidad de hospitalizaciones. A medida que los pacientes se recuperan de la enfermedad, se están descubriendo síntomas persistentes y una disminución en su estado funcional, lo que puede afectar su capacidad para realizar las actividades básicas de la vida diaria y cuidarse a sí mismos. Esto ha tenido un impacto significativo, no solo en términos de mortalidad sino también en las consecuencias a largo plazo para la salud de los pacientes que sobreviven a la enfermedad (77).

El "síndrome post-agudo del COVID-19", también conocido como "COVID-19 prolongado" o "COVID-19 crónico", se refiere a una serie de síntomas y complicaciones que persisten o aparecen después de la fase aguda de la infección por COVID-19, incluso en pacientes que experimentaron síntomas leves o moderados durante la fase aguda. Estos síntomas pueden incluir fatiga persistente, dificultad para concentrarse, dolor muscular o articular, dolor de cabeza, palpitaciones, falta de aire, tos persistente, pérdida del olfato o del gusto, depresión y ansiedad, entre otros. Los pacientes con COVID-19 prolongado también pueden experimentar complicaciones como daño pulmonar, cardíaco o renal, así como trastornos neurológicos y psiquiátricos (78).

El síndrome post-agudo de COVID-19 es un área de investigación activa y se desconoce exactamente por qué algunas personas experimentan síntomas prolongados después de la infección aguda. Se cree que puede ser el resultado de una respuesta

inmunitaria exagerada o disfuncional, daño a los órganos o tejidos, o una combinación de factores. Algunos estudios sugieren que el síndrome post-agudo de COVID-19 puede afectar a hasta el 30% de los pacientes con COVID-19 y puede durar semanas o incluso meses después de la infección aguda (79).

Hipótesis

II. HIPÓTESIS

La magnitud carga viral en el tracto respiratorio (superior e inferior) y su cinética varían según diversos factores, como la edad del paciente, la forma en que se presenta la infección por SARS-CoV-2 (sintomática o asintomática), el estado de vacunación, la gravedad de la enfermedad y el tiempo que tarda en resolverse la infección.

Objetivos

III. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral incluye cuatro objetivos principales:

III.1 Comparar la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores de niños y adultos, tanto asintomáticos como sintomáticos, infectados con las variantes Wuhan-Hu-1 y Alfa (B.1.1.7).

Existen evidencias que sugieren que los niños tienen una menor susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 y tienden a desarrollar formas más leves de la enfermedad que los adultos (80). Sin embargo, aún no está claro si los niños, tanto sintomáticos como asintomáticos, tienen un papel importante en la transmisión comunitaria del SARS-CoV-2 en comparación con los adultos (80). Hay información contradictoria acerca de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores entre niños y adultos (42,81) y si esta carga viral en sujetos pediátricos difiere según la edad (82,83) y si existen diferencias en la dinámica de excreción del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores entre niños sintomáticos y asintomáticos (84,85).

La elucidación de estas cuestiones es importante para tratar de establecer el riesgo de transmisión entre adultos y niños. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, además de la CV en la TRS, existen otros factores que pueden modular el contagio, como la capacidad de liberación de aerosoles, la naturaleza de los síntomas y la mezcla de patrones sociales. Para obtener más información sobre estos problemas, realizamos un estudio retrospectivo de un solo centro que involucra a una cohorte sustancial de niños y adultos infectados con SARS-CoV-2, tanto sintomáticos como asintomáticos, y que no han requerido hospitalización.

La variante Alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 fue detectada por primera vez en el Reino Unido a finales de 2020 y se ha demostrado que tiene una ventaja de transmisión sobre otros linajes del virus. Esta mayor transmisibilidad se ha relacionado con una afinidad mejorada por ACE2, lo que supuestamente resulta en una CV más alta en TRS (50,86).

Además, se ha informado de una mayor duración de la eliminación de ARN del SARS-CoV-2 en TRS en personas infectadas con la variante B.1.1.7 en comparación con los controles, lo que podría tener importantes implicaciones para las políticas de aislamiento (87).

Sin embargo, estos estudios presentan diversas limitaciones, como la falta de datos estratificados por edad y estado clínico (sintomático vs. asintomático), la selección de muestras tomadas solo de pacientes con patología aguda ingresados en el hospital o en la unidad de cuidados intensivos, entre otros. Por lo tanto, se necesita más información sobre la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS en diferentes poblaciones, incluyendo niños y adultos, sintomáticos o asintomáticos, infectados por B.1.1.7.

III.2 Definir las cargas virales de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico, estratificándolas por edad, presentación clínica y estado de vacunación.

La variante Delta del SARS-CoV-2 se ha convertido rápidamente en la variante dominante en muchos países europeos, incluida España, reemplazando a la variante Alfa. Esta nueva variante acumula varias mutaciones en la proteína S, incluyendo L452R y P681R, que aumentan su capacidad para unirse al receptor ACE2, lo que podría explicar su mayor eficiencia de replicación en el tracto respiratorio. Se cree que esto se traduce en una mayor transmisibilidad y carga viral en los pacientes infectados (88–90).

Sin embargo, en un estudio reciente realizado en una cohorte de adultos, se informó de niveles comparables de CV de ARN de ambas variantes en muestras nasofaríngeas al momento del diagnóstico por RT-qPCR de SARS-CoV-2. Este hallazgo contrasta con otros estudios que han demostrado consistentemente una CV más alta para la variante Delta en TRS. Cabe destacar que pocos estudios han emparejado a los participantes infectados con la variante Delta o Alfa por la presencia o ausencia de síntomas de COVID-19, datos demográficos, el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la realización de la prueba o el estado de vacunación, lo que podría afectar a los resultados (91,92).

Para obtener más información sobre este tema, llevamos a cabo un estudio observacional retrospectivo con participantes infectados por las variantes Alfa y Delta.

III.3 Evaluar la relación entre la cinética del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior y el compartimento sistémico.

Se sabe que el virus SARS-CoV-2 tiene la capacidad de replicarse en diferentes órganos y tejidos del cuerpo, lo que podría explicar la naturaleza multisistémica del COVID-19 (93). Después de replicarse inicialmente en el tracto respiratorio, el virus puede diseminarse a través del torrente sanguíneo y provocar manifestaciones extrapulmonares en distintas partes del organismo. Aunque se han identificado viriones intactos en gránulos de plasma de pacientes con COVID-19 mediante tomografía electrónica e inmunotinción, el SARS-CoV-2 nunca se ha cultivado a partir de muestras de plasma (94). La ARNemia y la antigenemia del virus se detectan con frecuencia en pacientes con COVID-19 y están asociadas con la gravedad de la enfermedad y la mortalidad. La detección temprana de estos componentes virales en pacientes con COVID-19 se asocia con un mayor riesgo de ingreso en la unidad de cuidados intensivos, la necesidad de ventilación mecánica invasiva, la falla multiorgánica y la tasa de mortalidad (95). Los anticuerpos que poseen capacidad neutralizante del virus podrían contribuir a la eliminación del SARS-CoV-2 del torrente sanguíneo y minimizar la diseminación del virus (96). Sin embargo, se han publicado datos contradictorios sobre la relación entre los niveles séricos de anticuerpos y la magnitud de la ARNemia y la antigenemia del SARS-CoV-2 (94,97,98). Para mejorar la interpretación de los datos, llevamos a cabo un análisis cinético combinado de ARNemia y antigenemia del SARS-CoV-2, y anticuerpos específicos del virus en muestras de plasma secuenciales de una cohorte homogénea de pacientes adultos con COVID-19 en estado crítico.

III.4 Determinar si la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas se relaciona con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19.

Existen varios estudios destinados a evaluar la incidencia y factores de riesgo del síndrome post-agudo de COVID-19. Entre las secuelas más comunes se encuentran la persistencia de disnea, tos y dolor torácico, así como alteraciones en las pruebas de

función pulmonar y de imagen del tórax, que se han reportado en sobrevivientes de COVID-19 hasta 1 año después del inicio de los síntomas. Sin embargo, existe información limitada sobre el impacto de la CV de SARS-CoV-2 en el momento del diagnóstico de COVID-19 y su relación con la evolución clínica y la resolución radiológica de la neumonía. Por lo tanto, proponemos un estudio observacional retrospectivo para evaluar el posible vínculo entre la CV en la prueba de PCR de las vías respiratorias superiores realizada después del inicio de los síntomas, antes de la hospitalización por neumonía, y la recuperación de la función pulmonar o la resolución de las anomalías pulmonares a medio plazo (mediana de 2 meses) después del alta hospitalaria (78,99,100).

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Pacientes

Los diferentes estudios incluyeron cohortes de pacientes que obtuvieron resultados positivos en la prueba RT-qPCR para la detección del ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudados nasofaríngeos (ENF). Para los Artículos I, II, III y V entre los años 2020 y 2022 los pacientes procedían de centros de atención primaria del Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa y el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Para el estudio IV se contó con pacientes con COVID 19 en estado crítico entre 2020 y 2021. En estos también se obtuvieron muestras de plasma semanalmente después del ingreso en la UCI, cuando fue posible.

El número concreto, las fechas en las que los pacientes sufrieron el episodio y el tipo de estudio se resumen en la **tabla IV.1**.

Tabla IV.1. Características metodológicas: tipo de estudio, localización, pacientes y fecha del episodio.

Estudio	Tipo	Localización	N.ºpacientes	Fecha del episodio
1-Costa R. Clin Microbiol Infect. 2021	Observacional retrospectivo	HCUV	1184	Junio de 2020 a enero de 2021
2-Costa R. J Infect 2021	Observacional retrospectivo	HCUV	990	Junio 2020 a abril de 2021
3-Costa R. J Infect 2022	Observacional retrospectivo	HCUV	545	Febrero a julio de 2021
4-Costa R. Sci Rep. 2022	Observacional prospectivo	HCUV	71	Octubre de 2020 a febrero de 2021
5-Costa R. J Infect 2022	Observacional retrospectivo	HCUV	131	Marzo a diciembre de 2020 (n = 97), octubre de 2021 a enero de 2022 (n = 34)

HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia

El conjunto de los datos clínico-demográficos de los pacientes incluidos en cada estudio vienen detallados en cada una de las publicaciones.

A continuación, se detallan algunas de las características de los pacientes por artículo.

IV.1.1 Cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores de niños y adultos, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos (Artículo I)

Características de los pacientes: este estudio incluyó a 1184 participantes (256 niños y 928 adultos, 520 hombres y 664 mujeres) con resultado positivo en la prueba de RT-qPCR para detectar ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudado nasofaríngeo, entre junio de 2020 y enero de 2021. Los participantes eran pacientes sintomáticos o asintomáticos que no requerían hospitalización. Los síntomas informados incluyeron fiebre, tos seca, rinorrea, disnea, mialgia, fatiga, anosmia, ageusia, odinofagia, diarrea, conjuntivitis y cefalea. Los 967 participantes (154 niños y 813 adultos) fueron muestreados en centros de atención primaria en el Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa en Valencia, España, y los 217 restantes (102 niños y 115 adultos) fueron muestreados en el servicio de urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valencia. No se registró en la base de datos si los participantes asintomáticos eran contactos domésticos o no, ni si desarrollaron síntomas después de la prueba.

IV.1.2 Carga viral inicial y cinética de la variante Alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de adultos y niños (Artículo II)

Características de los pacientes: el trabajo incluyó a un total de 990 individuos, de los cuales 799 eran mayores de 18 años y 507 eran mujeres. Se detectó la presencia de ARN del SARS-CoV-2 en estos individuos mediante la prueba de RT-qPCR, tanto en aquellos con síntomas como en los asintomáticos, y se produjo la infección en el periodo comprendido entre junio de 2020 y abril de 2021. Además, se identificaron 338 sujetos infectados por el linaje B.1.1.7 del SARS-CoV-2, de los cuales 179 presentaron síntomas. (Tabla complementaria IV.1).

Tabla complementaria IV.1 Linajes de SARS-CoV-2 presentes en el período junio a diciembre 2020 en el Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, antes de la introducción del linaje B.1.1.7

SARS-CoV-2 linaje	N.º. de secuencias
A	6
A2	11
A21	1
A5	39
B	3
B.1	133
B.1.1	46
B.157	17
B.160	11
B.177	86
B.121	4
B.223	7
B.408	1
B.1.416.1	5
B.610	20

El estudio contó con un grupo de control de 652 personas infectadas por variantes distintas a la B.1.1.7 (de las cuales 339 presentaron COVID-19). Los participantes del grupo de control se seleccionaron emparejados por edad y sexo con los del grupo B.1.1.7. En la **tabla complementaria IV.2** se presentan los datos demográficos y clínicos de los individuos infectados con SARS-CoV-2 que se incluyeron en el cálculo de la vida media de la CV.

Tabla complementaria IV.2. Parámetros demográficos y clínicos de individuos infectados con SARS-CoV-2 incluidos para el cálculo de la vida media de la CV.		
Parámetro	B.1.1.7 N° (%)	No B.1.1.7 N° (%)
Sexo		
Masculino	9 (36)	21 (37,5)
Femenino	16 (64))	35 (62,5)
Años		
>18 años	23 (92)	55 (98)
≤18 años	2 (8)	1 (1.7)
COVID-19		
Sí	19 (76)	39 (70)
No	6 (24)	17 (30)
Hospitalización		
Sí	8 (32)	15 (26)
No	17 (68)	42 (73)

IV.1.3 Cargas virales de ARN de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico estratificadas por edad, presentación clínica y estado de vacunación (Artículo III)

Características de los pacientes: el estudio abarcó un total de 545 pacientes, tanto pediátricos (≤18 años) como adultos (>18 años), con resultado positivo en la prueba de RT-qPCR de ARN del SARS-COV-2 en las variantes Delta (B.617.2) o Alfa (B.1.1.7) en ENF durante el periodo de febrero a julio de 2021.

De estos, 149 hombres y 231 adultos dieron positivo en la variante Alfa entre febrero y mayo de 2021. Todos ellos estaban sin vacunar en el momento de la prueba. En cuanto a la variante Delta, durante el periodo de mayo a julio de 2021, 125 hombres y 128 adultos dieron positivo, de los cuales 51 adultos estaban completamente vacunados.

IV.1.4 Análisis cinético combinado de RNAemia, N-Antigenemia y anticuerpos específicos del virus SARS-CoV-2, en adultos con COVID-19 en estado crítico (Artículo IV)

Características de los pacientes: se incluyeron en el estudio un total de 71 pacientes en estado crítico debido a COVID-19 durante el período comprendido entre octubre de 2020 y febrero de 2021. No se consideraron para el estudio aquellos pacientes de los cuales no se disponía de información acerca de los anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes, ya sea en la sala del hospital o en el momento del ingreso en la unidad de cuidados intensivos.

Tabla IV.2. Características clínicas de la población de estudio al ingreso en UCI	
Variable	Nº (%)
Género	
Masculino	49 (69,1)
Femenino	22 (30,9)
Puntuación de evaluación de la salud crónica y fisiología aguda (APACHE) II	
<10	14 (19,7)
10-14	26 (36,6)
15-29	31 (43,7)
Comorbilidades	
Diabetes mellitus	17 (23,9)
Asma/Enfermedad pulmonar crónica	11 (15,5)
Hipertensión	32 (45,0)
Obesidad	38 (53,5)
Enfermedad cardíaca crónica	9 (12,6)
Enfermedad vascular	7 (9,8)
Cáncer	3 (4,2)
Enfermedad hematológica	3 (4,2)
Número de condiciones de comorbilidad	
Una	22 (31,0)
Dos o más	32 (45,0)
Ninguna	17 (24,0)
Soporte de oxigenación y ventilación	
Ventilación mecánica invasiva	63 (88,7)
PiO ₂ /FiO ₂ <150 mmHg	57 (80,2)
Disfunción renal aguda	17 (23,9)
Tratamiento antiviral o antiinflamatorio	
Remdesivir	15 (21,1)
Corticosteroides	70 (98,5)
Tocilizumab	27 (38,0)

IV.1.5 La carga viral inicial de ARN de SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas no está asociada con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19 (Artículo V)

Características de los pacientes: el estudio incluyó a 131 adultos con COVID-19, de los cuales 84 eran hombres y 47 mujeres, y presentaban neumonía. Los pacientes fueron ingresados en el Servicio de Neumología durante dos períodos: entre marzo y diciembre de 2020 (n = 97) y entre octubre de 2021 y enero de 2022 (n = 34). Durante el primer periodo, la variante dominante fue Wuhan-Hu-1, mientras que en el segundo periodo fue Ómicron BA.1 en la Comunidad Valenciana.

Inicialmente, a todos los pacientes se les realizó una prueba RT-qPCR para detectar el ARN del SARS-CoV-2. Dos meses después del alta hospitalaria, se evaluó la clínica, la radiografía de tórax (Rx) y la función pulmonar. La gravedad del paciente durante la estancia hospitalaria se estratificó según la escala de resultados ordinaria de la OMS como enfermedad leve (puntuación de la OMS de 3 a 4) o enfermedad grave (puntuación de la OMS de 5 a 7). En el seguimiento, la disnea residual se evaluó utilizando las directrices del Consejo Británico de Investigación Médica. Además, a los pacientes se les realizaron pruebas de función pulmonar (espirometría) y Rx.

Los casos no resueltos se definieron como aquellos en los que la capacidad vital forzada (FVC) era inferior al 80% (sin volumen espiratorio forzado en 1 s-VEF1/FVC <70) y/o la capacidad de difusión pulmonar (DLCO) era inferior al 80% y/o existían alteraciones radiológicas persistentes en la Rx. La persistencia de lesiones residuales en la Rx se definió como cualquier opacidad visible en ausencia de historia previa de enfermedad pulmonar (excepto asma o apnea del sueño) o insuficiencia cardíaca o renal no controlada. El grado de afectación radiológica después de la neumonía por COVID-19 se cuantificó utilizando la puntuación adaptada de evaluación radiográfica del edema pulmonar (RALE). Los registros médicos mostraron enfermedad pulmonar subyacente en el momento del ingreso hospitalario (enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma) en 20 pacientes.

De los 131 pacientes, 95 (72,5%) presentaron neumonía leve por COVID-19 (escala 4 de la OMS), mientras que los 36 pacientes restantes tenían enfermedad grave (escala 5-7 de la OMS) que requerían ventilación no invasiva (n = 4), cánula nasal de

oxígeno de alto flujo ($n = 11$) o soporte respiratorio mediante ventilación mecánica invasiva ($n = 21$). La mediana de estancia hospitalaria fue de 10 días. A los 2 meses del alta hospitalaria, 45 de los 131 pacientes (34,3%) se clasificaron como no recuperados según los criterios definidos anteriormente

IV.2 Muestras

IV.2.1 Muestras de exudados nasofaríngeos

Para la recolección de los exudados nasofaríngeos, se contó con enfermeras capacitadas en los sitios de muestreo. Estas muestras fueron colocadas en 3 ml de medio de transporte universal (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.).

La decisión de recolectar muestras de exudados nasofaríngeos en los contactos se dejó a criterio del médico a cargo del caso índice o de las autoridades sanitarias locales.

IV.2.2 Muestras de plasma

Para el cuarto trabajo (Costa R, Sci Rep 2022), se obtuvieron muestras de plasma semanalmente después del ingreso en la UCI, siempre que fue posible. Para ello, se centrifugaron tubos de sangre total con EDTA y se criopreservaron. Posteriormente, se recuperaron las muestras criopreservadas para su posterior análisis.

IV.3 Detección de ARN de SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas mediante RT-qPCR

Para la extracción del ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas, se empleó el kit MagMAX viral pathogen COVID-19, desarrollado por Thermo Fisher Scientific en Estados Unidos. Para la amplificación de SARS-CoV-2, se utilizó el kit TaqPath COVID-19 de Applied Biosystems, el cual detecta los genes virales ORF1ab, N y S.

A fin de cuantificar la CV, se incluyó un control mediante AMPLIRUN® TOTAL de ARN de SARS-CoV-2, (Vircell SA, Granada, España). Este control se utilizó para calcular la CV de ARN del SARS-CoV-2, expresada en copias/mL y tomando como referencia el CT de RT-PCR para el gen N.

IV.4 Detección de ARN de SARS-CoV-2 plasma mediante RT-PCR

En el cuarto artículo (Costa R, Sci Rep 2022), se extrajeron los ácidos nucleicos del plasma (400 µl) utilizando el kit Abbott mSample Preparation System (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EE. UU.). Luego, se amplificó el ARN del SARS-CoV-2 mediante el ensayo Abbott RealTime SARS-CoV-2 en la plataforma m2000rt.

Los resultados obtenidos indicaron que el límite de detección del ensayo para plasma fue de alrededor de 100 copias/mL (IC del 95%). Asimismo, se empleó como control el AMPLIRUN® TOTAL de ARN de SARS-CoV-2 (Viracell SA, Granada, España), como material de referencia para estimar la CV de ARN del SARS-CoV-2, expresada en copias/mL, y considerando el CT de RT-PCR para el gen N.

IV.5 Prueba RT-PCR de ARN de b-glucuronidasa

En el primer y el segundo trabajo (Costa R, Clin Microbiol Infect 2021, Costa R, J Infect. 2021), se empleó la amplificación del gen de mantenimiento de la b-glucuronidasa (GUSB) para evaluar la celularidad de las muestras seleccionadas, siguiendo un protocolo previamente publicado (101). La extracción de ARN en las muestras nasofaríngeas se realizó mediante el kit Virus DSP Pathogen Minikit en el QiaSymphony Robot (Qiagen, Valencia, CA). Posteriormente, se realizó la transcripción inversa del ARN a ADN complementario y se amplificó utilizando el kit HEQC one-step (Seqplexing, Valencia, España) en el sistema de PCR en tiempo real LightCycler 480 Versión II (Roche Diagnostics, Pleasanton).

IV.6 Secuenciación del genoma completo del ARN del SARS-CoV-2

Para el segundo, tercer y quinto trabajo (Costa R, J Infect. 2021, Costa R, J Infect. 2022, Costa R, J Infect. 2022), se utilizó la técnica de RT-PCR específica de variantes (SARS-CoV-2 PCR Variant, Ascires, Sistemas Genómicos Valencia, España) para secuenciar el genoma completo del virus. Durante el período de la variante Alfa y la variante Ómicron BA.1, la detección de estas variantes se realizó mediante la ausencia de señal del gen TaqPath S (SGTF), y se confirmó mediante la secuenciación del genoma completo.

IV.7 Ensayo de viabilidad de ARN del SARS-CoV-2 mediante PCR

En el cuarto artículo (Costa R, Sci Rep 2022), se empleó un protocolo previamente publicado (72). Las muestras de plasma se diluyeron 1/10 en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), y se trataron o no con alta temperatura (95 °C, 10 min) antes de ser expuestas a 5 mM de cloruro de platino (PtCl₄) durante 30 minutos a temperatura ambiente, en tubos de ADN LoBind (Eppendorf, Alemania) en un agitador orbital (150 rpm). Posteriormente, se extrajo el ARN viral con el instrumento Maxwell® RSC 16 y el kit de autenticación y OMG Pure Food de Maxwell RSC (Promega, España), y se amplificó mediante RT-qPCR dirigida al gen N (secuencia N1). Se emplearon como controles muestras de plasma negativas en la prueba RT-qPCR de SARS-CoV-2 enriquecidas con SARS-CoV-2 inactivado por calor (aproximadamente, 105 gc/mL). Bajo estas condiciones, la ausencia de amplificación de ARN viral en plasma no pretratado después del tratamiento con PtCl₄ se interpretó como indicativa de la presencia de ARN viral libre (y ausencia de virus viable) en la muestra.

IV.8 Detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en plasma

En el cuarto trabajo (Costa R, Sci Rep 2022), se utilizó el dispositivo de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIC) Rapid COVID-19 Antigen Test (CLINITEST®) (Siemens Healthineers, Erlangen, Alemania) para la detección y clasificación de la N-antigenemia del SARS-CoV-2 en muestras plasmáticas, tal como se describió anteriormente (73). La sensibilidad analítica del ensayo es de alrededor de 50 pg/mL. La intensidad de la línea de antígeno N se evaluó visualmente mediante una escala de 3 niveles: 0 para resultado negativo, 1+ para intensidad de la banda de prueba inferior a la banda de control y 2+ para intensidad de la banda de prueba igual o mayor que la línea de control.

IV.9 Inmunoensayo de detección de anticuerpos

En el cuarto trabajo (Costa R, Sci Rep 2022), se cuantificaron los anticuerpos IgG contra el RBD de SARS-CoV-2 mediante un inmunoensayo desarrollado internamente utilizando RBD recombinante producido en células de insectos Sf9, siguiendo un protocolo previamente publicado (72). Para medir (semicuantitativamente) las IgG

reactivas a la proteína N del SARS-CoV-2, se utilizó el ensayo quimioluminiscente de Abbott Alinity anti-nucleocápside IgG de SARS-CoV-2.

IV.10 Recopilación de datos y resultados clínicos

Desde el servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia se elaboraron bases de datos que consideraron los criterios de inclusión y las características de los pacientes, tales como la presencia o ausencia de síntomas de COVID-19, la demografía, el tiempo transcurrido hasta el inicio de los síntomas (o el contacto con el caso índice en pacientes asintomáticos), el estado de vacunación y la resolución de la neumonía por COVID-19. Luego se procedió a su análisis.

IV.11 Definiciones

COVID-19: presentar síntomas compatibles con el virus, experimentar alguno de los signos y síntomas asociados con la enfermedad.

Asintomáticos: ausencia de síntomas en el momento de la toma de muestra.

Casos no resueltos de neumonía por COVID-19: Capacidad Vital Forzada (CVF) menor al 80% (sin Volumen Espiratorio Forzado en 1 s- VEF1/CVF <70) y/o capacidad de difusión pulmonar (DLCO) menor al 80%, y/o si presentas alteraciones radiológicas persistentes en la radiografía de tórax.

Pacientes completamente vacunados: diagnosticados al menos después de 15 días después de la finalización del programa de vacunación.

RT-qPCR: es una técnica de biología molecular que combina la transcripción inversa (RT) del ARN del virus en ADN complementario (ADNc) con la amplificación y cuantificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

IV.12 Análisis estadístico

Se compararon las diferencias de medianas entre los grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Para analizar muestras independientes se utilizaron las pruebas de U-Mann Whitney y Kruskal Wallis.

Para las variables categóricas se utilizó la estadística Chi-cuadrado o la prueba de Fisher cuando correspondía. Se realizaron análisis de correlación entre variables cuantitativas continuas mediante el análisis de correlación de Spearman.

Se consideró un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software SPSS versión 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) y GraphPad V.8.

Resultados y discusión

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tesis se divide en cinco secciones, cada una enfocada en un objetivo específico. La presentación de los resultados sigue el orden en que se obtuvieron. Los resultados se presentan de la siguiente manera:

En primer lugar, se presentan los resultados relacionados con las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores de niños y adultos, tanto sintomáticos como asintomáticos.

En segundo lugar, se presentan los resultados relacionados con la carga viral inicial y la cinética de la variante Alfa del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores de adultos y niños.

En tercer lugar, se presentan los resultados de las cargas virales de ARN de las variantes Alfa y Delta del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas, estratificadas por edad, presentación clínica y estado de vacunación en el momento del diagnóstico.

En cuarto lugar, se presentan los resultados del análisis cinético combinado de ARNemia, N-antigenemia del SARS-CoV-2 y anticuerpos específicos del virus en pacientes adultos con COVID-19 en estado crítico.

Por último, se presentan los resultados de la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas, en relación con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19.

V.1 Cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores de niños y adultos sintomáticos y asintomáticos (Artículo I)

V.1.1 Grupos de estudio

Los participantes pediátricos (≤ 18 años, $n = 256$, 21,6 %) tenían una mediana de edad de 12 años (rango 0-18 años) y los adultos (> 18 años, $n = 928$, 78,3 %) de 37 años (rango 19-93 años). Un total de 424 sujetos (121 niños, 303 adultos) presentaron síntomas compatibles con COVID-19.

La mediana de días de recolección de muestras fue de 2 días (rango 0-10 días) y de 3 días (rango 0-10 días) después del inicio de los síntomas en niños y adultos, respectivamente.

Un total de 760 participantes (135 niños y 625 adultos) eran contactos estrechos de pacientes con COVID-19 y asintomáticos en el momento de la toma de muestra. La recolección de muestras de ENF en contactos se prescribió a criterio del médico a cargo del caso índice o de las autoridades sanitarias locales, y se realizó en una mediana de 7 días (rango 1-10 días) después del diagnóstico del presunto caso índice, en niños y adultos.

V.1.2 Carga viral de ARN de SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos y adultos con COVID-19

Primero comparamos la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de pacientes pediátricos y adultos sintomáticos. Los datos se muestran en la **figura V.1**.

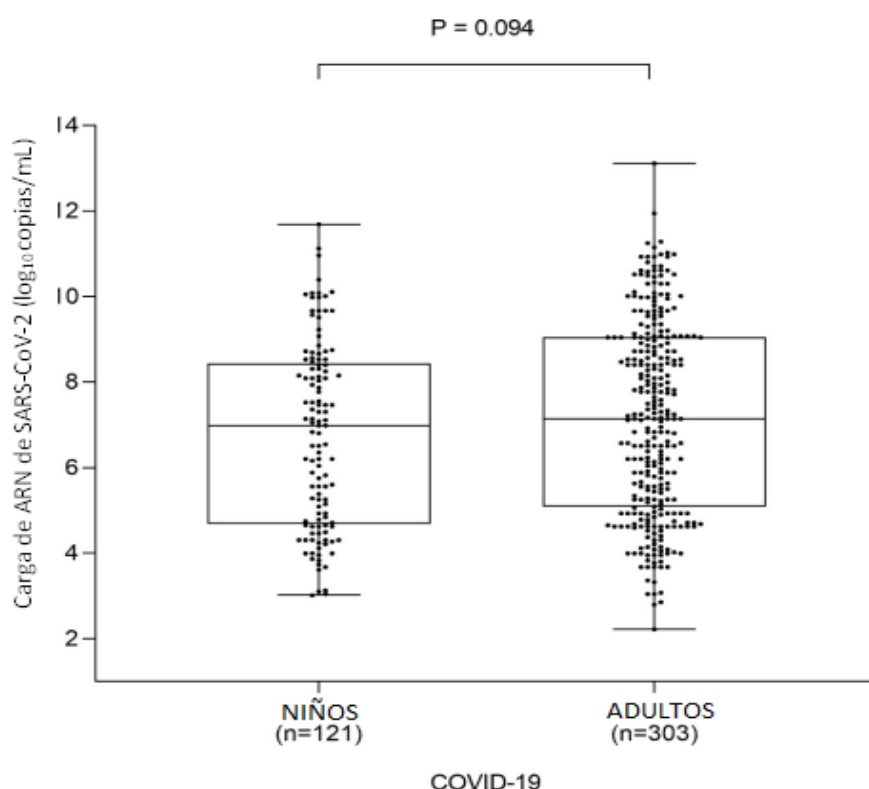


Figura V.1. Comparación de la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de niños y adultos con COVID-19.

El rango de CV de ARN del SARS-CoV-2 fue comparable entre niños y adultos. La mediana de la CV de ARN en niños (6,98 log₁₀ copias/mL) fue menor que en adultos

(7,14 $\log_{10}$ copias/mL), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($P=0,094$).

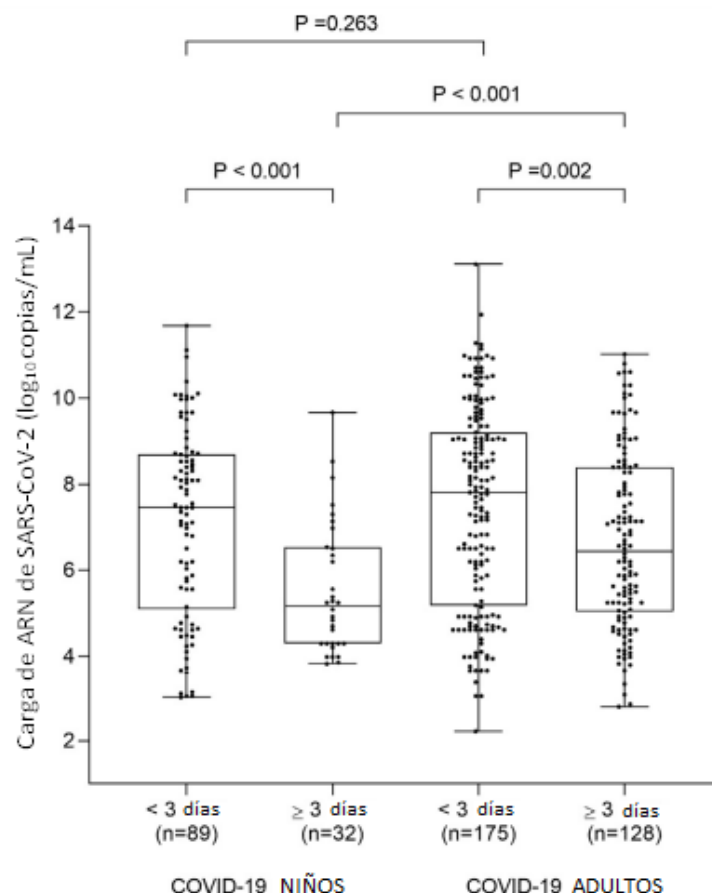


Figura V.2. Comparación de la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de niños y adultos con COVID-19 según el momento de la toma de muestras después del inicio de los síntomas.

A continuación, comparamos la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 en niños y adultos según el momento del muestreo del ENF después del inicio de los síntomas. La CV de ARN del SARS-CoV-2 alcanza su punto máximo poco después o en el momento del inicio de los síntomas. Dividimos arbitrariamente cada grupo de pacientes en dos subgrupos, teniendo en cuenta el siguiente criterio, muestra tomada dentro de los 2 días desde el inicio de los síntomas y ≥ 3 días desde el inicio de los síntomas. La CV de ARN del SARS-CoV-2 fue significativamente mayor en las muestras de ENF recolectadas dentro de los 2 días posteriores al inicio de los síntomas que en las obtenidas más tarde, tanto en adultos como en niños. Niños mediana de 7,46 $\log_{10}$ copias/mL frente 5,17 $\log_{10}$ copias/mL ($P < 0,001$) y adultos mediana de 7.81 $\log_{10}$ copias/mL frente a 6,45 $\log_{10}$ copias/mL ($P=0,002$) (**figura V.2**). Curiosamente, la CV de ARN del SARS-CoV-2 medida dentro de los 2 días posteriores al inicio de los síntomas fue comparable ($P=0,26$)

entre niños y adultos, mientras que la determinada en momentos posteriores (≥ 3 días) fue significativamente menor en niños ($P=0,002$).

Finalmente, como se muestra en la **figura V.3. A y B**, no se encontró correlación entre la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 y la edad del paciente, ya sea para niños ($P= 0,008$, $P=0,93$) o adultos ($P=0,005$, $P=0,92$).

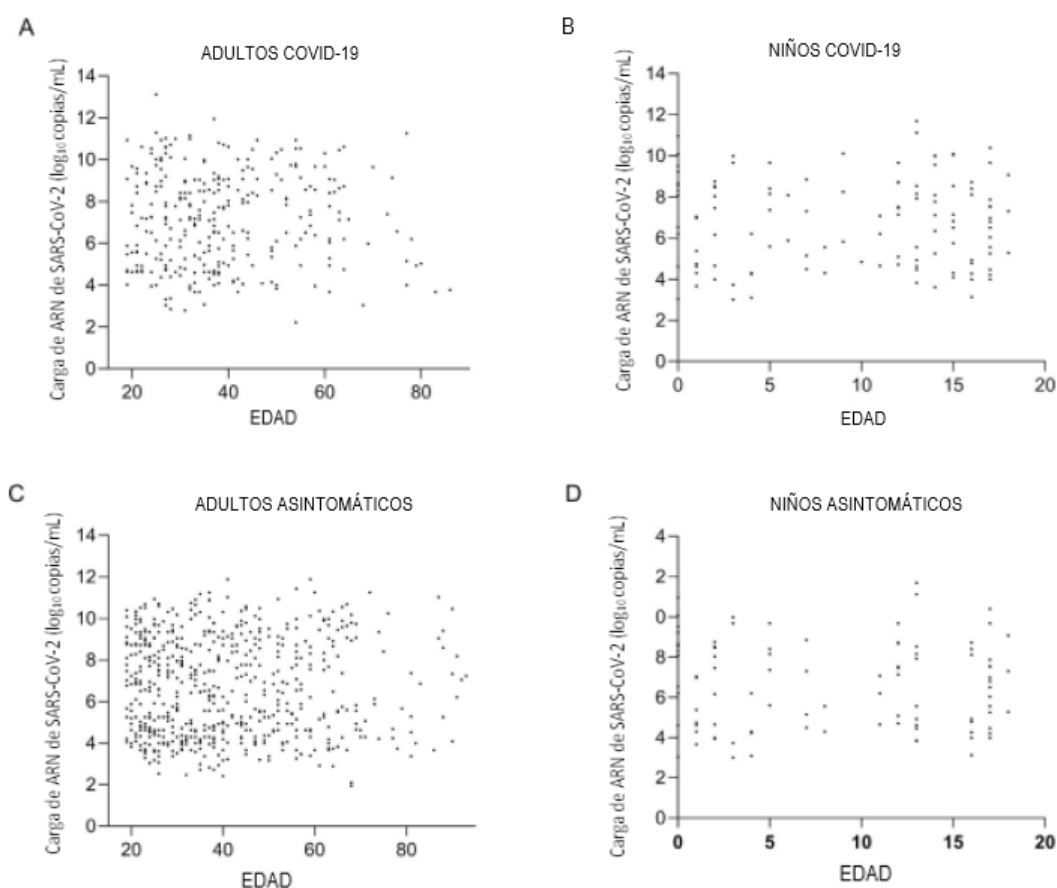


Figura V.3. Correlación entre la carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de (A) adultos y (B) niños con COVID-19, y de (C) adultos y (D) niños asintomáticos.

V.1.3 Carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en niños y adultos asintomáticos

Se detectó una amplia gama de cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en niños y adultos asintomáticos (**figura V.4**). Las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en niños asintomáticos (mediana de 6,20 $\log_{10}$ copias/mL) y adultos (6,48 $\log_{10}$ copias/mL) fueron comparables en magnitud ($P=0,97$). Además, no se encontró correlación entre la edad y la CV de SARS-CoV-2 ($P=0,066$, $P=0,44$ para niños y $P=0,020$, $P=0,62$ para adultos) mayor en sujetos sintomáticos que en asintomáticos (**figura V.3. C y D**).

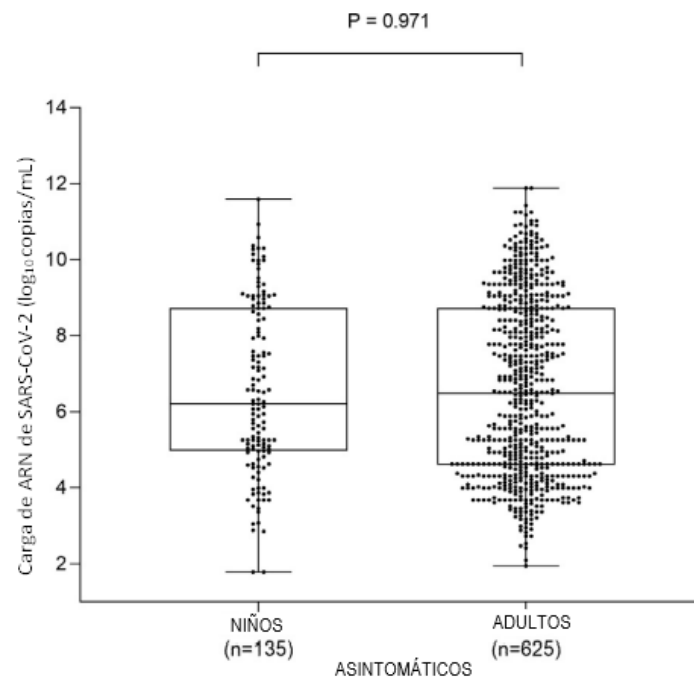


Figura V.4. Comparación de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de niños y adultos asintomáticos con COVID-19.

V.1.4 Comparación de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de niños y adultos sintomáticos y asintomáticos

Los niños con COVID-19 mostraron una CV de ARN del SARS-CoV-2 ligeramente mayor que sus contrapartes asintomáticas (**figura V.5. A**), aunque no se alcanzó la significación estadística ($P=0,61$).

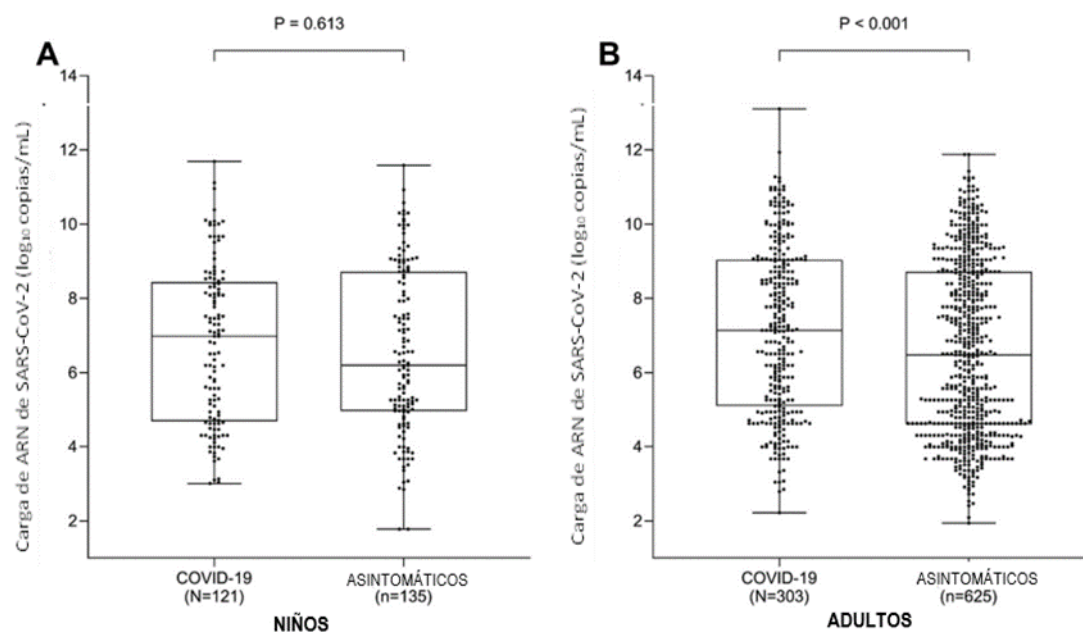


Figura V.5. Comparación de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en ENF de (A) niños y (B) adultos asintomáticos o COVID-19.

En adultos, la mediana de la CV de ARN del SARS-CoV-2 fue significativamente mayor en sujetos sintomáticos que en asintomáticos ($P < 0,001$).

V.1.5 Inferencia del porcentaje de niños y adultos que presumiblemente excretan viriones infecciosos

Anteriormente informamos que el SARS-CoV-2 no se pudo cultivar a partir de muestras de ENF que tenían un $C_T > 25$ ($< 5,9 \log_{10}$ copias/mL) mediante RT-qPCR TaqPath COVID-19 (58). Investigamos la distribución de muestras con $C_T < 25$ entre niños y adultos (**figura V.6**). En general, el porcentaje de muestras de ENF con C_T por debajo del umbral mencionado anteriormente fue similar para niños y adultos sintomáticos ($P=0,28$) y también fue comparable entre niños y adultos asintomáticos ($P=0,87$). Entre los niños, ese porcentaje fue mayor para los menores de 3 años, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P=0,22$). Para la mayoría de los grupos de edad el porcentaje fue mayor en los sintomáticos que en los asintomáticos, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística ($P > 0,5$).

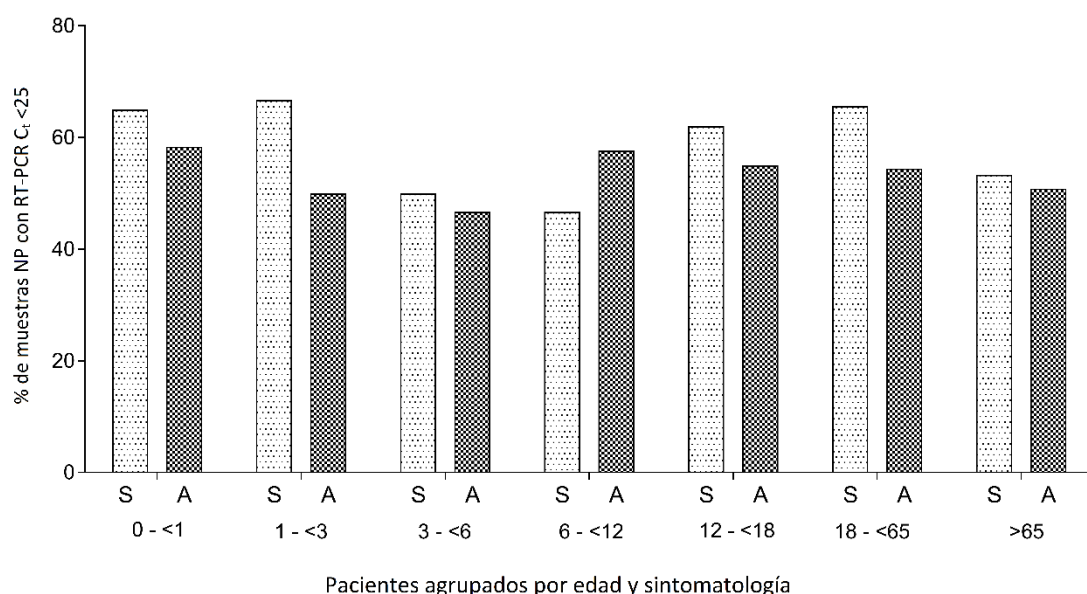


Figura V.6. Distribución de muestras para niños y adultos con valores de CT < 25.

V.1.6 Evaluación de la celularidad en muestras de exudados nasofaríngeos (ENF) recolectados en participantes pediátricos y adultos

Para evaluar la calidad de las muestras de exudados nasofaríngeos recolectados de niños y adultos con respecto a la celularidad, seleccionamos aleatoriamente 30 muestras de cada grupo de población ($n=60$) que se emparejaron según la CV de SARS-CoV-2 (mediana 5,70 log₁₀ copias/mL, rango 3,5-11,6 log₁₀ copias/mL en muestras de niños; mediana 6,60 log₁₀ copias/mL, rango 2,2-10,9 log₁₀ copias/mL en muestras de adultos, $P=0,99$). Estas muestras se analizaron con una RT-PCR de diseño interno que amplifica el gen GUSB de mantenimiento. El CT de las muestras de ENF obtenidas de niños y adultos no difirieron significativamente (mediana CT 28,1, rango 24,8-32,7 y mediana CT 29,0, rango 25,2-31,7, respectivamente, $P=0,3$), lo que sugiere que las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 medidas en los dos grupos de población no estaban sesgadas por las diferencias de celularidad entre las muestras de ENF.

V.1.7 Discusión

En general, no hubo diferencia significativa en CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS en el momento de la PCR diagnóstica entre pacientes pediátricos y adultos con COVID-19. Además, el porcentaje de ENF que potencialmente presentaba viriones infecciosos, fue similar en niños y adultos. Curiosamente, un subanálisis que categorizó a los pacientes por tiempo hasta la recolección de la muestra desde el inicio de los

síntomas reveló que las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en niños y adultos fueron comparables en los primeros momentos (dentro de 2 días), cuando es probable que se alcancen los niveles máximos (102), pero fueron significativamente más bajos en los niños después del día 2, lo que sugiere una tasa de eliminación de ARN en TRS más rápida en los niños. De acuerdo con nuestros datos, Baggio et al. (80), encontraron cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 similares en niños y adultos muestreados dentro de los primeros 5 días después del inicio de los síntomas. Asimismo, Heald-Sargent et al. (82) encontraron que los niños en edad preescolar y escolar muestreados dentro de 1 semana después del inicio de los síntomas mostraban cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 comparables a las de sus contrapartes adultas. Por el contrario, en un estudio alemán se informó una CV de ARN del SARS-CoV-2 ligeramente más baja en niños que en adultos; sin embargo, no se proporcionó información sobre el inicio de los síntomas (82).

Existen múltiples publicaciones que apuntan un papel menos significativo de los niños como principales impulsores de la propagación del SARS-CoV-2 en la comunidad, en comparación con los adultos (103,104). Nuestros datos no cuestionan esta suposición, ya que la transmisión de la infección puede no estar sólo asociada con la magnitud de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS (105,106). También puede influir la naturaleza de los síntomas (la tos es menos probable que se desarrolle en niños en comparación con los adultos), la capacidad pulmonar y la capacidad de liberar aerosoles, que parece ser menor en niños que en adultos, en particular en ausencia de síntomas (107). Por último, también pueden afectar los contactos sociales diferenciales. De hecho, un estudio danés sugirió una correlación más fuerte entre la edad y el riesgo de transmisión que entre el valor de CT y la transmisibilidad (108). Además, nuestro hallazgo de que la eliminación del SARS-CoV-2 en TRS puede avanzar a un ritmo más rápido en los niños en comparación con los adultos respalda este argumento.

Los análisis de comparación por pares no revelaron diferencias en la CV de ARN del SARS-CoV-2 entre grupos de edad, ya sea en niños o adultos sintomáticos. En los niños, una conclusión similar puede derivarse del estudio de Kocielek et al (85). Por el contrario, se han informado diferencias relacionadas con la edad en la CV de ARN del SARS-CoV-2 (82); específicamente, los niños pequeños (<5 años) que tenían una mediana significativamente más baja de CV de SARS-CoV-2 que los niños mayores y los adultos. Las diferencias en los tiempos de muestreo pueden explicar la discrepancia.

Se ha documentado que la transmisión del SARS-CoV-2 pueden causarla los adultos infectados asintomáticos, lo que facilitaría la diseminación del virus en la comunidad (109). De hecho, se ha estimado que al menos el 50 % de las nuevas infecciones por SARS-CoV-2 pueden tener origen en la exposición a individuos infectados, pero sin síntomas (asintomáticos o presintomáticos).

Sin embargo, los datos de varios estudios, incluidas dos revisiones sistemáticas (110,111), sugieren claramente que los pacientes asintomáticos son responsables de menos infecciones secundarias que las personas con síntomas. En contraste con los datos informados en estudios previos (112,113), observamos que las cargas virales son más altas en adultos sintomáticos que en adultos asintomáticos. Se detectó una amplia gama de cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 tanto en niños como en adultos asintomáticos, lo que probablemente refleja el amplio espectro de tiempos de recolección de ENF después de la exposición al presunto caso índice. Apuntar que, en nuestro caso, el tiempo de recolección de las muestras no era diferente entre niños y adultos (una mediana de 7 días, rango 1-10 días).

Nuestra observación es compatible con los datos epidemiológicos anteriores, dado el vínculo conocido entre la magnitud de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS y el nivel de contagio (104). Con respecto a los niños, encontramos, sin embargo, que la CV de SARS-CoV-2 fue comparable en sintomáticos y asintomáticos, aunque en los primeros se observó una tendencia sutil hacia cargas virales más altas. Aunque es especulativo, la fecha del inicio de los síntomas podría haber sido más inexacta en niños que en adultos. Esto podría haber provocado un retraso en las pruebas, mucho más allá del momento en que se pudo haber alcanzado la carga máxima de ARN del SARS CoV-2. Nuestros datos concuerdan con los de Hurst et al. (114), pero contradicen los de Kociolek et al (85) que apuntaba cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 más bajas en niños asintomáticos que en aquellos con COVID 19. En este sentido, se debe enfatizar que, en nuestro estudio, los individuos asintomáticos fueron evaluados relativamente pronto después de la exposición (mediana de 7 días).

La mayoría de las pruebas PCR de SARS-CoV-2 disponibles comercialmente no amplifican simultáneamente un gen de limpieza, lo que hace imposible evaluar la calidad de la muestra en términos de celularidad. Además, la calidad de las muestras de ENF varía considerablemente (101), lo que puede afectar a la precisión de las cargas virales

estimadas. Comparamos el contenido celular de un conjunto de muestras seleccionadas al azar de niños y adultos, utilizando la RT-PCR de un gen de limpieza establecido en paralelo. Encontramos CT coincidentes en muestras de ambos grupos, por lo que es poco probable que las diferencias en la celularidad tengan un impacto reseñable en nuestros resultados. Puntualizar que sólo se analizó un reducido número de muestras de ENF para determinar su contenido celular.

El presente estudio tiene varias limitaciones:

- Las diferencias en el momento de la recolección de ENF entre individuos sintomáticos y asintomáticos pueden haber difuminado las verdaderas diferencias en la CV de ARN entre los grupos. Mientras que la cinética de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS se ha establecido claramente en individuos sintomáticos, con una CV máxima alrededor del momento del inicio de los síntomas (102), aún no se ha caracterizado de manera precisa en sujetos asintomáticos. De hecho, no se puede descartar un sesgo de la población hacia cargas virales más altas en el grupo de población asintomática en el presente estudio.
- Los participantes se clasificaron como asintomáticos si informaron estar libres de síntomas en el momento de la prueba de RT-PCR. No teníamos datos sobre su resultado clínico, es decir, si eran presintomáticos en el momento de la toma de muestras o si desarrollaron síntomas después.
- En los análisis sólo se tuvieron en cuenta las cargas virales iniciales de SARS-CoV-2, por lo que no podríamos haber capturado la verdadera tasa de replicación del virus de forma individual.
- No se intentó clasificar en subcategorías a las personas según su condición médica inicial.

V.2 Carga viral inicial y cinética de la variante Alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de adultos y niños (Artículo II)

V.2.1 Grupo de estudio

Entre los pacientes con COVID-19, el tiempo desde los síntomas hasta la prueba de RT-qPCR fue de 5 días (rango, 1–10 días) en el grupo B.1.1.7 y 4 días (rango, 1–10 días) en el grupo control, sin diferencias entre niños y adultos. En cuanto a los individuos

asintomáticos (140 infectados por la variante Alfa), la prueba de RT-qPCR se realizó dentro de los primeros 10 días desde el diagnóstico o contacto con el caso índice en individuos de ambos grupos. En los análisis que se describen a continuación se incluyeron un total de 1152 muestras de ENF (mediana de 1 muestra/paciente; rango, 1–3).

Descubrimos que las personas infectadas con el linaje B.1.1.7 del SARS-CoV-2 mostraron cargas virales iniciales de ENF alrededor de 1 log₁₀ más altas que los controles (mediana, 7,6 log₁₀ copias/ml; rango, 3,3–12,1 frente a 6,8 log₁₀ copias/ml; rango, 2,4 – 13,1; $P < 0,001$) (**figura V.7. A**).

Un subanálisis que incluyó sólo individuos infectados por el linaje B.1.1.7 del SARS-CoV-2 según lo confirmado por la secuenciación del genoma completo ($n = 108$) mostró resultados comparables ($P < 0,001$). Una observación novedosa fue que la diferencia en la CV entre los individuos infectados con B.1.1.7 y los no infectados con B.1.1.7 siguió siendo significativa ($P < 0,001$) para los adultos (**figura V.7. B**), pero no para los niños ($P = 0,41$) (**figura V.7. C**). Cuando los pacientes sintomáticos infectados por B.1.1.7 u otras variantes se analizaron por separado, las cargas virales iniciales también fueron más altas para adultos ($P = 0,04$) (**figura V.7. D**), pero no para niños ($P = 0,16$) (**figura V.7. E**). No se observó una tendencia hacia cargas virales más altas en los sujetos infectados con B.1.1.7. que los niños podrían presentar una respuesta temprana y más robusta de la inmunidad innata ante el SARS-CoV-2 en comparación con los adultos. Esto podría tener el potencial de reducir la aparente ventaja replicativa de la variante B.1.1.7 en comparación con otras variantes menos transmisibles (50). Los adultos asintomáticos infectados por la variante B.1.1.7 tenían cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 iniciales más altas ($P = 0,02$) que los controles (**figura V.7. F**).

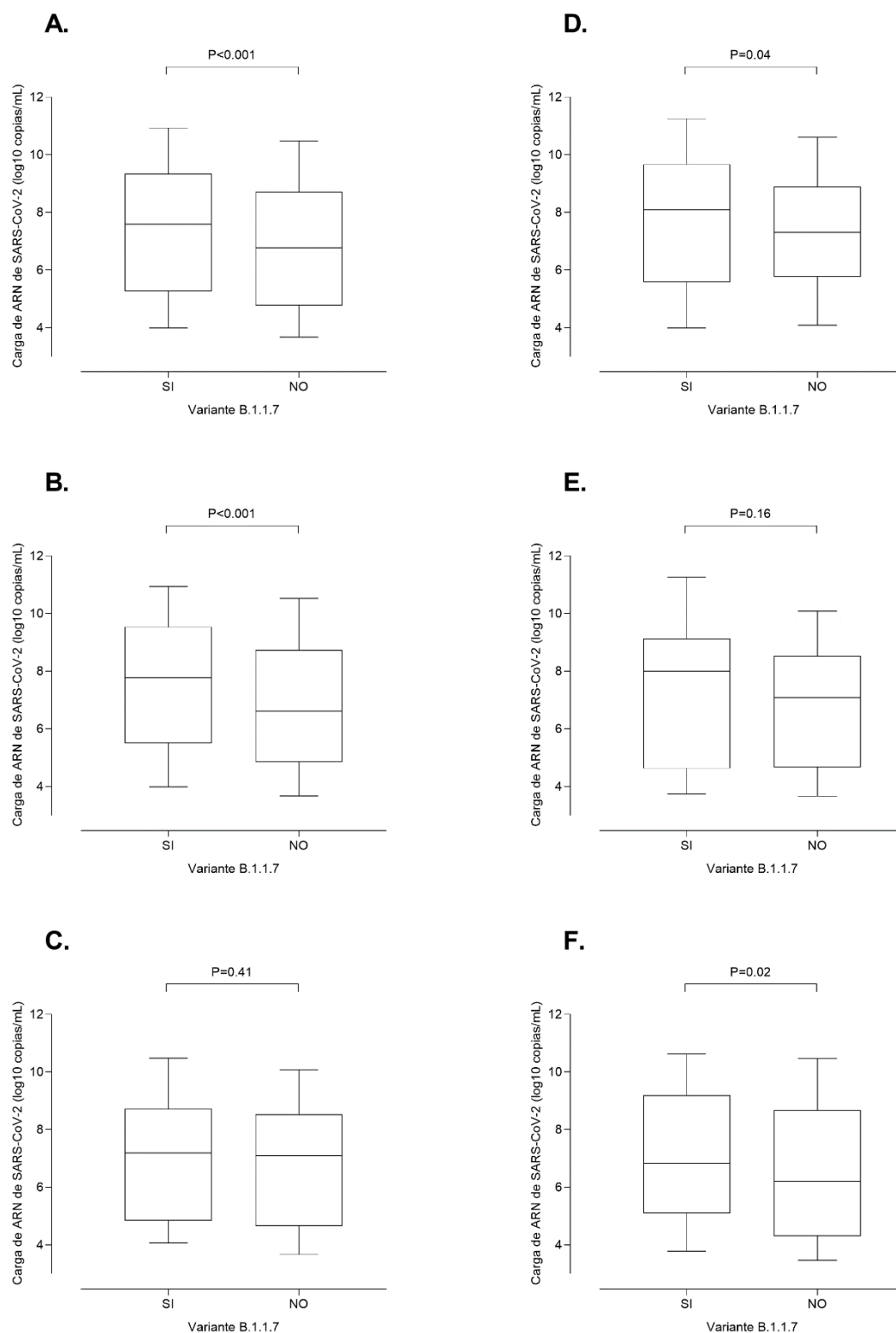
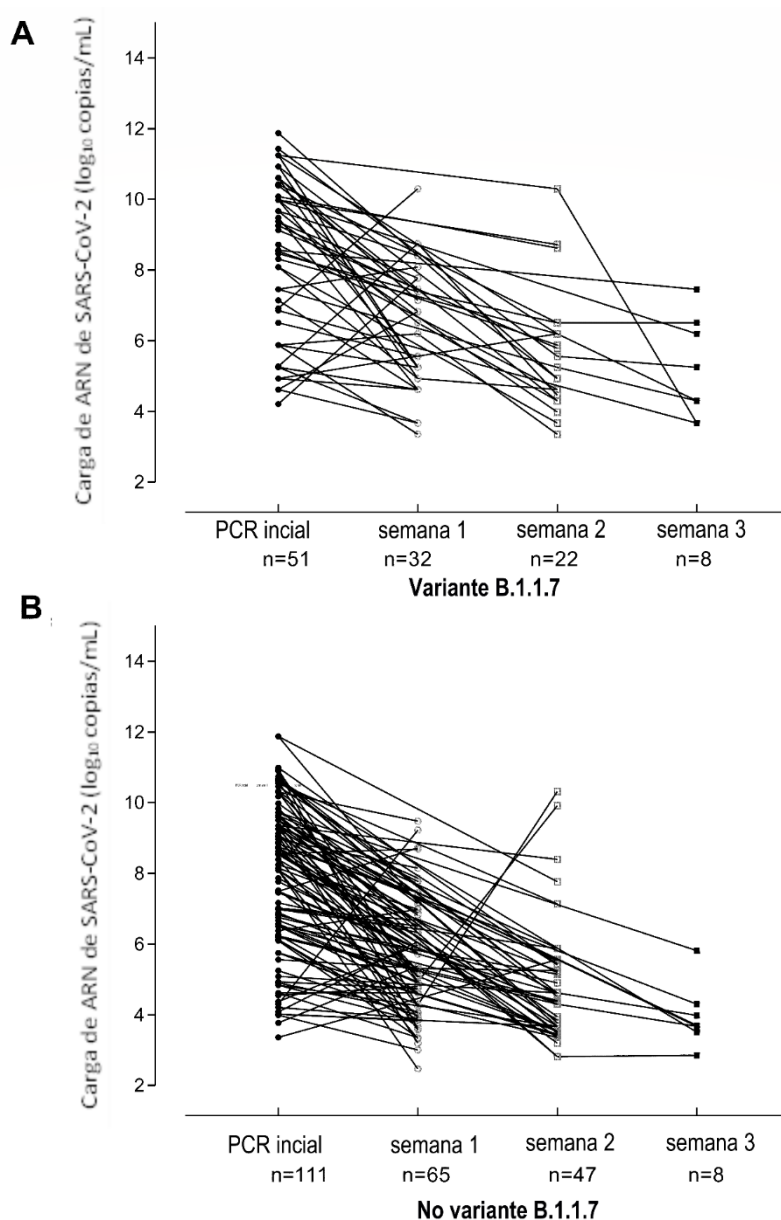


Figura V.7. Comparación de cargas virales iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de ENF de individuos infectados por la variante B.1.1.7 u otras variantes. Los datos se representan para todos los participantes (**A**), adultos (**B**), niños (<18 años) (**C**), adultos con COVID-19 (**D**) niños con COVID-19 (**E**) y adultos asintomáticos (**F**).

Es de interés que las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 medidas en los grupos de comparación probablemente no estuvieran sesgadas por las diferencias en la celularidad en las muestras de ENF. Esto se determinó mediante la amplificación del gen de limpieza de la β -glucuronidasa por RT-PCR (101) en 50 muestras seleccionadas al azar, de las cuales 24 eran de la variante B.1.1.7 y 26 eran controles.

Un total de 162 participantes (51 infectados por la variante B.1.1.7 y 111 controles) tuvieron 2 o más muestras de ENF de seguimiento recolectadas dentro de las 3 semanas posteriores al diagnóstico. Como se muestra en la **figura V.8**, se observaron cargas virales decrecientes en la mayoría de los participantes, independientemente de si estaban infectados con la variante B.1.1.7 (**figura V.8. A**) o no (**figura V.8. B**).



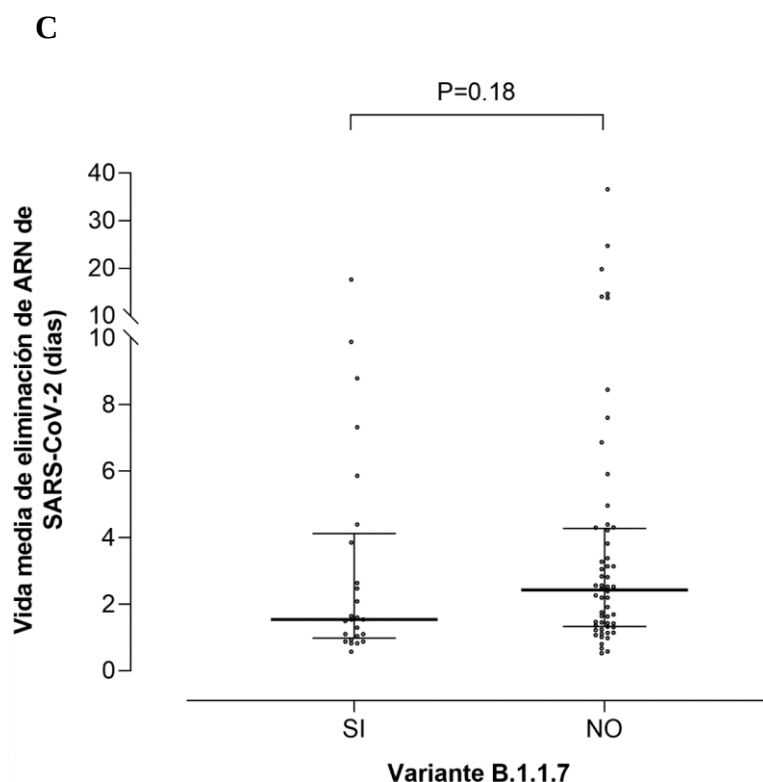


Figura V.8. Cinética de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en muestras ENF de individuos infectados por la variante B.1.1.7 (**A**) o por otras variantes (**B**) hasta la semana 3 después del diagnóstico de infección por SARS-CoV-2. Vida media del ARN del SARS-CoV-2 en el TRS de individuos infectados por la variante B.1.1.7 o por otras variantes (**C**).

La cinética de eliminación del ARN del SARS-CoV-2 siguió una curva de descomposición logarítmica en la mayoría de los individuos, expresada por la ecuación, $y_t = y_0 e^{-kt}$ donde y_0 es la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2, t es el tiempo de seguimiento del muestreo desde el diagnóstico (resultado inicial de RT-PCR) y k es la constante de descomposición. Luego se calculó la vida media de la CV de ARN del SARS-CoV-2 mediante la ecuación $\ln 2/k$. La vida media de ARN del SARS-CoV-2 en TRS se calculó sólo para individuos que cumplieron con dos criterios:

- Mostrar una trayectoria descendente a lo largo del período de estudio (tres semanas).
- Tener una muestra de seguimiento de los 4 a los 10 días posteriores a la inicial.

La vida media de ARN del SARS-CoV-2 en TRS se pudo calcular para 25 individuos infectados por la variante B.1.1.7 y 56 controles. La mayoría de los individuos en ambos grupos de comparación eran adultos y se emparejaron por sexo, presencia o ausencia de síntomas, hospitalización y edad (mediana, 38 años en ambos grupos). Como

se muestra en la **figura V.8. C**, la vida media de la CV de ARN del SARS-CoV-2 fue similar ($P=0,18$) entre los grupos (infectados por B.1.1.7: mediana 1,54 días; rango, 0,5–17 días; controles: 2,42 días; rango, 0,27–36 días). A diferencia de nuestros hallazgos, Calistri et al. (87) informaron una persistencia más prolongada del ARN del SARS-CoV-2 en muestras de ENF en individuos infectados con la variante B.1.1.7 (mediana de 16 días) en comparación con los controles (mediana de 14 días). Los principales inconvenientes de ese estudio fueron la falta de información sobre el estado clínico de los participantes y la ausencia de muestras secuenciales recolectadas de forma individual.

V.2.2 Discusión

Los datos respaldan que la CV inicial de SARS-CoV-2 es mayor en los adultos infectados con B.1.1.7 que, en los infectados por otras variantes, independientemente de la presencia o ausencia de síntomas, pero no en los niños sintomáticos.

El estudio actual tiene varias limitaciones:

- El diseño retrospectivo.
- La falta de muestras de seguimiento de muchos participantes.
- El bajo número de niños con infección sintomática B.1.1.7 y con infección asintomática no B.1.1.7.
- La falta de información sobre el momento de la recogida de muestras en sujetos asintomáticos tras el contacto con el caso índice.
- El número reducido de individuos a partir de los cuales se podía calcular la vida media de la CV.

V.3 Cargas virales de ARN de las variantes Alfa (B.1.1.7) y Delta (B.1.617.2) del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas en el momento del diagnóstico estratificadas por edad, presentación clínica y estado de vacunación (Artículo III)

Inicialmente, comparamos las cargas virales de ARN de muestras ENF en individuos no vacunados con COVID-19 estratificados por edad (niños $18 \leq \text{años}$ /adultos) y tiempo desde el inicio de los síntomas (definido arbitrariamente como 0-2, 3-7 o ≥ 8 días).

Como se muestra en la **figura V.9**, se observó una tendencia hacia cargas virales mayores de ARN del SARS-CoV-2 para la variante Delta tanto en adultos como en niños dentro de los 2 días posteriores al inicio de los síntomas ($P= 0,27$ y $P=0,62$ respectivamente), no después.

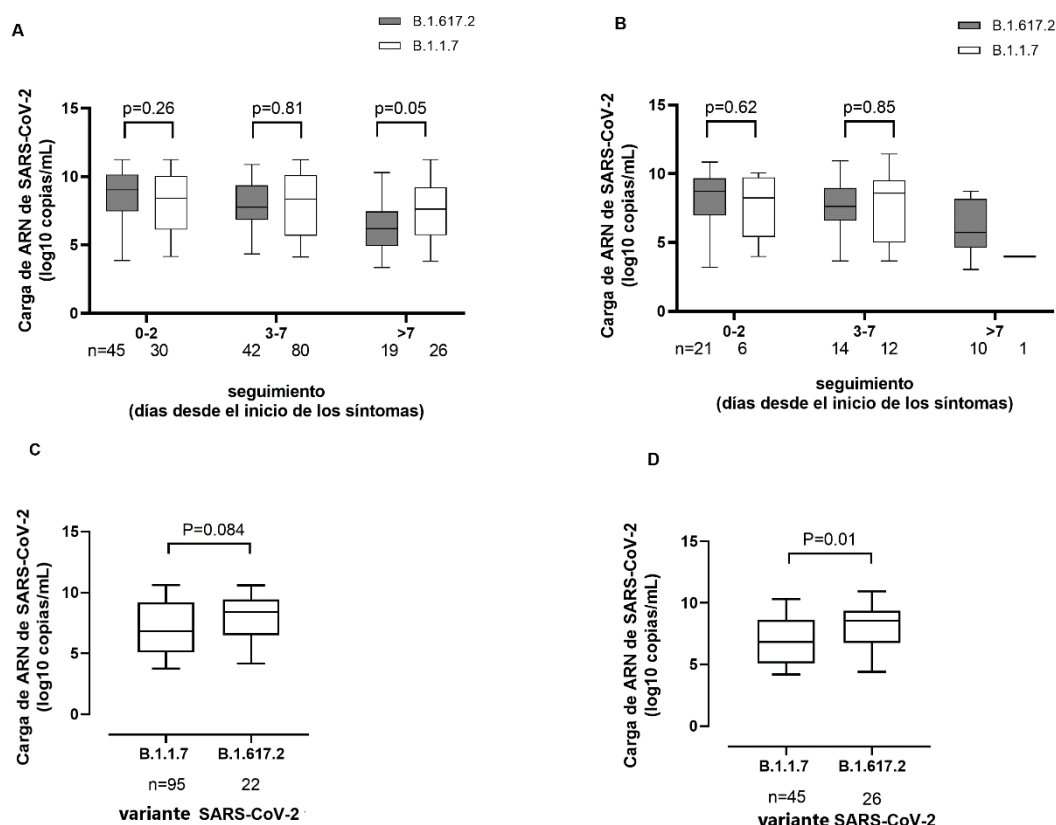


Figura V.9. Cargas virales iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en muestras ENF de personas no vacunadas infectadas por las variantes Alfa (B.1.1.7) o Delta (B.1.617.2). Las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en ENF por tiempo de muestreo en relación con el inicio de los síntomas se muestran por separado para adultos (**A**) y niños (**B**). También para participantes asintomáticos adultos (**C**) y niños (**D**).

Se observó una amplia gama de cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 ($3,0 \geq 11,0 \log_{10}$ copias/ml) en los individuos en los grupos de comparación. En los participantes asintomáticos en el momento de la prueba RT-qPCT, las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 fueron notablemente más altas para la variante Delta que para la variante Alfa, tanto en adultos (mediana, $1,5 \log_{10}$ más alta) como en niños (mediana, $1,7 \log_{10}$ más alta) ($P= 0,08$ y $P=0,01$, respectivamente).

Los individuos asintomáticos en los grupos de comparación fueron emparejados por el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del caso índice hasta la prueba de RT-qPCR (en un período de 7 días). Desafortunadamente, no hubo datos disponibles sobre cómo evolucionaron las infecciones asintomáticas con el tiempo.

Como se puede ver en la **figura V.10**, la pendiente de la línea de regresión que mejor se ajusta a la disminución de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 fue ligeramente mayor para la variante Delta que para la variante Alfa, independientemente de la edad del participante. Aunque especulativo, los datos sugieren que la CV máxima en ENF puede alcanzarse antes en individuos infectados por la variante Delta que por la variante Alfa: incluso antes del inicio de los síntomas, lo que favorece una mayor transmisibilidad. Los datos no respaldaron un período más prolongado de excreción viral en el TRS para la variante Delta, como se sugirió anteriormente (115)

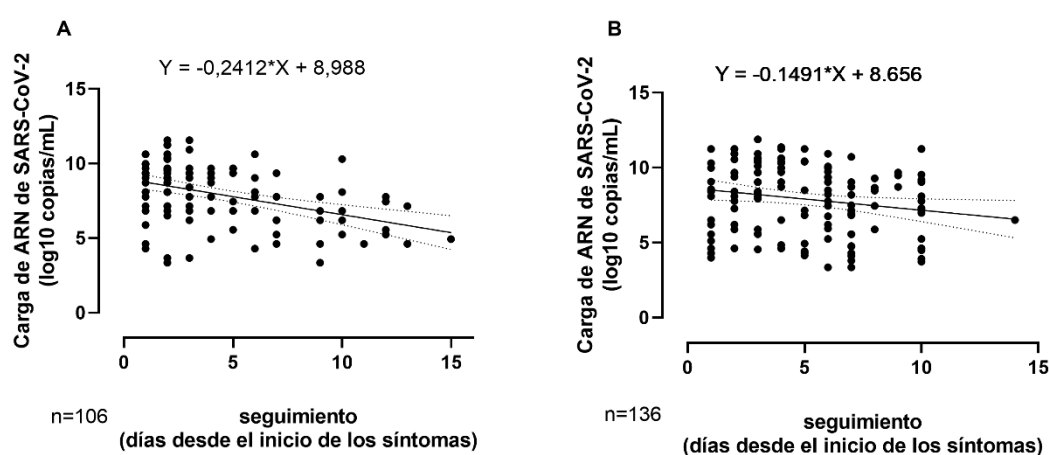


Figura V.10. Análisis de regresión lineal de cargas virales iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en individuos infectados con COVID-19 por las variantes Delta (A) y Alfa (B), según el tiempo de muestreo desde el inicio de los síntomas.

A continuación, comparamos las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 en ENF para la variante Delta en adultos no vacunados (n= 128) y completamente vacunados (n= 51) con Comirnaty® (n= 27), Spikevax® (n= 9), Janssen® (n= 10), o Vaxzevria® (n= 5). El tiempo transcurrido desde la vacunación con la dosis completa fue de 51 días hasta la infección (rango, 14 – 177). En general, se encontró que la CV de ARN del SARS-CoV-2 era mayor en los no vacunados (n= 128; mediana, 8,1 log10 copias/ml; rango, 3,4-11,6) que en los vacunados (n= 51; mediana, 7,8 log10 copias/ml; rango 3,0-11,2), aunque sin alcanzar significación estadística (P= 0,31).

Al considerar a los pacientes con COVID-19 para el análisis (emparejados por el tiempo desde que aparecieron los síntomas: mediana, 3 días en ambos grupos), se observó una clara tendencia ($P=0,12$) hacia cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 más altas en los individuos no vacunados. (8,1 log₁₀ copias/ml; rango, 3,3–11,6) en comparación con los participantes vacunados (mediana, 7,4 log₁₀ copias/ml; rango, 3,3–11,2).

Por el contrario, los individuos asintomáticos vacunados y no vacunados mostraron cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 bastante similares (mediana, 8,7 log₁₀ copias/ml; rango, 3,0–10,9, y mediana, 8,4 log₁₀ copias/ml; rango, 4,0–10,6; $P=0,85$).

Los participantes vacunados y no vacunados se emparejaron por sexo ($P=0,1$, pero no por edad, $P<0,01$). Se han publicado datos contradictorios (115) sobre este tema, que probablemente se explican por las diferencias entre estudios con respecto al tiempo de la prueba de RT-qPCR.

V.3.1 Discusión

Finalmente, mostramos que la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras ENF para la variante B.1.617.2 ($n=138$) y las subvariantes emergentes recientemente ($n=47$; AY.4, $n=29$, AY.12, $n=9$, AY.5, $n=5$, AY.9, $n=3$ y AY.3, $n=1$) fueron bastante similares (mediana, 8,7 log₁₀ copias/ml; rango, 4,6–11,6 versus mediana, 8,4 log₁₀ copias/ml; rango, 4,0–12,1; $P=0,20$).

Los grupos de comparación se emparejaron por sexo ($P=0,61$), edad ($P=0,34$), desarrollo de COVID-19 ($P=0,44$), tiempo hasta el muestreo de ENF para casos sintomáticos y asintomáticos ($P=0,80$) y estado de vacunación ($P=0,20$). Destacar que ninguna subvariante de B.1.617.2 parecía tener mutaciones de pico adicionales (K417N, Y145H y A222V) que podrían conferir resistencia parcial a los anticuerpos neutralizantes provocados por la vacuna.

En resumen, encontramos cargas virales iniciales de muestras de ENF más altas para la variante Delta que para la variante Alfa, en particular durante la fase asintomática de la infección. No se observaron diferencias significativas entre las cargas virales de participantes infectados con Delta vacunados y no vacunados, esto puede ayudar a explicar el comportamiento epidemiológico de la variante Delta.

V.4 Análisis cinético combinado de RNAemia, N-Antigenemia y anticuerpos específicos del virus SARS-CoV-2 en adultos en estado crítico con COVID-19 (Artículo IV)

V.4.1 Grupo de estudio

Los pacientes ingresaron en la UCI en una mediana de 8 días (rango, 2-25) después del inicio de los síntomas. La mayoría de los pacientes finalmente requirió ventilación mecánica (88,7%). La mediana de tiempo de estancia en la UCI fue de 19 días (rango, 2-67). Todos los pacientes excepto uno fue tratado con corticosteroides, mientras que Remdesivir y Tocilizumab se usaron en el 21 % y el 38 % de los pacientes, respectivamente.

Un total de 338 muestras de plasma de 71 pacientes (mediana, 4 muestras/paciente; rango, 1-16) recolectadas después de la admisión en la UCI estaban disponibles para análisis. En general, la primera muestra de plasma en estos pacientes se extrajo en una mediana de 12 días (rango, 3-38 días) después del inicio de los síntomas.

V.4.2 Detección de ARNemia viral y N-antigenemia por SARS-CoV-2 en la cohorte

Se detectaron ARNemia viral y N-antigenemia por SARS-CoV-2 en 37 y 43 muestras de 26 (36,5 %) y 30 (42,2 %) pacientes, respectivamente. Dado que el grado de replicación del virus en el TRS puede afectar el acceso de partículas de virus intactas o productos virales al torrente sanguíneo, investigamos si la CV de ARN del SARS-CoV-2 en ENF al principio de la infección (mediana de 4 días) después del inicio de los síntomas (rango, 1–11) se asoció con la probabilidad de detectar ARNemia viral y N-antigenemia.

Las estimaciones de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en ENF en el momento del diagnóstico estaban disponibles para 51 de 71, de los cuales 20 y 22 tenían ARNemia viral y N-antigenemia detectables, respectivamente, durante el seguimiento.

En los 20 pacientes restantes, el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 se realizó mediante pruebas LFIC de detección de antígeno (N) o los valores de CT de la RT-qPCR no estaban disponibles. Como se muestra en la **figura V.11**, los pacientes que desarrollaron ARNemia viral y N-antigenemia muestran una CV de ARN del SARS-CoV-2 significativamente mayor en ENF ($P= 0,009$ y $P= 0,04$, respectivamente) en el momento del diagnóstico.

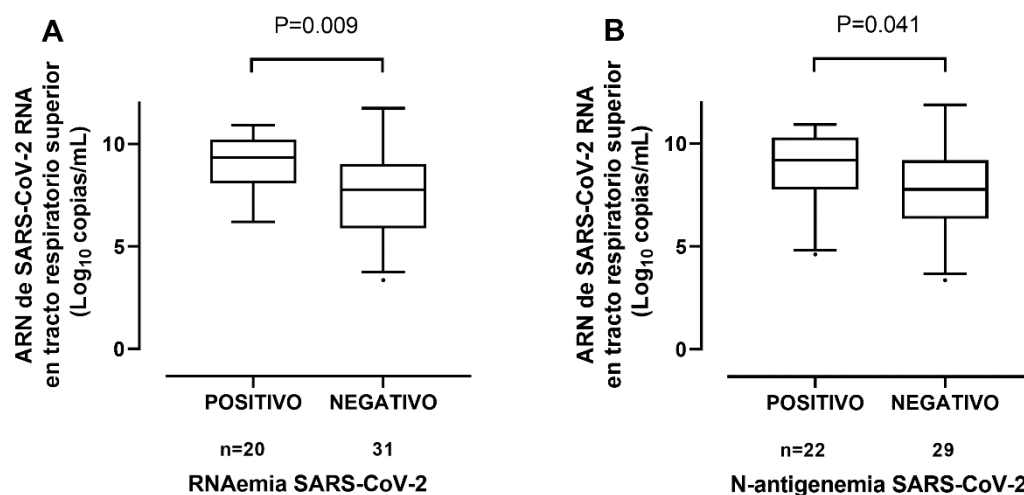


Figura V.11. Carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en pacientes en estado crítico con o sin detección de ARNemia viral (A) o N-antigenemia (B) en el momento del diagnóstico molecular de la infección por SARS-CoV-2.

Se observó una correlación positiva entre las cargas virales de ENF y los niveles de ARNemia viral en las primeras muestras de plasma de RT-qPCR positivas ($Rho = 0,42$; $P= 0,1$).

En particular, ni el tratamiento con Remdesivir ni con Tocilizumab tuvo un impacto en la tasa de ARNemia viral positiva para SARS-CoV-2 ($P= 0,57$ y $0,60$, respectivamente) o N-antigenemia ($P= 0,58$ y $P= 0,41$, respectivamente).

V.4.3 Dinámica de RNAemia viral, N-antigenemia y anticuerpos específicos del SARS-CoV-2

El tiempo hasta el primer resultado positivo de ARNemia viral y N-antigenemia fue de 10 días (rango, 3-32) y 9 días (rango, 3-29), respectivamente, desde el inicio de los síntomas. Ambos componentes del virus se detectaron por primera vez dentro de los 16

días posteriores a la aparición de los síntomas en todos los pacientes excepto en uno. Ninguna muestra obtenida después del día 32 tenía ARNemia viral detectable o N-antigenemia.

Los anticuerpos contra el RBD del SARS-CoV-2 se detectaron en 67 de los 71 pacientes, con una mediana de tiempo hasta la primera detección de 14 días (rango, 4-38) desde el inicio de los síntomas. De los 4 pacientes que no desarrollaron anticuerpos medibles, 2 tenían ARNemia viral y N-antigenemia detectables.

El tiempo hasta la primera detección de anticuerpos fue comparable para pacientes con o sin ARNemia viral ($P= 0,21$) y N-antigenemia ($P= 0,1$) y no se correlacionó significativamente con la CV inicial en ENF ($Rho = 0,229$; $P= 0,11$). El curso temporal de la detección de ARNemia del SARS CoV-2, N-antigenemia y anticuerpos IgG anti-RBD se muestra en la **Tabla V.1**.

El número de muestras de plasma en las que se codetectaron ARNemia viral o N-antigenemia y anticuerpos IgG anti-RBD fue bastante pequeña (25 y 24 muestras de 338, respectivamente).

Tabla V.1. Detección de ARNemia viral, N-antigenemia anticuerpos IgG anti-RBD por SARS-CoV-2 estratificada por tiempo desde el inicio de los síntomas de COVID-19 en UCI.

Combinación de resultados	Semana 1. N.º	Semana 2. N.º	Semana 3. N.º	≥ Semana 4. N.
Detección de ARNemia y IgG anti-RBD (n=25)	4	12	7	2
Detección de ARNemia y falta de IgG anti-RBD (n=12)	5	5	1	1
Ausencia de ARNemia y detección de IgG anti-RBD (n=272)	4	40	83	145
Ausencia de RNAemia y falta de IgG anti-RBD (n=29)	2	9	4	14
Detección de N-antigenemia y IgG anti-RBD (n=24)	6	16	0	2
Detección de N-antigenemia y ausencia de IgG anti-RBD (n=19)	6	9	2	2
Ausencia de N-antigenemia y detección de IgG anti-RBD (n=273)	2	36	90	145
Ausencia de N-antigenemia y falta de IgG anti-RBD (n=22)	1	5	3	13
RBD, dominio de unión al receptor. N.º, número de ejemplares				

En general, las muestras que contenían ARN viral o proteína N tenían niveles de anticuerpos contra el RBD del SARS-CoV-2 en suero, significativamente más bajos (**figura V.12**) que aquellas en las que no se detectaron estos componentes virales. Además, se observaron niveles decrecientes de anticuerpos en paralelo con niveles crecientes tanto de RNAemia como de N-antigenemia **figura V.13**).

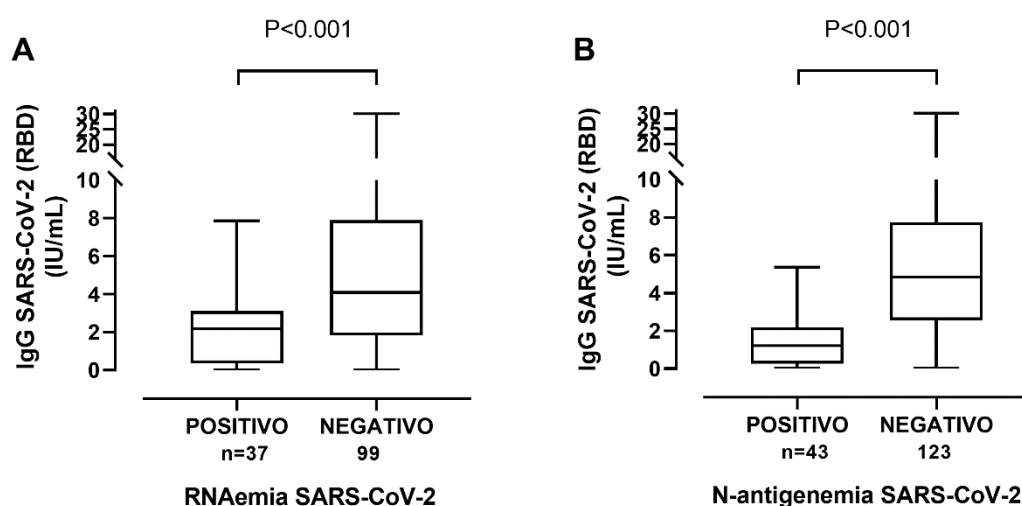


Figura V.12. Niveles de anticuerpos IgG anti-RBD de-SARS-CoV-2 en plasma según la presencia o ausencia de ARNemia viral (**A**) o N-antigenemia (**B**).

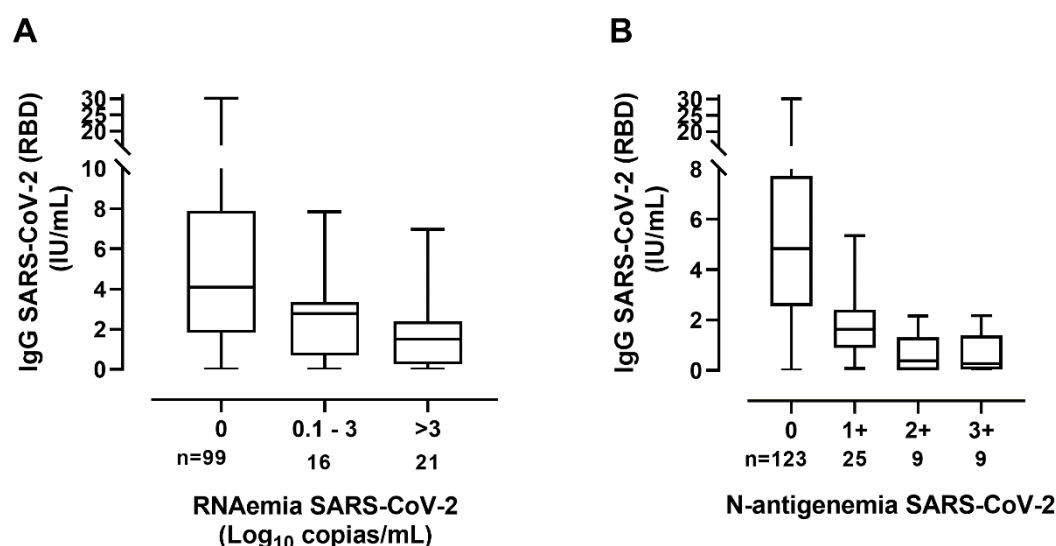


Figura V.13. Niveles de anticuerpos IgG anti-RBD de-SARS-CoV-2 en plasma de acuerdo a la magnitud de la ARNemia del virus (en copias/ml) (**A**) o la N-antigenemia (**B**) (clasificada como se describe en la sección de métodos).

Sin embargo, en general, se observó una correlación inversa bastante modesta ($Rho= 0,35$; $P <0,001$) entre la ARNemia viral y los niveles de anticuerpos contra el IgG anti-RBD de-SARS-CoV-2 (**figura V.14**).

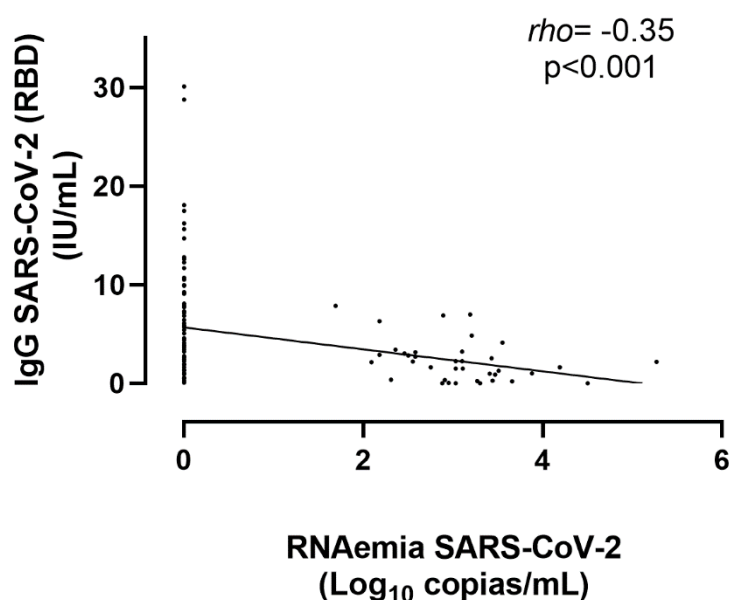


Figura V.14. Relación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD de-SARS-CoV-2 y la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en plasma.

Los datos sobre los anticuerpos reactivos contra el SARS-CoV-2 solo estaban disponibles para 50 muestras de plasma, de las cuales 16 dieron positivo mediante LFIC de detección de antígeno N. Se observó una tendencia ($P= 0,16$) hacia niveles más altos de anticuerpos para las pruebas de plasma negativas mediante el ensayo LFIC de detección de antígeno N que para las pruebas de plasma positivas.

V.4.4 Caracterización de la forma biológica del ARN del SARS-CoV-2 en plasma.

Un total de 7 muestras de plasma de pacientes únicos con ARNemia viral detectable por SARS-CoV-2 (mediana de CV, 3,2 log₁₀/ml; rango, 3,0–3,8), extraídas en una mediana de 9 días después del inicio de los síntomas (rango, 3–12), se ejecutaron en el ensayo de RT-PCR de viabilidad del ARN del SARS-CoV-2. Los datos se muestran en la **Tabla V.2**.

Tabla V.2. Ensayo de viabilidad de RT-PCR realizado con plasma de pacientes de UCI				
N.º de pacientes/día ^a	Pretratamiento (95°C, 10 min)	PtCl4(5mM)	Umbral del ciclo del gen N1 RT-PCR	
			Replicado 1	Replicado 2
1/5	No	No	36.5	36.4
		Sí	ND	ND
	Sí	No	36.4	36.4
		Sí	ND	ND
2/3	No	No	34.8	35,0
		Sí	37.3	37.1
	Sí	No	34,9	35.3
		Sí	ND	ND
3/7	No	No	34.5	34.7
		Sí	ND	ND
	Sí	No	34,9	35.3
		Sí	ND	ND
4/9	No	No	34.7	34.1
		Sí	ND	ND
	Sí	No	35.6	35,9
		Sí	ND	ND
5/12	No	No	34.7	35.8
		Sí	ND	ND
	Sí	No	35.8	35.8
		Sí	ND	ND
6/11	No	No	35.5	35.2
		Sí	ND	ND
	Sí	No	35,9	36.4
		Sí	ND	ND
7/11	No	No	36.5	37.7
		Sí	ND	ND
	Sí	No	36.6	ND
		Sí	ND	ND
ND, no detectado.				
^a día en el que se extrajo plasma después del inicio de los síntomas				

La señal de RT-PCR se eliminó por completo después del tratamiento con PtCl₄ en 6 de las 7 muestras no pretratadas (calentadas), mientras que en la restante (muestra 2, obtenida 3 días después del inicio de los síntomas) el ARN viral todavía se detectó, aunque a un nivel más bajo (aproximadamente 1 log₁₀).

El tratamiento de preparaciones de virus inactivados con calor con PtCl₄ generalmente dio como resultado una reducción de tres veces en el nivel de ARN viral detectado. Por lo tanto, los datos sugirieron que el ARN viral probablemente se encontraba en un estado libre no capsulado en la mayoría de las muestras de plasma sometidas a análisis.

V.4.5 Discusión

La aparición temprana de ARNemia viral y N-antigenemia después de la infección por SARS-CoV-2 se ha asociado con malos resultados clínicos, incluido el aumento de la mortalidad en pacientes con COVID-19 en estado crítico (95,97,116–118) . La magnitud de la ARNemia viral y la N-antigenemia pueden reflejar el grado en que el SARS-CoV-2 se replica en las vías respiratorias, lo que a su vez puede afectar el curso clínico de la infección.

A su vez, los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 pueden prevenir o minimizar la infección extrapulmonar al neutralizar los viriones libres en el compartimento sistémico. Pueden contribuir a la eliminación del virus del torrente sanguíneo por partículas virales inmunocomplejas, que luego son el objetivo de la degradación por parte de las células inmunitarias innatas.

Aunque mecánicamente plausible, ninguna de las suposiciones anteriores ha sido claramente probada.

Para abordar estos problemas, investigamos la dinámica de la ARNemia viral y la N-antigenemia del SARS-CoV-2 en relación con la de los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2, y la influencia en estos parámetros de CV en el TRS en el momento del diagnóstico, en una cohorte relativamente homogénea de pacientes de la UCI.

Como se informó anteriormente (72), la ARNemia viral y la N-antigenemia se detectaron con frecuencia en nuestra cohorte (36,5% y 42,2% de los pacientes

respectivamente). Se objetivaron por primera vez relativamente temprano después del inicio de los síntomas de COVID-19 (dentro de las 2 semanas) y no fueron detectables más allá del día 32 después del inicio de los síntomas.

En nuestra cohorte, la probabilidad de detectar cualquiera de estos componentes virales en plasma de pacientes de UCI estuvo directamente relacionada con la magnitud de la CV de SARS-CoV-2 en ENF en el momento del diagnóstico.

Los datos apuntan a un vínculo entre el grado de replicación del virus en TRS y la CV del virus en el compartimiento de la sangre. Sin embargo, el tiempo de seroconversión no se correlacionó con la CV en ENF, esto contrasta con los datos de un estudio publicado previamente (119).

Las diferencias en las características de los pacientes en las cohortes y, en particular los inmunoensayos utilizados en los estudios, pueden ayudar a explicar la discrepancia.

Los anticuerpos específicos del virus pueden contribuir de manera plausible a la eliminación del SARS-CoV-2 del torrente sanguíneo, esta suposición aún no se ha probado de manera concluyente.

Se ha demostrado que hay una relación inversa entre los niveles de anticuerpos reactivos contra el SARSCoV-2 en suero y la magnitud de la CV del ARN viral del SARS-CoV-2 en la sangre, lo que sugiere que los anticuerpos podrían estar involucrados en la neutralización del virus si las partículas virales maduras ingresan al compartimento sanguíneo. Se ha encontrado que la frecuencia de detección del ARN viral o la proteína N en el plasma sanguíneo están inversamente relacionadas con los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD del SARS-CoV-2. Sin embargo, aunque se ha encontrado una correlación inversa modesta entre la carga del virus y los niveles de anticuerpos IgG anti-RBD del SARS-CoV-2, no se ha encontrado una relación clara entre ellos.

El uso de un ensayo semicuantitativo impidió realizar un análisis similar para la N-antigenemia, con respecto a la cual los datos en la literatura son contradictorios.

En línea con nuestros hallazgos, Martín-Vicente et al. (118) informaron que la frecuencia de N-antigenemia inmediatamente después del ingreso en la UCI (24 h) fue>

2,5 veces mayor en ausencia de anticuerpos que en aquellos con anticuerpos detectables. Además, los niveles de anticuerpos anti-S se correlacionaron inversamente (aunque modestamente) con la carga viral de ARN en plasma ($Rho = -0,45$; $P < 0,001$). Otros estudios también encontraron una mayor tasa de detección de ARNemia viral N-antigenemia o ambas en presencia de niveles bajos o indetectables de anticuerpos anti-S o anti-N en cohortes mixtas (116,120).

Por el contrario, varios estudios no lograron mostrar una correlación inversa entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y los niveles de ARN viral en sangre (121); no obstante, los anticuerpos con distintas actividades funcionales de la neutralización del virus pueden contribuir a la eliminación del virus de la sangre.

La interpretación de los datos anteriores no es sencilla debido a las marcadas diferencias entre los estudios en cuanto a las características de los pacientes, en particular las características analíticas de los inmunoensayos empleados, el tipo de muestra procesada (suero o plasma), el uso de muestras únicas o secuenciales y el momento de la recogida de muestras tras el inicio de los síntomas.

Los inmunoensayos sólo son capaces de detectar anticuerpos en estado libre o inmunocomplejos antígeno-anticuerpo con sitios de unión de anticuerpos disponibles (122) Ayudan a visualizar la forma biológica del virus presente en la sangre (ya sea partículas virales del genoma infeccioso o defectuoso, componentes virales libres, o ambos); ayudando a interpretar correctamente la dinámica virus-anticuerpo.

Mediante el uso de un ensayo de viabilidad de RT-PCR demostramos que, dentro del período de tiempo examinado, la mayoría del ARN viral presente en la sangre probablemente se encuentre en un estado no capsulado, lo que indica que la principal fuente de productos virales (ARN y proteínas) en la sangre podría ser PANoptosis en el TRS (122). Una de cada siete muestras de plasma arrojó un perfil de viabilidad de RT-PCR compatible con la presencia de ARN del virus capsulado (protegido).

Se han observado partículas virales aparentemente intactas en gránulos de plasma usando tomografía electrónica e inmunotinción (94). Cabe señalar que la última muestra se obtuvo poco después del inicio de los síntomas (3 días), lo que sugiere que la presencia

de viriones intactos en el torrente sanguíneo puede estar restringida a una ventana estrecha cercana al momento de contraer la infección.

En resumen, los datos presentados respaldan que las tasas de detección de ARNemia y N-antigenemia del SARS-CoV-2, pero no el tiempo hasta la primera detección de anticuerpos anti-S, están modulados por el nivel de replicación del virus en el TRS. Siendo más probable que se documentaran ARNemia viral y N-antigenemia en pacientes con niveles de anticuerpos anti-S o anti-N bajos que altos. La modesta correlación observada entre los niveles de anticuerpos y las cargas virales de ARN en muestras de plasma sugiere que los anticuerpos no juegan un papel predominante en la eliminación del virus del torrente sanguíneo, al menos durante la ventana de tiempo analizada (mediana de 12 días después del inicio de los síntomas). En cambio, parece que los componentes libres del virus, en lugar de las partículas intactas del virus, son la principal forma biológica del SARS-CoV-2 en la sangre en este periodo.

El estudio actual tiene varias limitaciones:

- Debido al reducido tamaño de la muestra, no fue posible realizar subanálisis estadísticos para evaluar cómo la demografía, los factores de riesgo clínicos y el uso de diferentes terapias podrían haber influido en los resultados de los pacientes.
- La mayoría de los pacientes ingresados en la UCI se encontraban en una fase avanzada de la infección por SARS-CoV-2, en la cual el cuadro clínico se asocia principalmente con la respuesta inflamatoria aberrante que el virus desencadena en el organismo.
- El uso de métodos analíticos con sensibilidad subóptima para la detección de RNAemia y N-antigenemia, y la falta de datos sobre S-antigenemia.
- No se realizó la caracterización funcional de los anticuerpos (evaluación de su actividad neutralizante frente al virus).

Por el contrario, nuestro análisis de muestras secuenciales de pacientes podría considerarse una fortaleza de la investigación.

V.5 La carga viral inicial de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas no está asociada con la gravedad y la resolución a mediano plazo de la neumonía en pacientes con COVID-19 (Artículo V)

La CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 en ENF se cuantificó en una mediana de 6 días después del inicio de los síntomas (rango, 3–8). La mediana de las cargas virales de ARN del SARS-CoV-2 no mostró diferencias significativas entre los períodos de estudio de la variante Wuhan-Hu-1 y Ómicron BA.1 (6,2 log₁₀ copias/ml frente a 7,1 log₁₀ copias/ml, en tiempos de recolección de muestras equivalentes; P= 0,07). Como se muestra en la **figura V.15**, los pacientes mostraron cargas virales comparables (P= 0,21) en ENF tanto si se recuperaron de neumonía como si no (mediana, 6,51 log₁₀ copias/ml frente a 5,88 log₁₀ copias/ml). Se recolectaron muestras de ENF de pacientes en los dos grupos dentro de un marco de tiempo comparable después del inicio de los síntomas (P= 0.39).

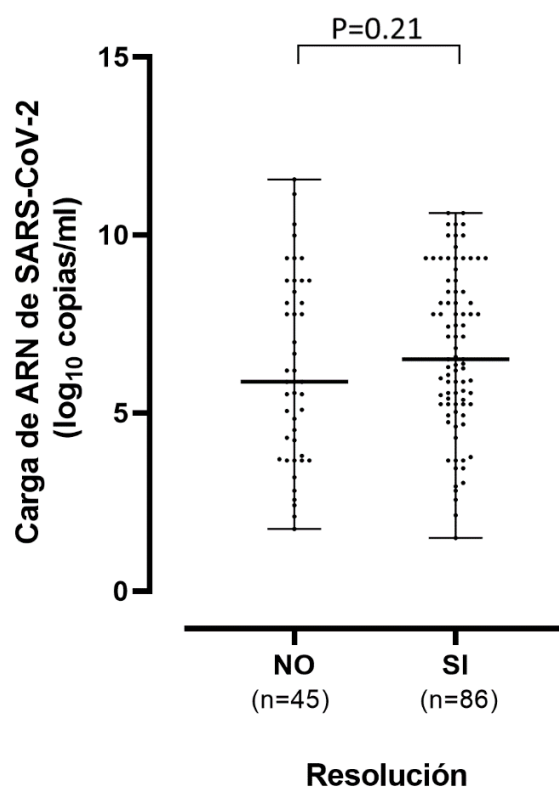


Figura V.15. Comparación de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en muestras ENF al momento del diagnóstico entre pacientes con COVID-19 que se recuperaron o no de neumonía.

Realizamos un subanálisis para evaluar el impacto potencial de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de ENF, en la resolución según el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. Los siguientes plazos se definieron arbitrariamente: 0 a 2 días, 3 a 5 días, 6 a 8 días y 9 a 10 días.

Los pacientes con ENF recolectados a los 11 o más días después del inicio de los síntomas (n = 27) fueron excluidos debido a la falta de correspondencia entre los grupos de comparación. La CV de ARN del SARS-CoV-2 fue comparable entre los pacientes en todos los períodos de tiempo, independientemente de si se recuperaron o no (**Tabla V.3.**).

Tabla V.3. Impacto de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en muestras ENF en el momento del diagnóstico sobre la recuperación de la neumonía por COVID-19, 2 meses después del alta hospitalaria			
Días desde el inicio de los síntomas hasta el momento de la recogida de muestras	Mediana (rango) de la CV del ARN del SARS-CoV-2 (en log ₁₀ copias/ml) según la recuperación de la neumonía/no. de pacientes		valor p^a
	Resolución	No resolución	
0-2	8,1(2,9–10,6) /14	8,4 (1,7–11,2) /11	0.80
3–5	7,1 (3,4–10,3) /25	7,8 (5,5–11,6) /6	0.70
6–8	7,1 (2,1–9,4) /24	6,7 (4,8–10) /11	0,56
9–10	5,6 (3,8–8,1) /7	5,0 (3,2–8,7) /6	0,60
^a prueba U de Mann-Whitney			

Los modelos de regresión logística (**Tabla complementaria V.1**) confirmaron la aparente falta de impacto de la CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 con la resolución de la neumonía por COVID-19 (OR, 1,72; IC del 95 %, 0,83–3,58; P= 0,14). Esta observación se mantuvo independientemente de la variante del SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1: OR, 1,74; IC del 95 %, 0,74–4,09; P = 0,20; Ómicron BA.1: OR, 1,74; IC del 95 %, 0,42–7,28; P = 0,44). Como era de esperar, la gravedad de la neumonía se identificó como un factor asociado con la neumonía no resuelta.

Tabla complementaria V.1. Modelos de regresión logística univariada para la identificación de factores de riesgo asociados con la resolución de la neumonía por COVID-19

Variable	Resolución de neumonía	
	OR (IC, 95%)	valor p^a
Hombre vs mujer	1,57 (0,71–3,18)	0.27
>65 años vs. 50-65 y <50 años ^b	0,6 (0,26–1,7)	0.4
50-65 años vs. <50 y >65 años ^b	0,47 (0,18–1,19)	0.1
Uso de Remdesivir (Sí vs. No)	0,9 (0,45–1,95)	0.8
Presentación clínica de la neumonía por COVID-19 (grave vs. leve)	0,39 (0,18–0,87)	0.02
CV inicial de ARN del SARS-CoV-2 (aumentar una unidad en log ₁₀ copias/mL)	1,06 (0,93–1,27)	0.26
CV inicial de ARN del SARS-CoV-2	1,72 (0,83–3,58)	0.14
OR, Odds ratio. ^a Se informaron valores exactos bilaterales de P. ^b Número de pacientes >65 años (n=47), entre 50-65 (n=45) y <50 (n=39).		

V.5.1 Discusión

Nuestros hallazgos contrastan con los de Lerum et al. (100), quienes informaron una asociación negativa entre la CV al inicio del estudio y la capacidad de difusión de los pulmones para el monóxido de carbono a los 3 meses del alta hospitalaria. La variable de prueba de función pulmonar afectada con mayor frecuencia en el grupo de estudio (en pacientes no vacunados) (99). De relevancia, el estudio de Lerum et al. (100) y el nuestro difieren en varios factores potencialmente críticos, como el momento de la recolección de muestras de TRS (mediana de 8 frente a 6 días desde el inicio de los síntomas,

respectivamente) y el momento de la evaluación clínica de los pacientes después del alta hospitalaria (mediana de 3 y 2 meses, respectivamente).

Los datos presentados sugieren que la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores en pacientes con neumonía por COVID-19 no está directamente relacionada con la tasa de recuperación a corto plazo en términos clínicos, de imagenología y de función pulmonar. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que no es recomendable prescribir nuevos antivirales que tengan una fuerte actividad contra el SARS-CoV-2 basados solamente en la magnitud de la CV de ARN del SARS-CoV-2 en TRS poco después del inicio de los síntomas.

El estudio actual tiene varias limitaciones:

- El reducido tamaño de la muestra, particularmente durante la ola Ómicron BA.1.
- La recolección de muestras se realizó demasiado tarde después de la infección por SARS-CoV-2 (mediana de 6 días) para capturar las CV máximas.
- No se realizaron cultivos virales para evaluar el contenido de partículas virales viables en las muestras.
- Ausencia de muestras secuenciales de los participantes, lo que obstaculizó la evaluación de la cinética de CV de ARN del SARS-CoV-2 en la TRS a nivel individual.
- No se realizaron sistemáticamente tomografías computarizadas ni pruebas de función pulmonar distintas de la espirometría

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. La carga viral de ARN del SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) en el tracto respiratorio superior es comparable en niños y adultos, independientemente de que la infección por SARS-CoV-2 sea sintomática o no.
2. La carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior es mayor en adultos infectados con la variante Alfa (B.1.1.7) que en los infectados por la variante Wuhan-Hu-1, con independencia de si la infección es sintomática o no.
3. La carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior es mayor en individuos infectados por la variante Delta (B.1.617) que en aquellos infectados por la variante Alfa (B.1.1.7) especialmente en asintomáticos.
4. La magnitud de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto superior se relaciona directamente con la probabilidad de desarrollo de ARNemia y N-antigenemia.
5. La carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior en el momento del diagnóstico no se asocia con la tasa y el tiempo de recuperación de la neumonía COVID-19.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. 2021.
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, Groot RJ De, Gulyaeva AA, Haagmans BL, et al. The species and its viruses – a statement of the oronavirus study group. *Biorxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). 2020;
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Vol. 5, *Nature Microbiology*. *Nature Research*; 2020. p. 536–44.
4. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;395(10224).
5. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep*. 2020;19.
6. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* (1979). 2020;369(6508).
7. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. In: *Advances in Virus Research*. 2016.
8. Masters PS. *The Molecular Biology of Coronaviruses*. Vol. 65, *Advances in Virus Research*. 2006.
9. Kuo L, Masters PS. Genetic Evidence for a Structural Interaction between the Carboxy Termini of the Membrane and Nucleocapsid Proteins of Mouse Hepatitis Virus. *J Virol*. 2002;76(10).
10. Masters PS, Kuo L, Ye R, Hurst KR, Koetzner CA, Hsue B. Genetic and molecular biological analysis of protein-protein interactions in coronavirus assembly. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006.
11. Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. In: *Advances in Virus Research*. 2016.
12. Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JYC, Wang H, et al. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep*. 2020;33(1).
13. Azad GK, Khan PK. Variations in Orf3a protein of SARS-CoV-2 alter its structure and function. *Biochem Biophys Rep*. 2021;26.
14. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol*. 2003;77(16).
15. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Vol. 3, *Annual Review of Virology*. 2016.
16. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (1979). 2020;367(6483).
17. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2).
18. Khare S, Azevedo M, Parajuli P, Gokulan K. Conformational Changes of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein and Prediction

- of a B-Cell Antigenic Epitope Using Structural Data. *Front Artif Intell.* 2021;4.
19. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;581(7807).
 20. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015;202.
 21. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology.* 2004;203(2).
 22. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J Virol.* 2011;85(9).
 23. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2).
 24. Gidari A, Sabbatini S, Bastianelli S, Pierucci S, Busti C, Bartolini D, et al. Sars-cov-2 survival on surfaces and the effect of uv-c light. *Viruses.* 2021;13(3).
 25. Guo L, Wang M, Zhang L, Mao N, An C, Xu L, et al. Transmission risk of viruses in large mucosal droplets on the surface of objects: A time-based analysis. Vol. 51, *Infectious Diseases Now.* 2021.
 26. Young M, Crook H, Scott J, Edison P. Covid-19: virology, variants, and vaccines. *BMJ Medicine.* 2022 Mar;1(1): e000040.
 27. Carraturo F, Del Giudice C, Morelli M, Cerullo V, Libralato G, Galdiero E, et al. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. Vol. 265, *Environmental Pollution.* 2020.
 28. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. Vol. 323, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2020.
 29. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(18).
 30. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 2020;395(10223).
 31. 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. *The Lancet.* 2020;395(10223).
 32. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. Vol. 21, *Nature Reviews Microbiology.* 2023.
 33. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798).

34. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*. 2020;505.
35. van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun*. 2021;12(1).
36. Cerrada-Romero C, Berastegui-Cabrera J, Camacho-Martínez P, Goikoetxea-Aguirre J, Pérez-Palacios P, Santibáñez S, et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Sci Rep*. 2022;12(1).
37. Dergham J, Delerce J, Bedotto M, La Scola B, Moal V. Isolation of viable sars-cov-2 virus from feces of an immunocompromised patient suggesting a possible fecal mode of transmission. *J Clin Med*. 2021;10(12).
38. Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8).
39. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol*. 2020;92(9).
40. Bordi L, Nicastri E, Scorzolini L, Di Caro A, Capobianchi MR, Castilletti C, et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. Vol. 25, *Eurosurveillance*. 2020.
41. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. Vol. 58, *Journal of Clinical Microbiology*. 2020.
42. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(12).
43. Li T. Diagnosis and clinical management of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: an operational recommendation of Peking Union Medical College Hospital (V2.0): Working Group of 2019 Novel Coronavirus, Peking Union Medical College Hospital. Vol. 9, *Emerging Microbes and Infections*. 2020.
44. 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).
45. Inchingolo AD, Inchingolo AM, Bordea IR, Malcangi G, Xhajanka E, Scarano A, et al. Sars-cov-2 disease through viral genomic and receptor implications: An overview of diagnostic and immunology breakthroughs. Vol. 9, *Microorganisms*. 2021.
46. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell*. 2020;78(4).
47. Scudellari M. How the coronavirus infects cells - and why Delta is so dangerous. *Nature*. 2021;595(7869).

48. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell*. 2020;183(3).
49. Kemp SA, Collier DA, Datir R, Ferreira I, Gayed S, Jahun A, et al. Neutralising antibodies in Spike mediated SARS-CoV-2 adaptation. *medRxiv*. 2020.
50. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* (1979). 2021;372(6538).
51. Paredes MI, Lunn SM, Famulare M, Frisbie LA, Painter I, Burstein R, et al. Associations between SARS-CoV-2 variants and risk of COVID-19 hospitalization among confirmed cases in Washington State: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2022.
52. Freitas ARR, Beckedorff OA, Cavalcanti LP de G, Siqueira AM, Castro DB de, Costa CF da, et al. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. *The Lancet Regional Health - Americas*. 2021;1.
53. Augusto G, Mohsen MO, Zinkhan S, Liu X, Vogel M, Bachmann MF. In vitro data suggest that Indian delta variant B.1.617 of SARS-CoV-2 escapes neutralization by both receptor affinity and immune evasion. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022;77(1).
54. Di Giacomo S, Mercatelli D, Rakhimov A, Giorgi FM. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virol*. 2021;93(9).
55. Sinha S, Tam B, Wang SM. Altered interaction between RBD and ACE2 receptor contributes towards the increased transmissibility of SARS CoV-2 delta, kappa, beta, and gamma strains with RBD double mutations. *bioRxiv*. 2021.
56. Cameroni E, Bowen JE, Rosen LE, Saliba C, Zepeda SK, Culap K, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*. 2022;602(7898).
57. Cao YR, Wang J, Jian F, Xiao T, Song W, Yisimayi A, et al. B.1.1.529 escapes the majority of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies of diverse epitopes. *bioRxiv*. 2021.
58. Sheikh A, Kerr S, Woolhouse M, McMenamin J, Robertson C, Simpson CR, et al. Severity of omicron variant of concern and effectiveness of vaccine boosters against symptomatic disease in Scotland (EAVE II): a national cohort study with nested test-negative design. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(7).
59. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. Vol. 52, *Immunity*. 2020.
60. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(25).
61. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Trigg CR. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. 2020.
62. Tian J, Yuan X, Xiao J, Zhong Q, Yang C, Liu B, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity

- in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol.* 2020;21(7).
63. Ewer KJ, Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Sharpe H, Makinson R, Morter R, et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med.* 2021;27(2).
 64. 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. *New England Journal of Medicine.* 2021;384(5).
 65. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(19).
 66. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, Fernandes AD, Harvey L, Foulkes AS, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(24).
 67. Horby P, Landray M, Haynes R, Juszczak E, Baillie K, Jaki T, et al. Randomised Evaluation of Covid-19 Therapy (RECOVERY). *EudraCT.* 2020;6.
 68. Sterne JAC, Murthy S, Diaz J V., Slutsky AS, Villar J, Angus DC, et al. Association between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality among Critically Ill Patients with COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2020;324(13).
 69. Bikdeli B, Madhavan M V., Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. Vol. 75, *Journal of the American College of Cardiology.* 2020.
 70. Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, Schenck EJ, Chen R, Jabri A, et al. Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(24).
 71. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. Vol. 324, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2020.
 72. Gozalbo-Rovira R, Gimenez E, Latorre V, Francés-Gómez C, Albert E, Buesa J, et al. SARS-CoV-2 antibodies, serum inflammatory biomarkers and clinical severity of hospitalized COVID-19 patients. *Journal of Clinical Virology.* 2020;131.
 73. Olea B, Albert E, Torres I, Gozalbo-Rovira R, Carbonell N, Ferreres J, et al. SARS-CoV-2 N-antigenemia in critically ill adult COVID-19 patients: Frequency and association with inflammatory and tissue-damage biomarkers. *J Med Virol.* 2022;94(1).
 74. Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, Huang CH, Garamani N, Gombar S, et al. High Frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and Association with Severe Disease. *Clinical Infectious Diseases.* 2021;72(9).
 75. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1).
 76. Bermejo-Martin JF, González-Rivera M, Almansa R, Micheloud D, Tedim AP, Domínguez-Gil M, et al. Viral RNA load in plasma is associated with

- critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit Care*. 2020;24(1).
77. Moreno-Pérez O, Merino E, Leon-Ramirez JM, Andres M, Ramos JM, Arenas-Jiménez J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study. *Journal of Infection*. 2021;82(3).
 78. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *The Lancet*. 2021;397(10270).
 79. Tenforde MW, Kim SS, Lindsell CJ, Billig Rose E, Shapiro NI, Files DC, et al. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual Health Among Outpatients with COVID-19 in a Multistate Health Care Systems Network — United. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(30).
 80. Viner RM, Mytton OT, Bonell C, Melendez-Torres GJ, Ward J, Hudson L, et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection among Children and Adolescents Compared with Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 175, *JAMA Pediatrics*. American Medical Association; 2021. p. 143–56.
 81. Colson P, Tissot-Dupont H, Morand A, Boschi C, Ninove L, Esteves-Vieira V, et al. Children account for a small proportion of diagnoses of SARS-CoV-2 infection and do not exhibit greater viral loads than adults. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;39(10).
 82. Heald-Sargent T, Muller WJ, Zheng X, Rippe J, Patel AB, Kociolek LK. Age-related differences in nasopharyngeal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) levels in patients with mild to moderate coronavirus disease 2019 (COVID-19). Vol. 174, *JAMA Pediatrics*. 2020.
 83. Dunning Hotopp JC. Viral Loads of SARS-CoV-2 in Young Children. Vol. 175, *JAMA Pediatrics*. 2021.
 84. Kam KQ, Thoon KC, Maiwald M, Chong CY, Soong HY, Loo LH, et al. SARS-CoV-2 viral RNA load dynamics in the nasopharynx of infected children. *Epidemiol Infect*. 2021.
 85. Kociolek LK, Muller WJ, Yee R, Bard JD, Brown CA, Revell PA, et al. Comparison of upper respiratory viral load distributions in asymptomatic and symptomatic children diagnosed with SARS-CoV-2 infection in pediatric hospital testing programs. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 1;59(1).
 86. Glasgow A, Glasgow J, Limonta D, Solomon P, Lui I, Zhang Y, et al. Engineered ACE2 receptor traps potentially neutralize SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(45).
 87. Calistri P, Amato L, Puglia I, Cito F, Di Giuseppe A, Danzetta ML, et al. Infection sustained by lineage B.1.1.7 of SARS-CoV-2 is characterised by longer persistence and higher viral RNA loads in nasopharyngeal swabs. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021 Apr 1; 105:753–5.
 88. Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, Papa G, Meng B, Ferreira IATM, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*. 2021 Nov 4;599(7883):114–9.
 89. Ong SWX, Chiew CJ, Ang LW, Mak TM, Cui L, Toh MPHS, et al. Clinical and Virological Features of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants of Concern: A Retrospective Cohort

- Study Comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clinical Infectious Diseases*. 2022 Jul 1;75(1): E1128–36.
90. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, et al. Increased transmissibility and global spread of SARSCoV- 2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance*. 2021 Jun 17;26(24):1–6.
 91. Blanquart F, Abad C, Ambroise J, Bernard M, Cosentino G, Giannoli JM, et al. Characterisation of vaccine breakthrough infections of sars-cov-2 delta and alpha variants and within-host viral load dynamics in the community, france, june to july 2021. *Eurosurveillance*. 2021 Sep 16;26(37).
 92. Huai Luo C, Paul Morris C, Sachithanandham J, Amadi A, Gaston DC, Li M, et al. Infection with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Delta Variant Is Associated with Higher Recovery of Infectious Virus Compared to the Alpha Variant in Both Unvaccinated and Vaccinated Individuals. *Clinical Infectious Diseases*. 2022;75(1).
 93. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020 Dec 17;383(25):2451–60.
 94. Jacobs JL, Bain W, Naqvi A, Staines B, Castanha PMS, Yang H, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viremia Is Associated with Coronavirus Disease 2019 Severity and Predicts Clinical Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2022 May 1;74(9):1525–33.
 95. Tang K, Wu L, Luo Y, Gong B. Quantitative assessment of SARS-CoV-2 RNAemia and outcome in patients with coronavirus disease 2019. *J Med Virol*. 2021 May 1;93(5):3165–75.
 96. Shah VK, Firmal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons from the Past. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
 97. Gutmann C, Takov K, Burnap SA, Singh B, Ali H, Theofilatos K, et al. SARS-CoV-2 RNAemia and proteomic trajectories inform prognostication in COVID-19 patients admitted to intensive care. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
 98. Kreuzberger N, Hirsch C, Chai KL, Tomlinson E, Khosravi Z, Popp M, et al. SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021 Sep 2;2021(9).
 99. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(7).
 100. Lerum TV, Maltzahn NN, Aukrust P, Trøseid M, Henriksen KN, Kåsine T, et al. Persistent pulmonary pathology after COVID-19 is associated with high viral load, weak antibody response, and high levels of matrix metalloproteinase-9. *Sci Rep*. 2021;11(1).
 101. Albert E, Ferrer B, Torres I, Serrano A, Alcaraz MJ, Buesa J, et al. Amplification of human β -glucuronidase gene for appraising the accuracy of negative SARS-CoV-2 RT-PCR results in upper respiratory tract specimens. Vol. 93, *Journal of Medical Virology*. 2021.
 102. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid

- point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe*. 2021;2(7).
103. Makhado NA, Matabane E, Faccin M, Pinçon C, Jouet A, Boutachkourt F, et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(12).
 104. Munro APS, Faust SN. Children are not COVID-19 super spreaders: Time to go back to school. Vol. 105, *Archives of Disease in Childhood*. BMJ Publishing Group; 2020. p. 618–9.
 105. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May 28;581(7809):465–9.
 106. Han MS, Choi EH, Chang SH, Jin B Lo, Lee EJ, Kim BN, et al. Clinical Characteristics and Viral RNA Detection in Children with Coronavirus Disease 2019 in the Republic of Korea. *JAMA Pediatr*. 2021 Jan 1;175(1):73–80.
 107. Riediker M, Morawska L. Low exhaled breath droplet formation may explain why children are poor SARS-CoV-2 transmitters. *Aerosol Air Qual Res*. 2020 Jul 1;20(7):1513–5.
 108. Lyngse FP, Mølbak K, Franck KT, Nielsen C, Skov RL, Voldstedlund M, et al. Association between SARS-CoV-2 Transmissibility, Viral Load, and Age in Households. *medRxiv*. 2021;
 109. Huff H V., Singh A. Asymptomatic transmission during the Coronavirus disease 2019 pandemic and implications for public health strategies. *Clinical Infectious Diseases*. 2020 Nov 15;71(10):2752–6.
 110. Qiu X, Nergiz AI, Maraolo AE, Bogoch II, Low N, Cevik M. The role of asymptomatic and pre-symptomatic infection in SARS-CoV-2 transmission—a living systematic review. Vol. 27, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2021. p. 511–9.
 111. Wu Z, McGoogan JM. Asymptomatic and Pre-Symptomatic COVID-19 in China. Vol. 9, *Infectious Diseases of Poverty*. 2020.
 112. Lee S, Kim T, Lee E, Lee C, Kim H, Rhee H, et al. Clinical Course and Molecular Viral Shedding among Asymptomatic and Symptomatic Patients with SARS-CoV-2 Infection in a Community Treatment Center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med*. 2020 Nov 1;180(11):1447–52.
 113. Ra SH, Lim JS, Kim GU, Kim MJ, Jung J, Kim SH. Upper respiratory viral load in asymptomatic individuals and mildly symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection. *Thorax*. 2021 Jan 1;76(1):61–3.
 114. Hurst JH, Heston SM, Chambers HN, Cunningham HM, Price MJ, Suarez L, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections among Children in the Biospecimens from Respiratory Virus-Exposed Kids (BRAVE Kids) Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73(9).
 115. Luo CH, Morris CP, Sachithanandham J, Amadi A, Gaston D, Li M, et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta Variant is Associated with Higher Infectious Virus Loads Compared to the Alpha Variant in both Unvaccinated and Vaccinated Individuals. *medRxiv*, 2021.
 116. Eberhardt KA, Meyer-Schwickerath C, Heger E, Knops E, Lehmann C, Rybníček J, et al. RNAemia Corresponds to Disease Severity and Antibody Response in Hospitalized COVID-19 Patients. *Viruses*, 2020.

117. Le Hingrat Q, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, et al. Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 May 1;27(5): 789.e1-789.e5.
118. Martin-Vicente M, Almansa R, Martínez I, Tedim AP, Bustamante E, Tamayo L, et al. Absent or insufficient anti-SARS-CoV-2 S antibodies at ICU admission are associated to higher viral loads in plasma, antigenemia and mortality in COVID-19 patients. *medRxiv*, 2021.
119. Masiá M, Telenti G, Fernández M, García JA, Agulló V, Padilla S, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized with COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response. *Open Forum Infect Dis*. 2021 Feb 1;8(2).
120. Andersson MI, Arancibia-Carcamo C V., Auckland K, Baillie JK, Barnes E, Beneke T, et al. SARS-CoV-2 RNA detected in blood products from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. *Wellcome Open Res*. 2020 Jul 29; 5:181.
121. Li Y, Schneider AM, Mehta A, Sade-Feldman M, Kays KR, Gentili M, et al. SARS-CoV-2 viremia is associated with distinct proteomic pathways and predicts COVID-19 outcomes. *Journal of Clinical Investigation*. 2021 Jul 1;131(13).
122. Belogiannis K, Florou VA, Fragkou PC, Ferous S, Chatzis L, Polyzou A, et al. SARS-CoV-2 antigenemia as a confounding factor in immunodiagnostic assays: A case study. *Viruses*. 2021 jun 1;13(6).

VIII. ANEXOS

VIII.1 Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral

Artículo I

Upper respiratory tract SARS-CoV-2 RNA loads in symptomatic and asymptomatic children and adults. Clinical Microbiology and Infection 2021 Dec;27(12): 1858.e1-1858.e7.

Rosa Costa (1), Felipe Bueno (1), Eliseo Albert (1), Ignacio Torres (1), Silvia Carbonell-Sahuquillo (2), Ana Barres-Fernández (2), David Sánchez (1), Carmelo Padrón (1), Javier Colomina (1), María Isabel Lázaro Carreño (2, 3), José Rafael Bretón-Martínez (2, 3), Cecilia Martínez-Costa (2, 3), David Navarro (1, 4)

1.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

2.-Departamento de Pediatría, Hospital Clínico Universitario, Valencia, España

3.-Departamento de Pediatría, Universidad de Valencia, Valencia, España

4.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

Contribución del aspirante:

Rosa Costa realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

13,3

Artículo II

Initial viral load and decay kinetics of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the upper respiratory tract of adults and children. Journal of Infection 2021 oct;83(4):496-522.

Rosa Costa (1), Felipe Bueno (1), Estela Giménez (1), Alma Bracho (2, 3), Eliseo Albert (1), Diego Carretero (1), Paula de Michelena (1), Cecilia Martínez-Costa (4), Fernando González-Candelas (2, 3), David Navarro (1, 5)

1.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

2.-CIBER en Epidemiología y Salud Pública, España, Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), CSIC-Universidad de Valencia, Valencia, España

3.-Unidad Mixta de Investigación "Infección y Salud Pública" FISABIO-Universidad de Valencia, Valencia, España

4.-Departamento de Pediatría, Universidad de Valencia, Valencia, España

5.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

Contribución del aspirante:

Rosa Costa realizó la mayor parte de los aspectos analíticos y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

38,2

Artículo III

RNA viral loads of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants in nasopharyngeal specimens at diagnosis stratified by age, clinical presentation and vaccination status. Journal of Infection 2022 Apr;84(4):579-613.

Rosa Costa (1), Beatriz Olea (1), María Alma Bracho (2, 3), Eliseo Albert (1), Paula de Michelena (1), Cecilia Martínez-Costa (4), González-Candelas (2, 3), David Navarro (1, 5)

1.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

2.-CIBER en Epidemiología y Salud Pública, España, Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), CSIC-Universidad de Valencia, Valencia, España

3.-Unidad Mixta de Investigación "Infección y Salud Pública" FISABIO-Universidad de Valencia, Valencia, España

4.-Departamento de Pediatría, Universidad de Valencia, Valencia, España

5.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

Contribución del aspirante:

Rosa Costa es realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

38,6

Artículo IV

Combined kinetic analysis of SARS-CoV-2 RNAemia, N antigenemia and virus specific antibodies in critically ill adult COVID-19 patients. Scientific Reports. 2022 May 18;12(1):8273.

Rosa Costa (1), Juan Alberola (2), Beatriz Olea (1), Roberto Gonzalbo-Rovira (2), Estela Giménez (1), Enric Cuevas-Ferrando (3), Ignacio Torres (1), Eliseo Albert (1), Nieves Carbonell (4), José Ferreres (4), Gloria Sánchez (3), Jesús Rodríguez-Díaz (2), María Luisa Blasco (4), David Navarro (1,2)

1.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

2.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

3.-Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria, Instituto de Agroquímica y Alimentos Tecnología, IATA-CSIC, Valencia, España.

4.-Unidad de Cuidados Intensivos Médicos, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

Contribución del aspirante:

Rosa Costa realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

4,99

Artículo V

Initial SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens is not associated with severity and midterm resolution of pneumonia in COVID-19 patients Journal of Infection. 2022 Dec;85(6):702-769.

Rosa Costa (1), Jaime Signes-Costa (2), Beatriz Olea (1), Julia Tarraso (2), Nieves Carbonell (3), María Luisa Blasco (3), David Navarro (4)

1.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

2.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

3.-Unidad de Cuidados Intensivos Médicos, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

4.-Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

Contribución del aspirante:

Rosa Costa realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

38,6

VIII.2 Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, realizo el presente escrito con el objetivo de informar que el doctorando, Rosa Costa, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, participó en los análisis estadísticos y revisó los textos definitivos.

Ni la doctoranda, Rosa Costa, ni ninguno de los coautores han utilizado ninguno de los artículos compendiados en esta tesis ni implícita ni explícitamente para la realización de otras tesis doctorales.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'D' followed by a horizontal line and a small vertical stroke.

David Navarro Ortega



Original article

Upper respiratory tract SARS-CoV-2 RNA loads in symptomatic and asymptomatic children and adults

Rosa Costa¹, Felipe Bueno¹, Eliseo Albert¹, Ignacio Torres¹, Silvia Carbonell-Sahuquillo², Ana Barrés-Fernández², David Sánchez¹, Carmelo Padrón¹, Javier Colomina¹, María Isabel Lázaro Carreño^{2,3}, José Rafael Bretón-Martínez^{2,3}, Cecilia Martínez-Costa^{2,3}, David Navarro^{1,4,*}

¹ Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

² Paediatric Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

³ Department of Paediatrics, University of Valencia, Valencia, Spain

⁴ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2021

Received in revised form

14 July 2021

Accepted 1 August 2021

Available online 9 August 2021

Editor: M. Cevik

Keywords:

Adults

Children

COVID-19

SARS-CoV-2 RNA

Upper respiratory tract

Viral load

ABSTRACT

Objectives: Studies comparing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA load in the upper respiratory tract (URT) between children and adults—who either presented with coronavirus disease 2019 (COVID-19) or were asymptomatic—have yielded inconsistent results. Here, we conducted a retrospective, single-centre study to address this issue.

Patients and methods: Included were 1184 consecutive subjects (256 children and 928 adults) testing positive for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal exudates (NPs); of these, 424 (121 children and 303 adults) had COVID-19 and 760 (135 children and 625 adults) were asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. SARS-CoV-2 RNA testing was carried out using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA). The AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Viracell SA, Granada, Spain) was used for estimating SARS-CoV-2 RNA loads (in copies/mL). SARS-CoV-2 RNA loads at the time of laboratory diagnosis (single specimen/patient) were used for comparison purposes.

Results: Median initial SARS-CoV-2 RNA load was lower ($p = 0.094$) in children ($6.98 \log_{10}$ copies/mL, range 3.0–11.7) than in adults ($7.14 \log_{10}$ copies/mL, range 2.2–13.4) with COVID-19. As for asymptomatic individuals, median SARS-CoV-2 RNA load was comparable ($p = 0.97$) in children ($6.20 \log_{10}$ copies/mL, range 1.8–11.6) and adults ($6.48 \log_{10}$ copies/mL, range 1.9–11.8). Children with COVID-19 symptoms displayed SARS-CoV-2 RNA loads ($6.98 \log_{10}$ copies/mL, range 3.0–11.7) comparable to those of their asymptomatic counterparts ($6.20 \log_{10}$ copies/mL, range 1.8–11.6) ($p = 0.61$). Meanwhile in adults, median SARS-CoV-2 RNA load was significantly higher in symptomatic ($7.14 \log_{10}$ copies/mL, range 2.2–13.4) than in asymptomatic subjects ($6.48 \log_{10}$ copies/mL, range 1.9–11.8) ($p < 0.001$). Overall, the observed URT SARS-CoV-2 RNA clearance rate was faster in children than in adults.

Conclusions: Based on viral load data at the time of diagnosis, our results suggest that SARS-CoV-2-infected children, with or without COVID-19, may display NP viral loads of comparable magnitude to those found in their adult counterparts. However, children may have shorter viral shedding than adults.

Rosa Costa, Clin Microbiol Infect 2021;27:1858.e1–1858.e7

© 2021 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

An increasing body of evidence suggests that children are less susceptible to infection by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and tend to develop milder forms of coronavirus disease 2019 (COVID-19) than adults [1]. Nevertheless,

* Corresponding author: David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010, Valencia, Spain.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

whether children—either symptomatic or asymptomatic—play a major role in community transmission of SARS-CoV-2 compared to adults remains unclear [1]. There is a consistent direct correlation between the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in the upper respiratory tract (URT) (probability of recovering live virus in cell culture) and contagiousness in both adults and children [2–5]. Supporting this assumption, transmission risk was recently shown to be strongly associated with initial SARS-CoV-2 RNA levels of index cases [6]. There is contradictory information on how SARS-CoV-2 RNA load in the URT compares between children and adults [7–11], whether the viral load in paediatric subjects differs across ages [9,10], and whether dissimilarities in the dynamics of SARS-CoV-2 shedding in the URT exist between symptomatic and asymptomatic children [12–14]. Elucidation of these questions is important in trying to establish the relative transmission risk between adults and children, although it should be kept in mind that, in addition to URT viral load, other factors—such as the ability to release aerosols, the nature of symptoms and social mixing patterns—may modulate contagiousness. Here, to gain further insight into these issues, we conducted a retrospective, single-centre study involving a substantial cohort of SARS-CoV-2-infected children and adults who were either asymptomatic or symptomatic, non-hospitalized cases.

Methods

Patients and specimens

A convenient sample was used consisting of 1184 consecutive subjects (256 children and 928 adults, 520 males and 664 females) testing positive for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal exudates (NPs) between June 2020 and January 2021. The subjects either presented with symptoms compatible with COVID-19, including one or more of the following: fever, dry cough, rhinorrhoea, dyspnoea, myalgia, fatigue, anosmia, ageusia, odynophagia, diarrhoea, conjunctivitis, and cephalgia (none requiring hospitalization) or they were asymptomatic close contacts of COVID-19 patients, as previously defined [15], at the time of RT-PCR testing. A total of 967 participants (154 children and 813 adults) were sampled at primary health centres belonging to the Health Department Clínico-Malvarrosa, Valencia (Spain), while 217 (102 children and 115 adults) were sampled at the Emergency Department of Hospital Clínico Universitario of Valencia. The current study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario INCLIVA (March 2020). The requirement to obtain informed consent was waived by the Ethics Committee.

SARS-CoV-2 RNA testing

NPs were collected by trained nurses at sampling sites and were placed in 3 mL of universal transport medium (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). RT-PCRs were carried out at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario within 24 h of specimen collection. The TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA), which targets SARS-CoV-2 ORF1ab, N and S genes, was used following RNA extraction carried out using the Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kits coupled with Thermo Scientific™ KingFisher Flex automated instrument. The AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Viracell SA, Granada, Spain) was used as the reference material for estimating SARS-CoV-2 RNA load (in copies/mL, taking RT-PCR CTs for the N gene) [16,17].

RT-PCR β -glucuronidase RNA testing

We amplified the β -glucuronidase (GUSB) housekeeping gene to assess specimen cellularity in selected specimens, following a previously published protocol [18]. In brief, RNA was extracted from the NP using the DSP virus Pathogen Minikit on the QiaSymphony Robot instruments (Qiagen, Valencia, CA), reverse-transcribed to complementary DNA, and subsequently amplified by using the HEQC one-step kit (Seqplexing, Valencia, Spain) in the LightCycler 480 Real-Time PCR System Version II (Roche Diagnostics, Pleasanton).

Statistical methods

Differences between medians across groups were compared in a pairwise fashion using the non-parametric Mann–Whitney U-test, given that SARS-CoV-2 RNA loads were non-normally distributed. Spearman's rank test was used to test the association between age and SARS-CoV-2 RNA load. Two-sided exact p-values were reported; $p < 0.05$ was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Study groups

Participants were paediatric individuals (≤ 18 years, $n = 256$, 21.6%) aged a median of 12 years (range 0–18 years), or adults (> 18 years, $n = 928$, 78.3%) aged a median of 37 years (range 19–93 years). A total of 424 subjects (121 children, 303 adults) presented with symptoms compatible with COVID-19. Specimen collection was carried out at a median of 2 days (range 0–10 days) and a median of 3 days (range 0–10 days) after the onset of symptoms in children and adults, respectively. A total of 760 participants (135 children and 625 adults) were close contacts of COVID-19 patients and asymptomatic at the time of testing positive by RT-PCR for the first time. No information was available on our database regarding whether these latter individuals were household or non-household contacts or whether or not they developed symptoms later on. NP specimen collection in contacts was prescribed at the discretion of either the physician in charge of the index case or local health authorities, and was performed at a median of 7 days (range 1–10 days) after diagnosis of the presumed index case, in both children and adults. Initial SARS-CoV-2 RNA loads were used throughout the current study for comparison purposes.

SARS-CoV-2 RNA load in paediatric and adult COVID-19 patients

We first compared initial SARS-CoV-2 RNA load in NP from symptomatic paediatric and adult patients. The data are shown in Fig. 1A. The range of SARS-CoV-2 RNA loads appeared comparable between children and adults. Median viral RNA load in children ($6.98 \log_{10}$ copies/mL) was lower than that in adults ($7.14 \log_{10}$ copies/mL), although the difference did not reach statistical significance ($p = 0.094$).

We next compared the initial SARS-CoV-2 RNA load in children and adults by time of NP sampling after symptom onset. SARS-CoV-2 RNA load peaks soon after or at the time of symptom onset, or less commonly at day 3–5 of illness (see Cevik et al. for a systematic review and meta-analysis [19]). We arbitrarily split each patient group into two subgroups (within 2 days/ ≥ 3 days after symptom onset). SARS-CoV-2 RNA load was significantly higher in NP specimens collected within 2 days after onset of symptoms than in those obtained later on, in both children (median $7.46 \log_{10}$ copies/mL versus $5.17 \log_{10}$ copies/mL, $p < 0.001$) and adults ($7.81 \log_{10}$

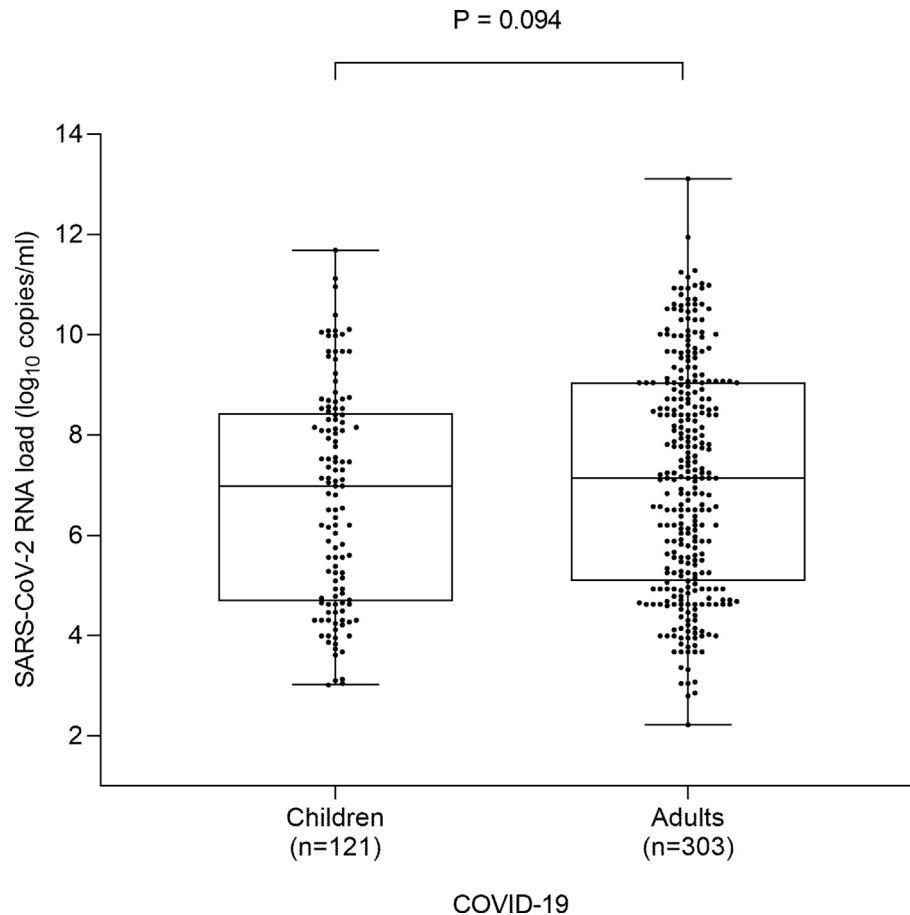


Fig. 1. Overall initial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens from children and adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19). Medians are indicated by midlines; the top and bottom edges of boxes represent the interquartile range (IQR). Whiskers indicate the upper and lower values. The number of patients in each group as well as p values for comparisons between groups (median SARS-CoV-2 RNA levels) are shown.

copies/mL versus 6.45 log₁₀ copies/mL, p 0.002) (Fig. 2). Interestingly, SARS-CoV-2 RNA load measured within 2 days after symptom onset was comparable (p 0.26) between children and adults, whereas those determined at later times (≥ 3 days) were significantly lower in children (p 0.002).

Finally, as shown in Fig. 3A and B, no correlation was found between initial SARS-CoV-2 RNA loads and patient age, for either children (ρ 0.008, p 0.93) or adults (ρ 0.005, p 0.92). Further results across age groups are shown in the [Supplementary Material](#).

SARS-CoV-2 RNA load in asymptomatic children and adults

A wide range of SARS-CoV-2 RNA loads were detected in asymptomatic children and adults (Fig. 4). SARS-CoV-2 RNA loads in asymptomatic children (median 6.20 log₁₀ copies/mL) and adults (6.48 log₁₀ copies/mL) were comparable in magnitude (p 0.97). Moreover, no correlation was found between age and SARS-CoV-2 load (ρ 0.066, p 0.44 for children and ρ 0.020, p 0.62 for adults) (Fig. 3C and D).

Comparison of URT SARS-CoV-2 RNA load in symptomatic versus asymptomatic children and adults

Children with COVID-19 symptoms displayed slightly higher SARS-CoV-2 RNA load than their asymptomatic counterparts (Fig. 5A), although statistical significance was not reached (p 0.61). In adults, median estimated SARS-CoV-2 RNA load was significantly

higher in symptomatic than asymptomatic subjects (p < 0.001) (Fig. 5B).

Inference of the percentage of children and adults presumably shedding infectious virions

We previously reported that SARS-CoV-2 could not be cultured from NP specimens returning $C_T > 25$ (<5.9 log₁₀ copies/mL) by the TaqPath COVID-19 RT-PCR [16]. We investigated the distribution of specimens yielding $C_T < 25$ across children and adults. The data are shown in [Supplementary Material Fig. S1](#). Overall, the percentage of NP specimens returning SARS-CoV-2 N RT-PCR C_T s below the abovementioned threshold was similar for symptomatic children and adults (p 0.28) and was also comparable between asymptomatic children and adults (p 0.87). Among children, that percentage was higher for those aged under 3 years, although the difference was not statistically significant (p 0.22). For most age groups the percentage was higher in symptomatic subjects than in asymptomatic ones, although these differences did not reach statistical significance (p > 0.5).

Assessment of the cellularity of NP specimens collected from pediatric and adult participants

To assess the quality of NP specimens collected from children and adults regarding cellularity, we randomly selected 30 samples from each population group (n = 60) that were matched in SARS-

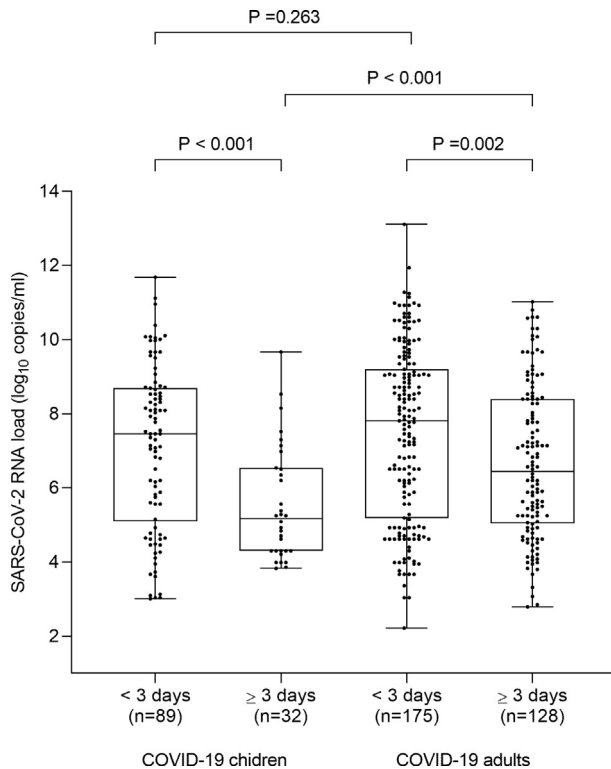


Fig. 2. Initial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens from children and adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19) according to the time of sampling after symptom onset. Medians are indicated by midlines; the top and bottom edges of boxes represent the interquartile range (IQR). Whiskers indicate the upper and lower values. The number of patients in each group as well as p values for comparisons between groups (median SARS-CoV-2 RNA levels) are shown.

CoV-2 RNA load (median 5.70 log₁₀ copies/mL, range 3.5–11.6 log₁₀ copies/mL in specimens from children; median 6.60 log₁₀ copies/mL, range 2.2–10.9 log₁₀ copies/mL in specimens from adults; *p* 0.99). These specimens were assayed with an in-house-designed RT-PCR amplifying the housekeeping GUSB gene. The C_T of NP samples obtained from children and adults did not differ significantly (median C_T 28.1, range 24.8–32.7, and median C_T 29.0, range 25.2–31.7, respectively, *p* 0.3), suggesting that SARS-CoV-2 RNA loads measured in the two population groups were not biased by differences in cellularity across NP specimens.

Discussion

Several major findings arose from the current study. First, overall there was no significant difference in URT SARS-CoV-2 RNA load at the time of presentation between COVID-19 paediatric and adult patients. Furthermore, the percentage of NP specimens potentially yielding infectious virions, as previously estimated [16], was similar across children and adults. Interestingly, a subanalysis categorizing patients by time to specimen collection from symptom onset revealed that SARS-CoV-2 RNA loads in children and adults were comparable at early times (within 2 days), when peak levels are likely to be reached [19], but were significantly lower in children after day 2, suggesting a faster URT SARS-CoV-2 RNA clearance rate in children. In accordance with our data, Baggio et al. [11] found similar estimated SARS-CoV-2 viral loads in children and adults sampled within the first 5 days after onset of symptoms. Likewise, Heald-Sargent et al. [9] found that preschool- and school-aged children sampled within 1 week after symptom onset display

SARS-CoV-2 RNA loads similar to those of their adult counterparts. In contrast, a slightly lower SARS-CoV-2 RNA load in children than in adults was reported in a German study [8]; however, information on symptom onset was not provided [8].

Consistent epidemiological evidence suggesting a less significant role of children as main drivers of SARS-CoV-2 spread in the community, as compared to adults, has been published [20–23]. Our data do not necessarily challenge this assumption, as onward transmission may not be associated only with the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in the URT [2–5,10,13], but also with the nature of symptoms (cough is less likely to develop in children compared to adults), lung capacity, and the ability to release aerosols—which seems to be lower in children than in adults, in particular in the absence of symptoms [24]—as well as differential social contacts and mixing patterns. In fact, a recent Danish study suggested a stronger correlation between age and transmission risk than between the C_T value and transmissibility [25]. Furthermore, our finding that SARS-CoV-2 clearance in the URT may proceed at a faster rate in children compared to adults gives further support to this argument.

Second, pairwise comparison analyses revealed no significant differences in SARS-CoV-2 RNA load across age groups, in either symptomatic children or adults; in children, a similar conclusion can be derived from the study by Kociolek and colleagues [12]. In contrast, age-related differences in SARS-CoV-2 RNA load have been reported previously in children [9,10]; specifically, young children (<5 years old) had significantly lower median SARS-CoV-2 RT-PCR C_T values than older children and adults. Differences in sampling times across these studies may account for the discrepancy.

Third, SARS-CoV-2 transmission to susceptible individuals from asymptomatic infected adults has been documented and postulated to facilitate virus dissemination in the community [26,27]. In fact, it has been estimated that at least 50% of new SARS CoV-2 infections may originate from exposure to individuals with infection but without symptoms (asymptomatic or pre-symptomatic) [28]. Yet, data from several studies, including two systematic reviews [29–32], clearly suggest that asymptomatic patients are responsible for fewer secondary infections than individuals with symptoms. Here, in contrast to data reported in previous studies [33,34], we observed higher viral loads in symptomatic than in asymptomatic adults; of note, a wide range of SARS-CoV-2 RNA loads were detected in both asymptomatic children and adults, likely reflecting the broad spectrum of NP collection times after exposure to the presumed index case which, it should be noted, was not dissimilar between children and adults (a median of 7 days, range 1–10 days after diagnosis of the presumed index case for both study groups). Our observation is compatible with the above epidemiological data, given the known link between the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in the URT and the level of contagiousness [2–5]. Regarding children, we found nevertheless rather comparable SARS-CoV-2 loads in symptomatic and asymptomatic individuals, although a subtle trend towards higher viral loads was seen in the former. Although speculative, dating of symptom onset could have been more inaccurate in children than in adults, resulting in delayed testing, well beyond the time at which SARS-CoV-2 RNA peak load may have been reached. Our data concur with those of Hurst et al. [35], but contradict those of Kociolek et al. [12] which clearly pointed to lower SARS-CoV-2 RNA loads in asymptomatic children than in those with mild to moderate COVID-19. In this regard, it must be stressed that in our study asymptomatic individuals were tested relatively soon after exposure (median 7 days), whereas in Kociolek's study the authors admit a potential population bias towards lower SARS-CoV-2 loads due to an excessive number of remote infections (>10 days) detected via screening programmes (i.e. hospital pre-admission).

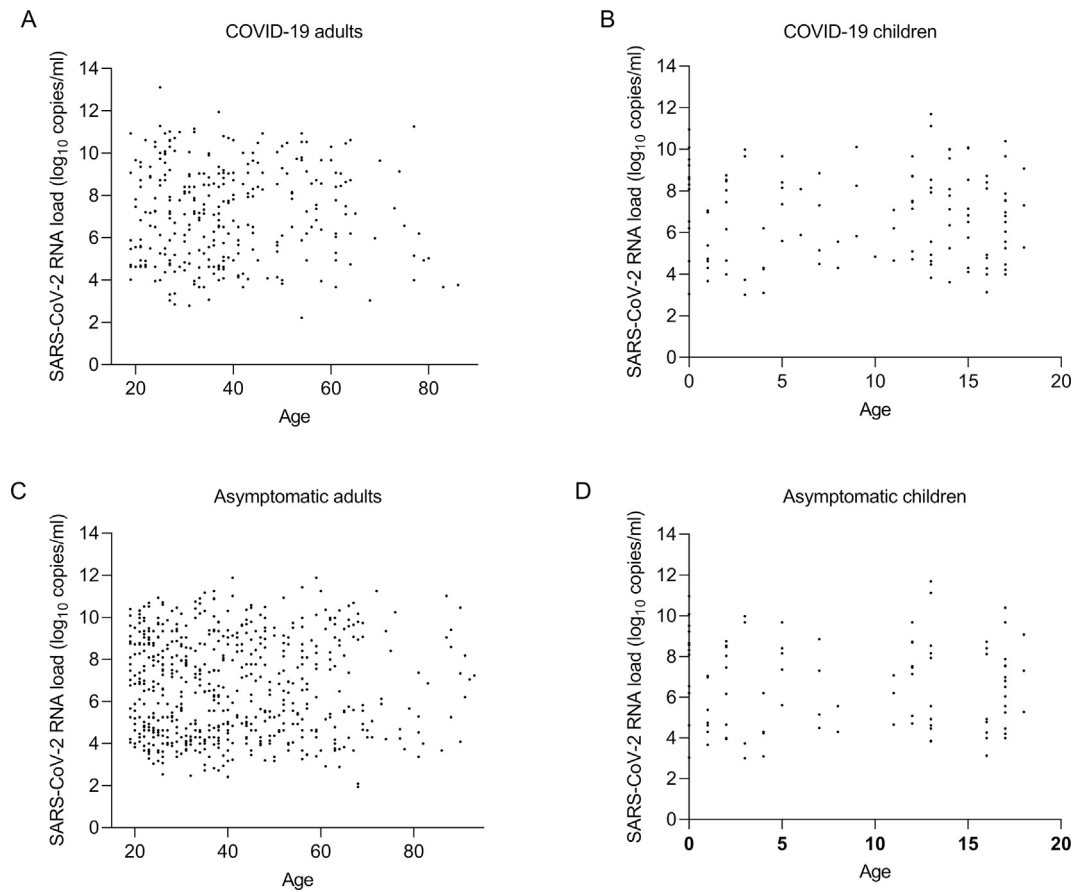


Fig. 3. Correlation between initial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA load in nasopharyngeal specimens from (A) adults and (B) children with coronavirus disease 2019 (COVID-19), and from (C) asymptomatic adults and (D) children and age of participants.

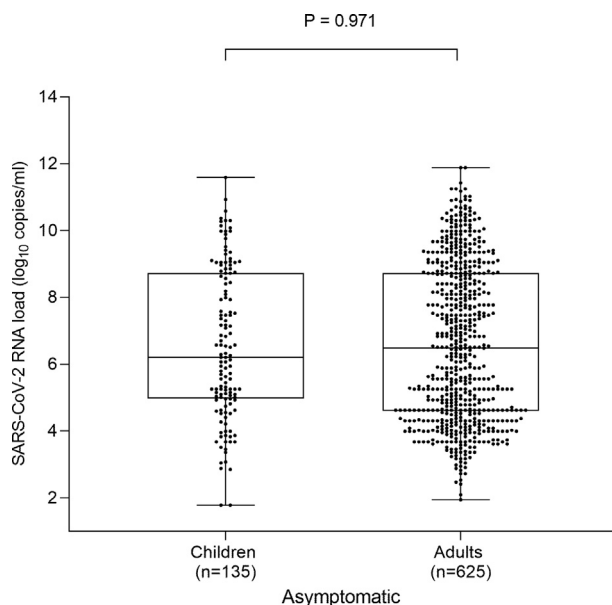


Fig. 4. Overall initial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens from asymptomatic children and adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19). Medians are indicated by midlines; the top and bottom edges of boxes represent the interquartile range (IQR). Whiskers indicate the upper and lower values. The number of patients in each group as well as p values for comparisons between groups (median SARS-CoV-2 RNA levels) are shown.

Like the majority of commercially available SARS-CoV-2 RT-PCRs, the RT-PCR assays used in the current study do not co-amplify a housekeeping gene, thus precluding assessment of sample cellularity. Given the widely varying quality of NP specimens [18], which impacts significantly on estimated SARS-CoV-2 RNA loads [36], we compared a randomly selected set of NP specimens from children and adults for their cellular content using a housekeeping-gene RT-PCR set in parallel. We found overlapping C_T s in samples from both subject groups, making it unlikely that differences in cellularity had a major impact on our results. However, only a small number of NP specimens was screened for their cellular content.

The current study has several limitations. First, dissimilarities in the timing of NP collection across symptomatic and asymptomatic individuals may have blurred true differences in SARS-CoV-2 RNA load across groups. While the kinetics of SARS-CoV-2 RNA load in URT has been clearly established in symptomatic individuals, with viral load peaking around the time of symptom onset [19], it remains to be precisely characterized in asymptomatic subjects. In fact, a population bias of this cohort towards higher viral loads in the asymptomatic population group in the current study cannot be ruled out. Second, participants were categorized as asymptomatic if they reported to be free of symptoms at the time of positive RT-PCR testing. We had no data as to their clinical outcome, that is, whether they were presymptomatic at the time of sampling or developed symptoms afterwards. Third, only initial SARS-CoV-2 loads were taken into consideration in the analyses, so that we could not have captured the true virus replication rate on an individual basis. Fourth, no attempt was made to subcategorize individuals according to their baseline medical condition.

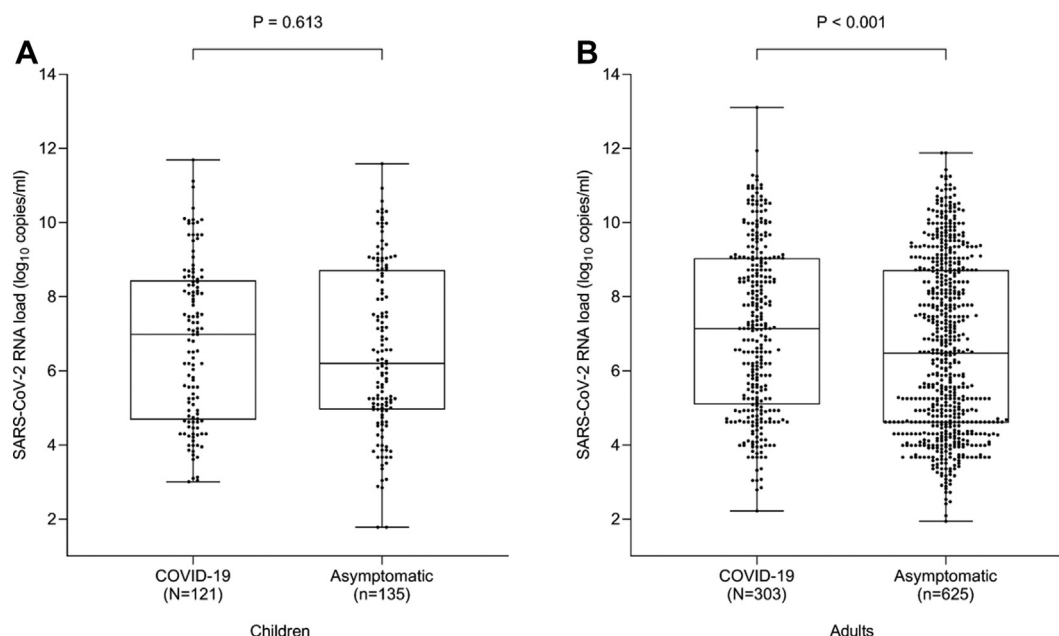


Fig. 5. Comparison of initial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens from (A) children and (B) adults either asymptomatic or presenting with coronavirus disease 2019 (COVID-19). Medians are indicated by midlines; the top and bottom edges of boxes represent the interquartile range (IQR). Whiskers indicate the upper and lower values. The number of patients in each group as well as p values for comparisons between groups (median SARS-CoV-2 RNA levels) are shown.

Conclusion

In summary, URT SARS-CoV-2 RNA loads in non-hospitalized COVID-19 or asymptomatic COVID-19 children of all ages were not significantly different from viral loads seen in adults; however, URT SARS-CoV-2 shedding may be shorter in children than in adults. Nevertheless, it is important to note that onward transmission is not only associated with the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in the URT.

Author contributions

RC, FB, EA, IT, DS, CP and JC: methodology and data collection. RC, FB: formal analysis. RC, FB, CM-C and DN: conceptualization and validation of data. SC-S, AB-F, MILC, JRB-M and CM-C were physicians in charge of children. DN: writing the original draft. All authors reviewed and approved the final draft.

Transparency declaration

The authors declare no conflicts of interest. This work received no public or private funds. EA holds a Juan Rodés research contract (JR18/00053) from the ISCIII (Carlos III Health Institute, *Instituto de Salud Carlos III* in the original Spanish). IT holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM18/00221).

Acknowledgments

We thank all personnel working at Health Department Clínico-Malvarrosa for their unwavering commitment in the fight against COVID-19.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.08.001>.

References

- [1] Viner RM, Mytton OT, Bonell C, Melendez-Torres GJ, Ward J, Hudson L, et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 infection among children and adolescents compared with adults: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr* 2021;175:143–56.
- [2] Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020;581:465–9.
- [3] Huang CG, Lee KM, Hsiao MJ, Yang SL, Huang PN, Gong YN. Culture-based virus isolation to evaluate potential infectivity of clinical specimens tested for COVID-19. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01068–20.
- [4] Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020:ciaa638.
- [5] L'Huillier AG, Torriani G, Pigny F, Kaiser L, Eckerle I. Culture-competent SARS-CoV-2 in nasopharynx of symptomatic neonates, children, and adolescents. *Emerg Infect Dis* 2020;26:26.
- [6] Marks M, Millat-Martinez P, Ouchi D, Roberts CH, Alemany A, Corbacho-Monné M, et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021;21:629–36.
- [7] Colson P, Tissot-Dupont H, Morand A, Boschi C, Ninove L, Esteves-Vieira V, et al. Children account for a small proportion of diagnoses of SARS-CoV-2 infection and do not exhibit greater viral loads than adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020;39:1983–7.
- [8] Jones TC, Mühlemann B, Veith T, Biele G, Zuchowski M, Hoffmann J, et al. An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age. *medRxiv* 2020;2020:20125484. 06.08.20125484.
- [9] Heald-Sargent T, Muller WJ, Zheng X, Rippe J, Patel AB, Kocielek LK. Age-related differences in nasopharyngeal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) levels in patients with mild to moderate coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Pediatr* 2020;174:902.
- [10] L'Huillier AG, Baggio S, Eckerle I. Viral loads of SARS-CoV-2 in young children. *JAMA Pediatr* 2021;175:529–30.
- [11] Baggio S, L'Huillier AG, Yerly S, Bellon M, Wagner N, Rohr M. SARS-CoV-2 viral load in the upper respiratory tract of children and adults with early acute COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020:ciaa1157.
- [12] Kocielek LK, Muller WJ, Yee R, Dien Bard J, Brown CA, Revell PA, et al. Comparison of upper respiratory viral load distributions in asymptomatic and

- symptomatic children diagnosed with SARS-CoV-2 infection in pediatric hospital testing programs. *J Clin Microbiol* 2020;59:e02593-20.
- [13] Han MS, Choi EH, Chang SH, Jin BL, Lee EJ, Kim BN, et al. Clinical characteristics and viral RNA detection in children with coronavirus disease 2019 in the Republic of Korea. *JAMA Pediatr* 2021;175:73–80.
 - [14] Kam KQ, Thoon KC, Maiwald M, Chong CY, Soong HY, Loo LH, et al. SARS-CoV-2 viral RNA load dynamics in the nasopharynx of infected children. *Epidemiol Infect* 2021;149:e18A.
 - [15] Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19. November 11 2020. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Estrategia_vigilancia_y_control_e_indicadores.pdf.
 - [16] Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect* 2021;27: 472.e7–472.
 - [17] Torres I, Poujois S, Albert E, Colomina J, Navarro D. Evaluation of a rapid antigen test (Panbio COVID-19 Ag rapid test device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect* 2021;S1198-743X:30782–5.
 - [18] Albert E, Ferrer B, Torres I, Serrano A, Alcaraz MJ, Buesa J, et al. Amplification of human beta-glucuronidase gene for appraising the accuracy of negative SARS-CoV-2 RT-PCR results in upper respiratory tract specimens. *J Med Virol* 2021;93:48–50.
 - [19] Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2021;2:e13–22.
 - [20] Bi Q, Wu Y, Mei S, Ye C, Zou X, Zhang Z, et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:911–9.
 - [21] Kelvin AA, Halperin S. COVID-19 in children: the link in the transmission chain. *Lancet Infect Dis* 2020;20:633–4.
 - [22] Jordan I, de Sevilla MF, Fumado V, Bassat Q, Bonet-Carne E, Fortuny C, et al. Transmission of SARS-CoV-2 infection among children in summer schools applying stringent control measures in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* 2021: ciab227.
 - [23] Munro APS, Faust SN. Children are not COVID-19 super spreaders: time to go back to school. *Arch Dis Child* 2020;105:618–9.
 - [24] Riediker M, Morawska L. Low exhaled droplet formation may explain why children are poor SARS-CoV-2 transmitters. *Aerosol Air Qual Res* 2020;20: 1513–5.
 - [25] Lyngse FP, Mølbak K, Frank KT, Nielsen C, Skov RL, Kirkeby VC. Association between SARS-CoV-2 transmission risk, viral load, and age: a nationwide study in Danish households. *medRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.02.28.21252608>.
 - [26] Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 2020;382: 1177–9.
 - [27] Huff HV, Singh A. Asymptomatic transmission during the COVID-19 pandemic and implications for public health strategies. *Clin Infect Dis* 2020:ciaa654.
 - [28] Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA Netw Open* 2021;4:e2035057.
 - [29] Qiu X, Nergiz AI, Maraolo AE, Bogoch II, Low N, Cevik M. The role of asymptomatic and pre-symptomatic infection in SARS-CoV-2 transmission—a living systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2021;27:511–9.
 - [30] Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2020;17:e1003346.
 - [31] Li F, Li YY, Liu MJ, Fang LQ, Dean NE, Wong GWK, et al. Household transmission of SARS-CoV-2 and risk factors for susceptibility and infectivity in Wuhan: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2021;21: 617–28.
 - [32] Wu P, Liu F, Chang Z, Lin Y, Ren M, Zheng C, et al. Assessing asymptomatic, pre-symptomatic and symptomatic transmission risk of SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis* 2021:ciab271.
 - [33] Lee S, Kim T, Lee E, Lee C, Kim H, Rhee H, et al. Clinical course and molecular viral shedding among asymptomatic and symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection in a community treatment center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med* 2020;180:1–6.
 - [34] Ra SH, Lim JS, Kim GU, Kim MJ, Jung J, Kim SH. Upper respiratory viral load in asymptomatic individuals and mildly symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection. *Thorax* 2021;76:61–3.
 - [35] Hurst JH, Heston SM, Chambers HN, Cunningham HM, Price MJ, Suarez L, et al. SARS-CoV-2 infections among children in the biospecimens from respiratory virus-exposed kids (BRAVE kids) study. *Clin Infect Dis* 2020: ciab1693.
 - [36] Albert E, Bracho MA, Serrano A, Ferrer B, González-Candelas F, Navarro D. Assessing the potential association between SARS-CoV-2 RNA load in the respiratory tract and COVID-19 mortality. *J Med Virol* 2021;93:1862–4.

References

- [1]. Ripa M., Galli L., Poli A., et al. Secondary infections in patients hospitalized with COVID-19: incidence and predictive factors. *Clin Microbiol Infect* 2021;**27**:451–7.
- [2]. Ong D.S.Y., Spitoni C., Klein Klouwenberg P.M.C., et al. Cytomegalovirus reactivation and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2016;**42**:333–41.
- [3]. Ljungman P., Boeckh M., Hirsch H.H., et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis* 2017;**64**:87–91.
- [4]. Al-Omari A., Aljamaan F., Alhazzani W., et al. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. *Ann Intensive Care* 2016;**6**:110.
- [5]. Gardiner B.J., Nierenberg N.E., Chow J.K., et al. Absolute lymphocyte count: a predictor of recurrent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2018;**67**:1395–402.
- [6]. Adachi Y., Shiroyama T., Yamaguchi Y., et al. Predicting recurrence of respiratory failure in critically ill patients with COVID-19: a preliminary study. *J Infect* 2021;**82**:e33–5.
- [7]. van Paassen J., Vos J.S., Hoekstra E.M., et al. Corticosteroid use in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis on clinical outcomes. *Crit Care* 2020;**24**:696.
- [8]. Moss P. The ancient and the new: is there an interaction between cytomegalovirus and SARS-CoV-2 infection? *Immun Ageing* 2020;**17**:14.
- [9]. Söderberg-Nauclér C. Does reactivation of cytomegalovirus contribute to severe COVID-19 disease? *Immun Ageing* 2021;**18**:12.
- [10]. Poole E., Juss J.K., Krishna B., et al. Alveolar macrophages isolated directly from human cytomegalovirus (HCMV)-seropositive individuals are sites of HCMV reactivation in vivo. *J Infect Dis* 2015;**211**:1936–42.
- [11]. Le Balch P., Pinceaux K., Pronier C., et al. Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit Care* 2020;**24**:530.

Takayuki Niitsu, Takayuki Shiroyama, Haruhiko Hirata,
Yoshimi Noda, Yuichi Adachi, Takatoshi Enomoto, Reina Hara,
Saori Amiya

Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology,
Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka,
Osaka, Suita City 565-087, Japan

Akinori Uchiyama
Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Graduate
School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Yoshito Takeda, Atsushi Kumanogoh
Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology,
Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka,
Osaka, Suita City 565-087, Japan

*Corresponding author.

E-mail address: shiroyamat@imed3.med.osaka-u.ac.jp (T. Shiroyama)

Accepted 6 July 2021
Available online 9 July 2021

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.07.004>

© 2021 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Initial viral load and decay kinetics of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the upper respiratory tract of adults and children



Dear Editor,

We read with interest the systematic review published by Walsh et al. in the Journal of Infection,¹ focusing on the dynamics of SARS-CoV-2 RNA at the upper respiratory tract (URT). In

this context, a novel SARS-CoV-2 variant lineage (B.1.1.7), first detected in the UK at the end of 2020 has transmission advantage over other lineages.² Increased transmissibility of the B.1.1.7 variant has been linked to enhanced ACE2 affinity³ allegedly resulting in higher viral loads in URT, an observation that has been reported in some,^{3–6} but not all⁷ large series published to date. In addition, longer duration of SARS-CoV-2 RNA shedding in URT has been reported in individuals infected by the B.1.1.7 variant as compared to controls;⁸ if proven, this may have important implications regarding isolation policies. The current retrospective, observational study was undertaken to gain further insight into the above issues. It included a convenience sample of 990 individuals (799 aged >18 years; 507 females) testing positive for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal specimens (NP) by the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) between June 2020 and April 2021. The study was approved by INCLIVA Research Ethics Committee. A total of 338 subjects (median age, 38 years; range, 1–93 years) were infected by the SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 (179 had COVID-19-Supplementary Table 1). The study included a control group of 652 individuals, 339 presenting with COVID-19 (median age, 40.6 years; range, 0–95 years) infected by other variants, of which 390 were characterized by whole-genome sequencing (Supplementary Table 2). Individuals belonging to the control group were matched with the B.1.1.7 group for sex and age. Among patients with COVID-19, the time from symptoms on-set to RT-PCR testing was 5 days (range, 1–10 days) in the B.1.1.7 group and 4 days (range, 1–10 days) in the control group, with no differences between children and adults. As for asymptomatic individuals (140 infected by the B.1.1.7 variant), RT-PCR testing was performed within the first 10 days since diagnosis (for household) or contact with (for non-household) the index case in individuals from both groups. A total of 1152 NP specimens (median 1 specimen/patient; range, 1–3) were included in the analyses described below.

We found that SARS-CoV-2 B.1.1.7-infected individuals displayed initial NP viral loads around 1 log₁₀ higher than controls (median, 7.6 log₁₀ copies/ml; range, 3.3–12.1 vs. 6.8 log₁₀ copies/ml; range, 2.4–13.1; $P < 0.001$), a figure that concurs remarkably with that observed by Jones et al.,⁴ and overall support previous observations^{3–6} reported in studies involving large cohorts, that were nevertheless poorly defined regarding subject age, individual clinical condition at diagnosis, timing of URT specimen collection or all of the above. A subanalysis including only SARS-CoV-2 B.1.1.7-infected individuals as confirmed by whole-genome sequencing ($n = 108$) yielded comparable results ($P < 0.001$) (not shown). A novel observation was that the difference in viral load between B.1.1.7 and non-B.1.1.7 infected individuals remained significant ($P < 0.001$) for adults (Fig. 1B), but not for children ($P = 0.41$) (Fig. 1C). When symptomatic patients infected by either the B.1.1.7 or other variants were analyzed separately, initial viral loads were also higher ($P = 0.04$) for adults (Fig. 1D), but again not ($P = 0.16$) for children (Fig. 1E), although a trend towards higher viral loads was noticeable in B.1.1.7 infected subjects. We hypothesize that a more robust early innate immune response to SARS-CoV-2 in children as compared to adults may minimize the apparent replicative advantage of the B.1.1.7 variant over other less transmissible ones.⁹ Likewise, Asymptomatic adults infected by the B.1.1.7 variant had higher initial SARS-CoV-2 RNA loads ($P = 0.02$) than controls (Fig. 1F).

It is of interest that SARS-CoV-2 RNA loads measured in the comparison groups were unlikely to be biased by differences in cellularity across NP specimens, as determined by amplification of the β -glucuronidase housekeeping gene by RT-PCR¹⁰ in 50 randomly selected participants (24 infected by the B.1.1.7 variant and 26 from controls). In fact, median C_T was similar ($P = 0.43$) between NP samples in both groups (not shown).

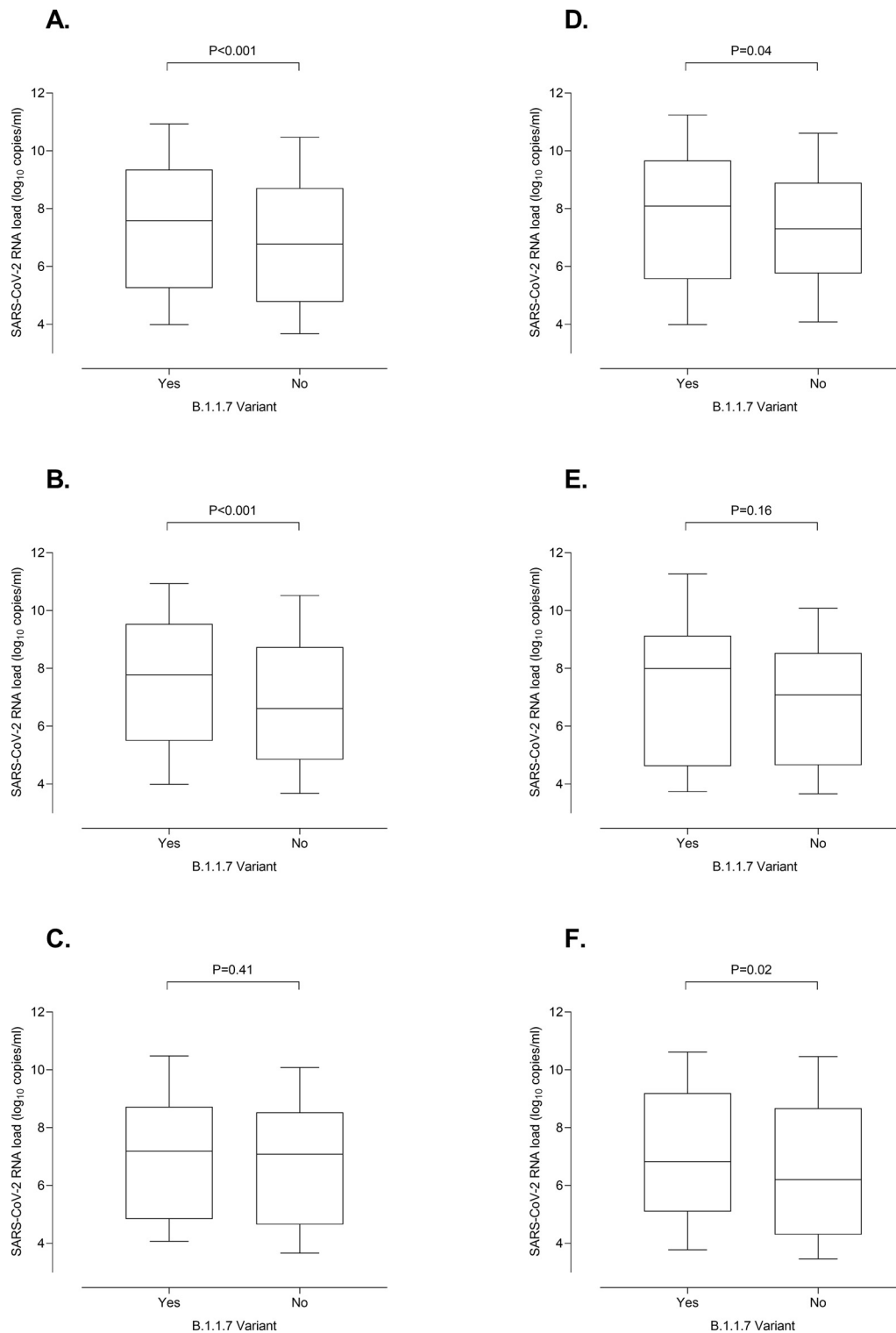


Fig. 1. Whisker plots depicting initial SARS-CoV-2 RNA loads in nasopharyngeal specimens from individuals infected by either the B.1.1.7 variant or other variants. Participants were sampled at either primary care centers affiliated to the Clínico-Malvarrosa Health Department, which attends 350,000 inhabitants in Northwest Valencia (Spain), or at its tertiary reference hospital (Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain-HCU-). NP were collected by trained nurses, placed in 3 ml of Universal Transport Medium (UTM, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and delivered to the Microbiology Service of HCU for testing. Specimens were analyzed by RT-PCR within 24 h of receipt. We used the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA), which targets SARS-CoV-2 ORF1ab, N and S genes, following RNA extraction carried out by using the Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kits coupled with Thermo Scientific™ KingFisher Flex automated instrument. The AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Viracell SA, Granada, Spain) was used as the reference material for estimating SARS-CoV-2 RNA load (in copies/mL, taking RT-PCR C_T for the N gene). The B.1.1.7 lineage was confirmed by whole-genome sequencing in 108 cases, whereas in the remaining 230 it was inferred by S-gene target failure (SGTF) in the RT-PCR as within the timeframe of specimen collection (mid-February–April 2021) more than 95% of SGTFs detected in the Clínico-Malvarrosa Health Department belonged to that lineage (not shown). Control individuals were sampled before the SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant was first detected in our Health Department in early January 2021. Moreover, the SARS-CoV-2 RNA S-gene was detected in NP from all these participants. The data are depicted for all participants (A); adults (B), children (≤ 18 years old) (C); adults with COVID-19 (D); children with COVID-19 (E) and asymptomatic adults (F). The absence of non-B.1.1.7-infected asymptomatic children in the cohort precluded meaningful comparison of viral loads between these individuals and those infected by other variants. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney *U* test. The Chi-squared test was used for frequency comparisons. Two-sided *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the SPSS v.25 program. *P* values for comparisons across groups are shown.

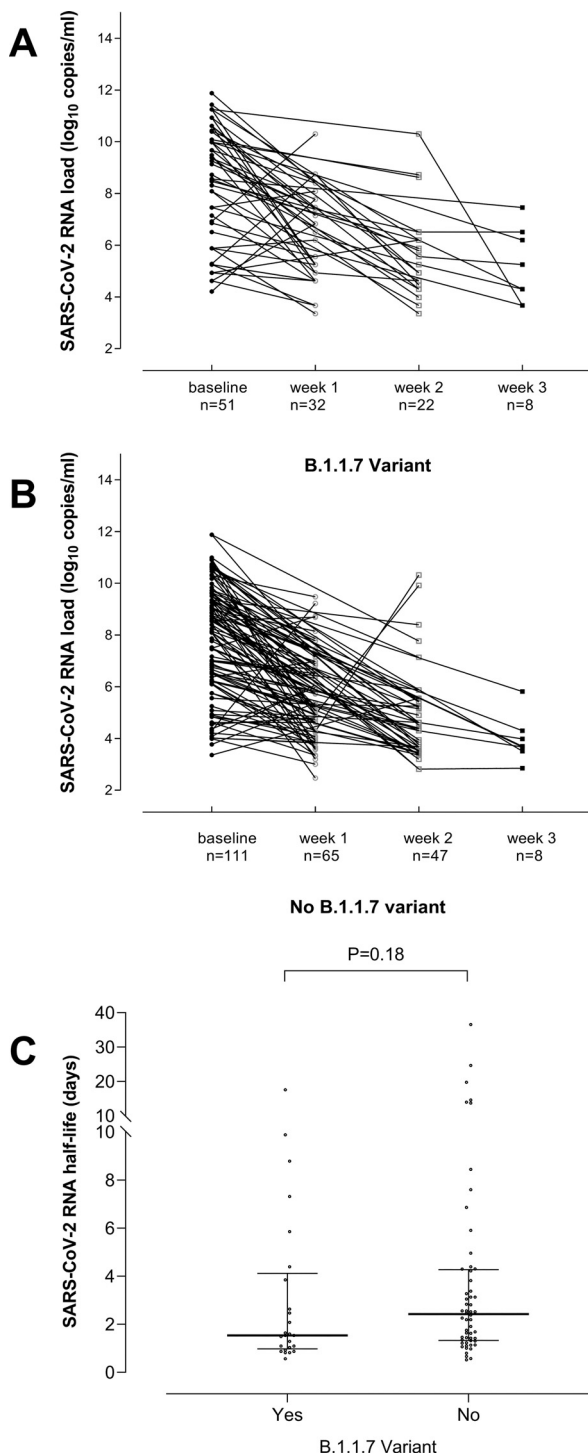


Fig. 2. Kinetics of SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens from individuals either infected by the B.1.1.7 variant (A) or by other variants (B) through week 3 after diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Trajectories of SARS-CoV-2 RNA load in URT were classified as rising or decreasing, as the variation in the viral load between consecutive specimens was $>$ or <0.5 log₁₀ copies/ml (upper limit of intra-assay log₁₀ variation), respectively. SARS-CoV-2 RNA half-life in the upper respiratory tract from individuals either infected by the B.1.1.7 variant or by other variants (C). The kinetics of SARS-CoV-2 RNA clearance followed a logarithmic decay curve in most individuals, expressed by the equation $y_t = y_0 e^{-kt}$, where y_0 is the initial SARS-CoV-2 RNA load, t is time of follow-up specimen sampling since diagnosis (initial RT-PCR result) and k is the decay constant. SARS-CoV-2 RNA load half-life was then calculated using the equation $\ln 2/k$. SARS-CoV-2 RNA half-life in URT was calculated only for individuals (25 infected by the B.1.1.7 variant and 56 controls) that met two criteria: (i) displaying a descending trajectory throughout the study period (three weeks); (ii) the follow-up specimen used for calculations was collected within 4–10 days after the initial one. P value for comparisons across groups is shown.

A total of 162 participants (51 infected by the B.1.1.7 variant and 111 controls), had 2 or more follow-up NP specimens collected within 3 weeks after diagnosis of SARS-CoV-2 infection. As shown in Fig. 2, decreasing viral loads were observed in most participants, regardless of whether they were infected with the B.1.1.7 variant (2A) or not (2B). SARS-CoV-2 RNA half-life in URT could be calculated for 25 individuals infected by the B.1.1.7 variant and 56 controls. Most individuals in both comparison groups were adults and were matched ($P > 0.5$) by sex, the presence or absence of symptoms, hospitalization (Supplementary Table 3) and age (median, 38 years in both groups). As shown in Fig. 2C, SARS-CoV-2 RNA load half-life was similar ($P = 0.18$) among groups (B.1.1.7 infected: median 1.54 days; range, 0.5–17 days; controls: 2.42 days; range, 0.27–36 days). In contrast to our findings, Calistri et al.⁸ reported longer persistence of SARS-CoV-2 RNA in NP specimens in individuals infected with the B.1.1.7 variant (median 16 days) compared to controls (median 14 days). Nevertheless, the major drawbacks of that study were the lack of information on clinical status of participants and the absence of sequential specimens collected on an individual basis.

The current study has several limitations, most notably its retrospective design, the lack of follow-up specimens from many participants, the low numbers of children with B.1.1.7 symptomatic infection and with non-B.1.1.7 asymptomatic infection and the lack of precise information on the timing of specimen collection in asymptomatic subjects following contact with the index case. Furthermore, the number of individuals from whom viral load half-life could be calculated was limited.

In summary, our data support that initial SARS-CoV-2 load is higher in B.1.1.7-infected adult individuals than in those infected by other variants, regardless of presence or absence of symptoms, but not in symptomatic children. Nevertheless, the data did not suggest an extended duration of SARS-CoV-2 RNA shedding in the URT in individuals infected with the B.1.1.7 variant.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to all personnel working in the Clínico-Malvarrosa Health Department and at Clinic University Hospital, in particular those at the Microbiology laboratory, for their commitment in the fight against COVID-19. Eliseo Albert holds a Juan Rodés Contract (JR20/00011) from the Health Institute Carlos III. Estela Giménez holds a Juan Rodés Contract (JR18/00053) from the Health Institute Carlos III.

Financial support

This work received no public or private funds.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jinf.2021.08.015](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.015).

References

- Walsh K.A., Jordan K., Clyne B., Rohde D., Drummond L., Byrne P., et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J Infect* 2020;81:357–71.
- Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 2021;372:eabg3055.
- Ramanathan M., Ferguson I.D., Miao W., Khavari P.A., SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *Lancet Infect Dis* 2021;S1473-3099(21):00262–3.

4. Jones T.C., Biele G., Mühlemann B., Veith T., Schneider J., Beheim-Schwarzbach J., et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science* 2021:eabi5273.
5. Kidd M., Richter A., Best A., Cumley N., Mirza J., Percival B., et al. S-variant SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 is associated with significantly higher viral load in samples tested by TaqPath polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2021;223:1666–70.
6. Ratcliff J., Nguyen D., Fish M., Rynne J., Jennings A., Williams S., et al. Virological and serological characterization of critically ill patients with COVID-19 in the UK: interactions of viral load, antibody status and B.1.1.7 variant infection. *J Infect Dis* 2021;jiab283. doi:10.1093/infdis/jiab283.
7. S.A. Walker, K.D. Vihta, O. Gethings, E. Pritchard, J. Jones, T. House, et al. Increased infections, but not viral burden, with a new SARS-CoV-2 variant. medRxiv 2021.01.13.21249721; 10.1101/2021.01.13.21249721.
8. Calistri P., Amato L., Puglia I., Cito F., Di Giuseppe A., Danzetta M.L., et al. Infection sustained by lineage B.1.1.7 of SARS-CoV-2 is characterised by longer persistence and higher viral RNA loads in nasopharyngeal swabs. *Int J Infect Dis* 2021;105:753–5.
9. Tosif S., Neeland M.R., Sutton P., Licciardi P.V., Sarkar S., Selva K.J., et al. Immune responses to SARS-CoV-2 in three children of parents with symptomatic COVID-19. *Nat Commun* 2020;11:5703.
10. Albert E., Ferrer B., Torres I., Serrano A., Alcaraz M.J., Buesa J., et al. Amplification of human β -glucuronidase gene for appraising the accuracy of negative SARS-CoV-2 RT-PCR results in upper respiratory tract specimens. *J Med Virol* 2021;93:48–50.

Rosa Costa, Felipe Bueno, Estela Giménez
Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Av. Blasco Ibáñez, 17, Valencia 46010, Spain

Alma Bracho
CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain
Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University
of Valencia, Valencia, Spain
Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University
of Valencia, Valencia, Spain

Eliseo Albert, Diego Carretero, Paula de Michelena
Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Av. Blasco Ibáñez, 17, Valencia 46010, Spain

Cecilia Martínez-Costa
Pediatrics Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain.
Department of Pediatrics, University of Valencia, Valencia, Spain

Fernando González-Candelas
CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain
Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University
of Valencia, Valencia, Spain
Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University
of Valencia, Valencia, Spain

David Navarro*
Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Av. Blasco Ibáñez, 17, Valencia 46010, Spain
Department of Microbiology, School of Medicine, University of
Valencia, Valencia, Spain

*Corresponding author at: Microbiology Service, Clinic University
Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Av. Blasco Ibáñez,
17, Valencia 46010, Spain.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro)

Accepted 7 August 2021
Available online 11 August 2021

Evidence of the reduction of acute circulating communicable viruses during the SARS-CoV-2 pandemic in London



Dear Editor,

We read with interest the report by Poole and colleagues who found a sharp reduction in non-SARS-CoV2 respiratory virus infection during the COVID-19 pandemic.¹ To confirm these findings in children as well as adults, and to investigate the effect of the COVID-19 pandemic on gastrointestinal and varicella zoster virus infections, we undertook a review covering two, large hospitals in London: The Royal Free Hospital (RFH; a large teaching hospital in north London) and Great Ormond Street Hospital (GOSH; a specialist hospital for children in central London). We used a retrospective observational design and included all 'first positive' reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) test results between April 2019 and March 2021 for respiratory viruses (influenza A and B and respiratory syncytial virus (RSV) at RFH and GOSH, with parainfluenza, enterovirus and adenovirus also included from GOSH) and gastrointestinal viruses (norovirus at both RFH and GOSH, with other enteric viruses included at RFH (sapovirus, rotavirus, adenovirus and astrovirus), and varicella zoster virus results from RFH.

Comparing pre-pandemic (April 2019–March 2020) with pandemic periods (April 2020–March 2021) there was an 87.5% reduction in positive tests for gastrointestinal viruses at RFH and GOSH (585 vs. 73; Fig. 1) and a 62.2% reduction in paediatric respiratory viruses at GOSH (2381 vs. 899; Fig. 2). We observed 53.8% reduction in varicella at RFH (65 vs. 30), with the mean monthly number of cases being 5.4 pre-pandemic and 2.7 during the pandemic. There was also a 98.8% reduction in respiratory viruses at RFH (969 vs. 12), however due to the pandemic, demand management of all RT-PCR tests was implemented from October 2020, limiting direct comparisons.

Further analysis is needed to infer causality however the markedly shorter and less severe flu influenza epidemic and rapid decline in respiratory viruses coincide with the introduction of the wide range of non-pharmaceutical public health interventions (NPI) such as: movement restrictions, social distancing, face coverings and increased personal hygiene.² It's also possible that the introduction of restrictions including the reduction in global travel may have a part to play. There is also the question of viral interference during a pandemic. However, the evidence we present here suggests the COVID-19 pandemic has had a profound effect on circulating varicella, gastrointestinal, respiratory viruses in the populations covered by two large hospitals in London.

These findings support the growing evidence base covering a range of localities around the world. Data from the WHO Global Influenza Surveillance and Response system shows that across countries in the Southern Hemisphere there has been little Influenza activity since mid-April 2020, despite increased testing in some countries.³ In the UK, Public Health England (PHE) have also reported that circulating seasonal respiratory viruses, other than SARS-CoV-2 was similar overall compared to levels reported in recent years with lower levels of Respiratory Syncytial Virus (RSV) seen than in previous seasons in England.⁴ A significant reduction in RSV cases have also been shown in Australia.⁵ In one area of the UK, rhinovirus detection in adults admitted to hospital was significantly lower in summer 2020 compared to 2019, however this increased once schools reopened in September 2020.⁶

There is also evidence of reduced circulation of enteric viruses. PHE has reported an 89% reduction in reported cases of norovirus and rotavirus during the seasons affected by the pandemic, when compared to the average of 2015–2020 seasons.⁷ A German study has shown an almost complete reduction in positive norovirus

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.015>

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

We express our sincere gratitude to the members of Department of Intensive Care Medicine of The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (Dr. Fang Xu and Dr. Shihui Lin) for their outstanding technical assistance.

References

- Li H., Xiang X., Ren H., Xu L., Zhao L., Chen X., et al. Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. *J Infect* 2020;**80**(6):646–55.
- Chow E.J., Doyle J.D., Uyeki T.M. Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment. *Crit Care* 2019;**23**(1):214.
- Orkin A.M., Gill P.J., Ghersi D., Campbell L., Sugarmann J., Emsley R., et al. Guidelines for reporting trial protocols and completed trials modified due to the COVID-19 pandemic and other extenuating circumstances: the CONSERVE 2021 statement. *JAMA* 2021;**326**(3):257–65.
- Gao X., Yan X., Yin Y., Lin X., Zhang Q., Xia Y., et al. Therapeutic targeting of apoptosis inhibitor of macrophage/CD5L in sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019;**60**(3):323–34.
- Gao X., Yan X., Zhang Q., Yin Y., Cao J. CD5L contributes to the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Int Immunopharmacol* 2019;**72**:40–7.
- Gao X., Liu Y., Xu F., Lin S., Song Z., Duan J., et al. Assessment of apoptosis inhibitor of macrophage/CD5L as a biomarker to predict mortality in the critically ill with sepsis. *Chest* 2019;**156**(4):696–705.
- Self W.H., Balk R.A., Grijalva C.G., Williams D.J., Zhu Y., Anderson E.J., et al. Procalcitonin as a marker of etiology in adults hospitalized with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2017;**65**(2):183–90.
- Niederman M.S., Baron R.M., Bouadma L., Calandra T., Daneman N., DeWaele J., et al. Initial antimicrobial management of sepsis. *Crit Care* 2021;**25**(1):307.
- Gautam S., Cohen A.J., Stahl Y., Valda Toro P., Young G.M., Datta R., et al. Severe respiratory viral infection induces procalcitonin in the absence of bacterial pneumonia. *Thorax* 2020;**75**(11):974–81.

Xiaofei Lai¹

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China

Jing Wang¹

Department of Laboratory Medicine, Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing, China

Jun Duan

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China

Yi Gong

Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China

Ju Cao*

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China

*Corresponding author at: Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, No. 1 Youyi Road, Yuzhong District, Chongqing, 400016, China.
E-mail address: caoj723@163.com (J. Cao)

¹ Both authors contributed equally to this work.

Accepted 15 December 2021

Available online 24 December 2021

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.027>

RNA viral loads of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants in nasopharyngeal specimens at diagnosis stratified by age, clinical presentation and vaccination status



Dear Editor,

The SARS-CoV-2 Delta (B.617.2) variant has rapidly replaced the Alpha variant to become dominant in many European countries including Spain¹. The Delta variant, which accumulates several Spike (S) mutations that increase virus binding to ACE2 (i.e. L452R and P681R), appears to outperform Alpha in terms of replication efficiency in the respiratory tract,² allegedly resulting in higher viral loads and enhanced transmissibility.^{3,4} Interestingly, Ong et al.⁵ in a cohort of adults among which Delta variant cases were underrepresented (8%), reported comparable SARS-CoV-2 Delta and Alpha RNA loads in nasopharyngeal specimens (NP) at the time of SARS-CoV-2 infection RT-PCR diagnosis. This observation clearly contrasts with data reported in other studies^{6–9} which consistently show higher viral RNA loads for the Delta variant in the upper respiratory tract. None of the above studies^{6–9} seemingly matched participants infected with the Delta or Alpha variant for presence of one or more of the following parameters, all with a potential impact on results: presence or absence of COVID-19 symptoms, demographics, time to testing from symptoms onset (or index case contact in asymptomatic subjects) or vaccination status. To gain further insight into this issue, we conducted a retrospective, observational study with a convenience sample of 545 participants of whom 295 (149 male; 231, adults; median age, 39 years; range, 1–93) and 250 (125 male; 128 adults; median age 22 years; range, 0–96) had been infected by the Alpha and Delta variants, respectively, as documented by whole-genome sequencing,¹⁰ variant-specific RT-PCR (SARS-CoV-2 PCR Variant, Ascires, Sistemas Genómicos, Valencia, Spain), or inferred by S-gene target failure (SGTF) in the RT-PCR for the Alpha variant.¹⁰ All cases due to the Alpha variant occurred in unvaccinated participants between February–May 2021, whereas 51/250 represented SARS-CoV-2 Delta breakthrough infections in fully vaccinated adults (diagnosed at least after 15 days after vaccine schedule completion) between May and July 2021. The study was approved by the INCLIVA Research Ethics Committee, and informed consent was waived due to its retrospective nature. SARS-CoV-2 RNA viral loads in NP were estimated by using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) calibrated to the AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Viracell SA, Granada, Spain).¹⁰

We initially compared NP viral RNA loads in COVID-19 non-vaccinated individuals stratified by age (children, ≤ 18 years/adults) and time since symptoms onset (arbitrarily defined as 0–2, 3–7, or ≥ 8 days). As shown in Fig. 1, a trend towards higher viral RNA loads was seen for the Delta variant in both adults and children within 2 days after symptoms onset ($P = 0.27$ and $P = 0.26$, respectively), but not afterwards. Nonetheless, a wide range of viral RNA loads ($3. - \geq 11.0 \log_{10}$ copies/ml) was observed in individuals in comparison groups. In participants asymptomatic at the time of RT-PCR testing, SARS-CoV-2 RNA loads were notably higher for the Delta than the Alpha variant, in both adults (median, $1.5 \log_{10}$ higher) and children (median, $1.7 \log_{10}$ higher) ($P = 0.08$ and $P = 0.01$, respectively).

Note that asymptomatic individuals in comparison groups were matched for time elapsed from diagnosis of the index case to RT-PCR testing (within 7 days, as per protocol). Unfortunately, no data were available regarding as to how asymptomatic infections evolved over time.

As can be seen in Fig. 2, the slope of the regression line best fitting SARS-CoV-2 RNA load decay in COVID-19 patients was slightly higher overall for the Delta than for the Alpha variant, irrespective of participant age (not shown). Although speculative, the above

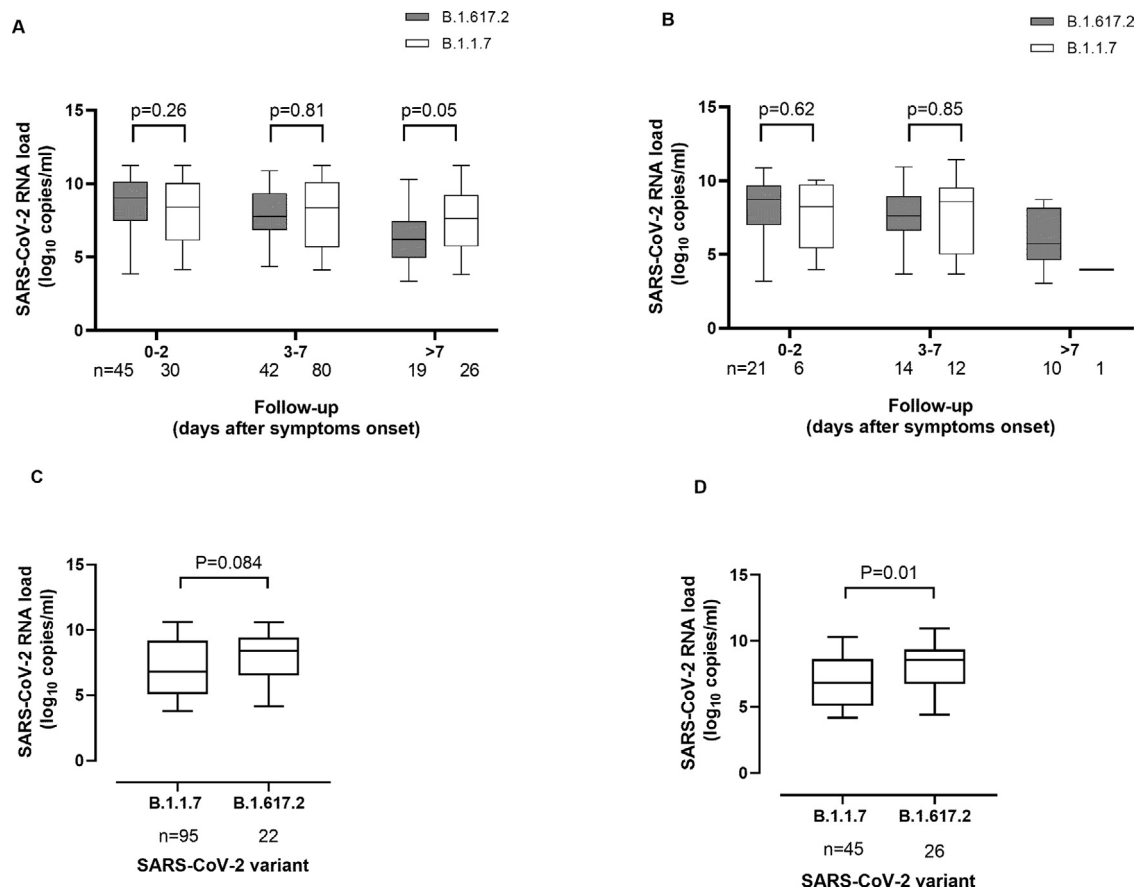


Fig. 1. Initial SARS-CoV-2 RNA loads in nasopharyngeal specimens from unvaccinated individuals infected by either Alpha (B.1.1.7) or Delta (B.1.617.2) variants. The Alpha lineage was confirmed by whole-genome sequencing in 108 cases, whereas in the remaining 230 it was inferred by S-gene target failure (SGTF) in the RT-PCR, as more than 95% of SGTFs detected in the Clínico-Malvarrosa Health Department belonged to that lineage within the timeframe of specimen collection (not shown). The Delta lineage was confirmed by whole-genome sequencing ($n = 138$) or variant-specific RT-PCR ($n = 61$). Whisker-plots of SARS-CoV-2 RNA loads in NP by time of sampling relative to symptoms onset are displayed separately for adults (A) and children (B). Whisker-plots of SARS-CoV-2 RNA loads in NP for asymptomatic participants are also shown separately for adults (C) and children (D). P values are shown for comparisons across groups.

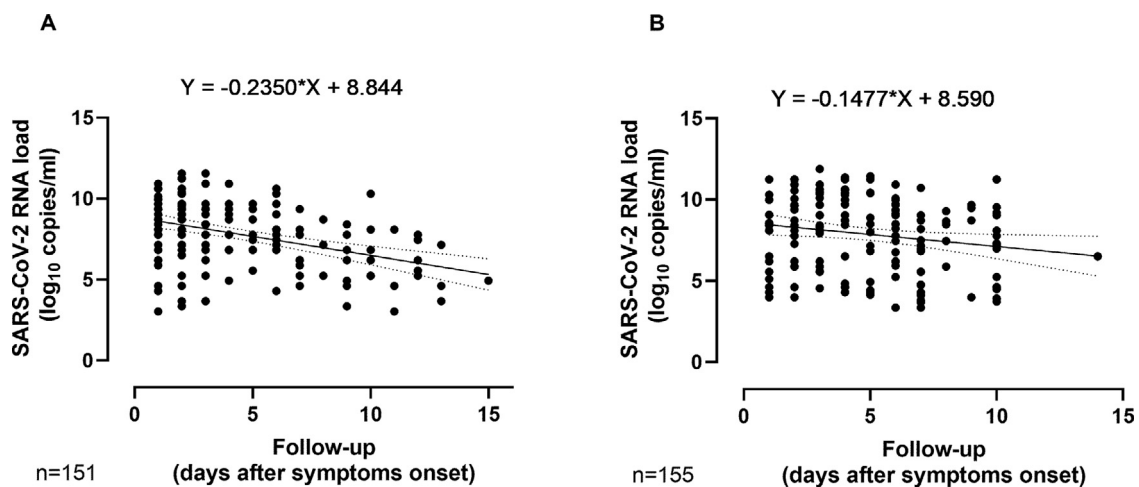


Fig. 2. Linear regression analysis of initial SARS-CoV-2 RNA loads from individuals infected with COVID by the Delta (A) and Alpha (B) variants according to time of sampling since symptoms onset. Regression lines best fitting SARS-CoV-2 RNA load decay are depicted.

data could be interpreted as suggesting that peak viral load in NP may be reached earlier in individuals infected by the Delta variant than the Alpha variant: even before symptoms onset, which favors increased transmissibility. In our view the data did not support a more extended period of viral shedding in the upper respiratory tract for the Delta variant, as previously suggested.⁷

We next compared SARS-CoV-2 Delta RNA loads in NP from non-vaccinated ($n = 128$) and fully vaccinated adults ($n = 51$) with Comirnaty® ($n = 27$), Spikevax® ($n = 9$), Janssen® ($n = 10$), or Vaxzevria® ($n = 5$). Time since full-dose vaccination was 51 days (range, 14 – 177). Overall, SARS-CoV-2 RNA load was found to be higher in non-vaccinated ($n = 128$; median, 8.1 log₁₀ copies/ml;

range, 3.4–11.6) than vaccinated individuals ($n = 51$; median, 7.8 $\log_{10}$ copies/ml; range 3.0–11.2), although without reaching statistical significance ($P = 0.31$). When considering patients with COVID-19 for the analysis (matched for time since symptoms onset: median, 3 days in both groups), a clear trend ($P = 0.12$) towards higher viral RNA loads was observed in non-vaccinated individuals (8.1 $\log_{10}$ copies/ml; range, 3.3–11.6) compared with vaccinated participants (median, 7.4 $\log_{10}$ copies/ml; range, 3.3–11.2).

In contrast, asymptomatic vaccinated and unvaccinated individuals displayed rather similar viral RNA loads (median, 8.7 $\log_{10}$ copies/ml; range, 3.0–10.9, and median, 8.4 $\log_{10}$ copies/ml; range, 4.0–10.6; $P = 0.85$). Vaccinated and unvaccinated participants were matched for sex ($P = 0.1$, but not age, $P < 0.01$). Contradictory data^{9,8} have been published on this issue, which are likely explained by between-study differences regarding time of RT-PCR testing.

Finally, we showed that initial SARS-CoV-2 RNA loads in NP for the prototypical B.1.617.2 variant ($n = 138$) and recently emerged subvariants ($n = 47$; AY.4, $n = 29$, AY.12, $n = 9$, AY.5, $n = 5$, AY.9, $n = 3$ and AY.3, $n = 1$) were quite similar when considered in combination (median, 8.7 $\log_{10}$ copies/ml; range, 4.6–11.6 vs. median, 8.4 $\log_{10}$ copies/ml; range, 4.0–12.1; $P = 0.20$). Comparison groups were matched for sex ($P = 0.61$), age ($P = 0.34$), development of COVID-19 ($P = 0.44$), time to NP sampling for both symptomatic and asymptomatic cases ($P = 0.80$) and vaccination status ($P = 0.20$). Of note, no B.1.617.2 subvariants seemed to carry additional spike mutations (K417N, Y145H and A222V) than might confer partial resistance to vaccine-elicited neutralizing antibodies. In summary, we found substantially higher NP initial viral loads for the Delta than the Alpha variant, in particular during the asymptomatic phase of the infection. Together with the overall lack of significant differences observed between viral loads in vaccinated and unvaccinated Delta-infected participants, this may help explain the epidemiological behavior of the Delta variant.

Financial support

This work received no public or private funds.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to all personnel working in the Clínico-Malvarrosa Health Department and at Clinic University Hospital, in particular those at the Microbiology laboratory, for their commitment in the fight against COVID-19. Eliseo Albert holds a Juan Rodés Contract (JR20/00011) from the Carlos III Health Institute. Estela Giménez holds a Juan Rodés Contract (JR18/00053) from the Carlos III Health Institute

References

- [1]. Data on SARS-CoV-2 variants in the EU/EEA. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/data-virus-variants-covid-19-eueea1>. Accessed October 21, 2021.
- [2]. Mlcochova P., Kemp S.A., Dhar M.S., Papa G., Meng B., Ferreira I.A.T.M., et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* 2021 Sep 6. doi:10.1038/s41586-021-03944-y.
- [3]. Campbell F., Archer B., Laurenson-Schafer H., Jinnai Y., Konings F., Batra N., et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance* 2021;26(24):2100509 Jun.
- [4]. Teyssou E., Delagrèverie H., Visseaux B., Lambert-Niclot S., Brichler S., Ferre V., et al. The Delta SARS-CoV-2 variant has a higher viral load than the Beta and the historical variants in nasopharyngeal samples from newly diagnosed COVID-19 patients. *J Infect* 2021;83(4):e1–3 Oct.
- [5]. Ong S.W.X., Chiew C.J., Ang L.W., Mak T.M., Cui L., Toh M.P.H.S., et al. Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis* 2021;ciab721 Aug 23.

- [6]. Wang Y., Chen R., Hu F., Lan Y., Yang Z., Zhan C. Transmission, viral kinetics and clinical characteristics of the emergent SARS-CoV-2 Delta VOC in Guangzhou, China. *EClinicalMedicine* 2021;40:101129 Oct.
- [7]. Luo C.H., Morris C.P., Sachithanandham J., Amadi A., Gaston D., Li M., et al. Infection with the SARS-CoV-2 delta variant is associated with higher infectious virus loads compared to the alpha variant in both unvaccinated and vaccinated individuals. *medRxiv* 2021 Aug 20:2021.08.15.21262077.
- [8]. Riemersma K.K., Grogan B.E., Kita-Yarbro A., Halfmann P., Kocharian A., Florek K.R., et al. Shedding of infectious SARS-CoV-2 despite vaccination. when the delta variant is prevalent – Wisconsin, July 2021. *medRxiv* 2021 August 11. doi:10.1101/2021.07.31.21261387.
- [9]. Blanquart F., Abad C., Ambroise J., Bernard M., Cosentino G., Giannoli J.M., et al. Characterisation of vaccine breakthrough infections of SARS-CoV-2 Delta and Alpha variants and within-host viral load dynamics in the community, France, June to July 2021. *Eurosurveillance* 2021;26(37):2100824 Sep.
- [10]. Costa R., Bueno F., Giménez E., Bracho A., Albert E., Carretero D., et al. Initial viral load and decay kinetics of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the upper respiratory tract of adults and children. *J Infect* 2021;83(4):496–522 Oct.

Rosa Costa, Beatriz Olea

Department of Microbiology, Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain

María Alma Bracho

CIBER in Epidemiology and Public Health Spain; Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia Valencia Spain; Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University of Valencia, Valencia, Spain

Eliseo Albert, Paula de Michelena

Department of Microbiology, Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain

Cecilia Martínez-Costa

Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

Department of Pediatrics, University of Valencia, Valencia, Spain

Fernando González-Candelas

CIBER in Epidemiology and Public Health Spain; Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia Valencia Spain; Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), CSIC-University of Valencia, Valencia, Spain

David Navarro*

Department of Microbiology, Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain

Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

*Correspondence author at: Department of Microbiology, Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro)

Accepted 15 December 2021
Available online 22 December 2021

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.018>

© 2021 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



OPEN

Combined kinetic analysis of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and virus-specific antibodies in critically ill adult COVID-19 patients

Rosa Costa^{1,5}, Juan Alberola^{2,5}, Beatriz Olea¹, Roberto Gozalbo-Rovira², Estela Giménez¹, Enric Cuevas-Ferrando³, Ignacio Torres¹, Eliseo Albert¹, Nieves Carbonell⁴, José Ferreres⁴, Gloria Sánchez³, Jesús Rodríguez-Díaz², María Luisa Blasco⁴ & David Navarro^{1,2}✉

Combined kinetic analysis of plasma SARS-CoV-2 RNAemia, Nucleocapsid (N)-antigenemia and virus-specific antibodies may help ascertain the role of antibodies in preventing virus dissemination in COVID-19 patients. We performed this analysis in a cohort of 71 consecutive critically ill COVID-19 patients (49 male; median age, 65 years) using RT-PCR assay, lateral flow immunochromatography method and receptor binding domain (RBD) and N-based immunoassays. A total of 338 plasma specimens collected at a median of 12 days after symptoms onset were available for analyses. SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia were detected in 37 and 43 specimens from 26 (36.5%) and 30 (42.2%) patients, respectively. Free RNA was the main biological form of SARS-CoV-2 found in plasma. The detection rate for both viral components was associated with viral load at the upper respiratory tract. Median time to SARS-CoV-2-RBD antibody detection was 14 days (range, 4–38) from onset of symptoms. Decreasing antibody levels were observed in parallel to increasing levels of both RNAemia and N-antigenemia, yet overall a fairly modest inverse correlation ($Rho = -0.35$; $P < 0.001$) was seen between virus RNAemia and SARS-CoV-2-RBD antibody levels. The data cast doubts on a major involvement of antibodies in virus clearance from the bloodstream within the timeframe examined.

SARS-CoV-2 seemingly replicates in a wide variety of organs and tissues, which contributes towards explaining the multisystemic nature of COVID-19¹. A plausible pathogenic scenario is that following initial replication in the respiratory tract, SARS-CoV-2 surpasses the epithelial barrier and disseminates through the bloodstream, reaching extrapulmonary sites². Supporting this view, apparently intact virions have been identified in plasma pellets from COVID-19 patients using electron tomography and immunostaining³; however, SARS-CoV-2 has never been cultivated from plasma specimens⁴. Furthermore, virus RNAemia, antigenemia (nucleocapsid-N- or Spike-S) or both are frequently detected in COVID-19 patients, at a rate modulated by the sensitivity of the analytical methods employed and notably by disease severity^{5–18}. In this latter regard, it has been shown that detection of either of these viral components within the first two weeks after SARS-CoV-2 infection diagnosis is associated with intensive care unit (ICU) admission, need for invasive mechanical ventilation, multiple organ failure and mortality rate^{5–18}.

Functional antibodies, especially those displaying virus neutralization capacity, may contribute to SARS-CoV-2 clearance from the bloodstream¹⁹, thus minimizing virus dissemination. If this assumption holds true, circulating antibody levels relatively early after infection may serve as a surrogate marker for poor clinical outcomes. In this setting, contradictory data have been published on the relationship between serum levels of

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. ²Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain. ³Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, IATA-CSIC, Valencia, Spain. ⁴Medical Intensive Care Unit, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain. ⁵These authors contributed equally: Rosa Costa and Juan Alberola. ✉email: david.navarro@uv.es

Variable	no. (%)
Gender	
Male	49 (69.1)
Female	22 (30.9)
Acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) II score	
< 10	14 (19.7)
10–14	26 (36.6)
15–29	31 (43.7)
Comorbidities	
Diabetes mellitus	17 (23.9)
Asthma/chronic lung disease	11 (15.5)
Hypertension	32 (45.0)
Obesity	38 (53.5)
Chronic heart disease	9 (12.6)
Vascular disease	7 (9.8)
Cancer	3 (4.2)
Hematologic disease	3 (4.2)
Number of comorbidity conditions	
One	22 (31.0)
Two or more	32 (45.0)
None	17 (24.0)
Oxygenation and ventilator support	
Invasive mechanical ventilation	63 (88.7)
PiO ₂ /FiO ₂ < 150 mmHg	57 (80.2)
Acute kidney disfunction	17 (23.9)
Antiviral or anti-inflammatory treatment	
Remdesivir	15 (21.1)
Corticosteroids	70 (98.5)
Tocilizumab	27 (38.0)

Table 1. Clinical characteristics of the study population at Intensive Care Unit admission.

antibodies with either neutralizing or uncharacterized functions and the magnitude of SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia^{3,4,10,13,14,16,17,20–23}. To shed light in this issue, here we conducted a combined kinetic analysis of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and virus-specific antibodies in sequential plasma specimens from a relatively homogeneous cohort of critically ill adult COVID-19 patients. To enhance data interpretation, we also sought to elucidate the biological form of SARS-CoV-2 present in blood.

Material and methods

Patients and specimens. In this prospective observational study, 71 consecutive critically ill COVID-19 patients (49 male and 22 female; median age, 65 years; range, 21–80 years) were enrolled between October 2020 and February 2021 (Table 1). These patients belonged to a previously reported cohort^{6,18}, of which two participants could not be included herein due to the lack of data on SARS-CoV-2 antibodies. Plasma specimens were obtained on a weekly basis after ICU admission, when possible, by centrifugation of whole blood EDTA tubes, cryopreserved and retrieved for the analyses described below. Medical history and laboratory data were prospectively recorded. The current study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario INCLIVA (May, 2020). All experiments were performed in accordance with relevant local guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all participants, either on the hospital ward or at the time of ICU admission.

Detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal specimens and plasma by RT-PCR. Nasopharyngeal specimens (NP) collected in 3 ml of Universal Transport Medium (UTM, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) were analyzed by RT-PCR within 24 h of receipt. The TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) was used, following RNA extraction carried out by using the Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kits coupled with the Thermo Scientific™ KingFisher Flex automated extraction instrument. Nucleic acid was extracted from plasma (400 µl) with the Abbott mSample Preparation System DNA kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) on the Abbott m2000sp platform (Abbott Molecular), while SARS-CoV-2 RNA amplification was carried out using the Abbott RealTime SARS-CoV-2 assay on the m2000rt platform, as previously described⁶. The limit of detection of the assay for plasma was found to be approximately 100 copies/ml (95% CI)⁶. SARS-CoV-2 viral loads in both specimen types were estimated

using the AMPLIRUN[®] TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Vircell SA, Granada, Spain)⁶, and reported as copies/ml throughout the study.

SARS-CoV-2 RNA-viability RT-qPCR assay. Using a previously published protocol²⁴, plasma specimens were diluted 1/10 in PBS, pretreated or not at high temperature (95 °C, 10 min) then treated with 5 mM of platinum chloride (PtCl₄) for 30 min at room temperature in DNA LoBind tubes (Eppendorf, Germany) in an orbital shaker (150 rpm). Viral RNA was then extracted using Maxwell[®] RSC 16 instrument and Maxwell RSC Pure Food GMO and authentication kit (Promega, Spain) and amplified by RT-qPCR targeting the N gene (N1 sequence). SARS-CoV-2 RT-qPCR negative plasma specimens spiked with heat-inactivated SARS-CoV-2 (approximately, 10⁵ gc/mL) were used as controls. Under these conditions, lack of viral RNA amplification in non-pretreated plasma following PtCl₄ treatment was interpreted as compatible with presence of free viral RNA (absence of viable virus) in the specimen.

Detection of SARS-CoV-2 N protein in plasma. The lateral flow immunochromatography (LFIC) device CLINITEST[®] Rapid COVID-19 Antigen Test (Siemens, Healthineers, Erlangen, Germany) was used for detection and grading of SARS-CoV-2 N-antigenemia in plasma specimens, as previously described¹⁸. The analytical sensitivity of the assay is around 50 pg/ml¹⁸. N-antigen line intensity was scored visually by five researchers in the group (RC, BO, EG, IT and EA) using a 3-level scale: 0, negative result; 1+, intensity of test band lower than control band and 2+, intensity of test band equal to or greater than control line¹⁸. When there was no consensus on degree of reactivity, the one designated by the majority of observers was taken as the final one.

Antibody detection immunoassays. SARS-CoV-2-RBD-reactive IgG antibodies were quantitated by an in-house-developed immunoassay using recombinant RBD produced in Sf9 insect cells, following a previously published protocol²⁵. The chemiluminescent Abbott Alinity SARS-CoV-2 anti-nucleocapsid protein IgG assay was used to measure (semiquantitative) SARS-CoV-2-N-reactive IgGs.

Statistical methods. Frequency comparisons for categorical variables were performed using Fisher's exact test. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U test. Correlations between variables of interest were calculated by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values were reported. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Clinical characteristics of patients. Patients were admitted to ICU at a median of 8 days (range, 2–25) after onset of symptoms. Most patients eventually required mechanical ventilation (88.7%). Median time of ICU stay was 19 days (range, 2–67). All patients but one were treated with corticosteroids, whereas remdesivir and tocilizumab were used in 21% and 38% of patients, respectively.

Detection of SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia in the cohort. A total of 338 plasma specimens from 71 patients (median, 4 samples/patient; range, 1–16) collected following ICU admission were available for analyses. Overall, the first plasma specimen in these patients was drawn at a median of 12 days (range, 3–38 days) after symptoms onset. SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia were detected in 37 and 43 specimens from 26 (36.5%) and 30 (42.2%) patients, respectively. Since the extent of virus replication in the upper respiratory tract (URT) may impact on the access of intact virus particles or viral products to the bloodstream, we investigated whether SARS-CoV-2 RNA load in NPs early following infection (median of 4 days after symptoms onset; range, 1–11) was associated with the likelihood of detecting viral RNAemia and N-antigenemia. SARS-CoV-2 RNA load estimates in NP specimens at the time of diagnosis were available for 51 of 71, of whom 20 and 22 had detectable viral RNAemia and N-antigenemia, respectively, during follow-up. In the remaining 20 patients either diagnosis of SARS-CoV-2 infection was made by using N-antigen detection LFIC tests or RT-PCR C_T values were not available. As shown in Fig. 1, patients developing virus RNAemia and N-antigenemia exhibited significantly higher viral SARS-CoV-2 RNA load in NP (*P* = 0.009 and *P* = 0.04, respectively) at diagnosis. Moreover, a tentative positive correlation between NP viral loads and viral RNAemia levels was observed in first positive RT-PCR plasma specimens (Rho = 0.42; *P* = 0.1). Notably, neither remdesivir nor tocilizumab treatment had an impact on the rate of positive SARS-CoV-2 RNAemia (*P* = 0.57 and 0.60, respectively) or N-antigenemia (*P* = 0.58 and *P* = 0.41, respectively).

Dynamics of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and virus-specific antibodies. Time to first positive viral RNAemia and N-antigenemia result was 10 days (range, 3–32) and 9 days (range, 3–29), respectively, since the onset of symptoms. Both virus components were first detected within 16 days after symptoms appearance in all but one patient. No sample obtained after day 32 had detectable viral RNAemia or N-antigenemia.

SARS-CoV-2-RBD antibodies were eventually detectable in 67 out of the 71 patients, with a median time to first detection of 14 days (range, 4–38) since onset of symptoms. Of the 4 patients who did not develop measurable antibodies, 2 had detectable viral RNAemia and N-antigenemia. Time to first detection of antibodies was comparable for patients with or without viral RNAemia (*P* = 0.21) and N-antigenemia (*P* = 0.1) and was not significantly correlated with initial viral load in NP (Rho = 0.229; *P* = 0.11). The time course of detection of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and RBD-IgG reactive antibodies is shown in Table 2. Note that the number

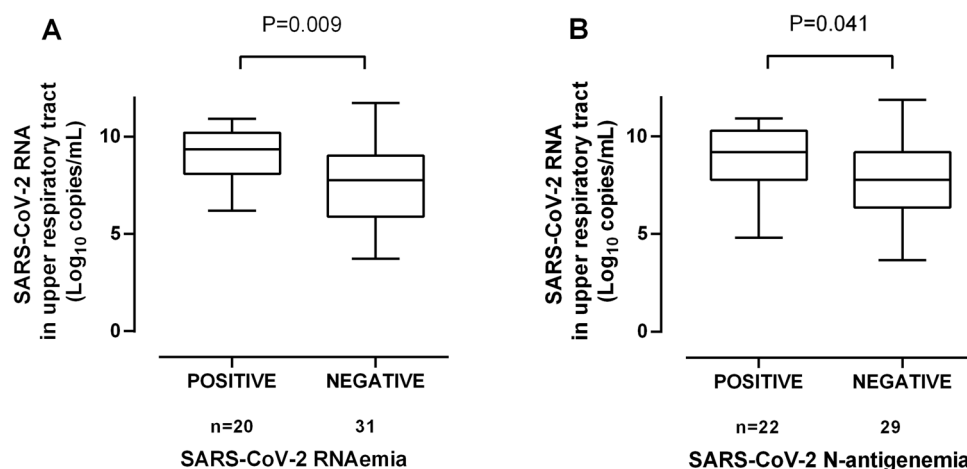


Figure 1. Box-plot depicting SARS-CoV-2 RNA load (in copies/ml) in nasopharyngeal specimens at the time of molecular diagnosis of SARS-CoV-2 infection in critically ill patients with or without subsequent virus RNAemia (A) or N-antigenemia (B). *P* values are shown for comparisons.

Combination of qualitative results for SARS-CoV-2 RNAemia or N-antigenemia and anti-RBD IgGs (total no. of specimens)	Time evolved since symptoms onset			
	Week 1. no. of specimens	Week 2. no. of specimens	Week 3. no. of specimens	≥ Week 4. no. of specimens
Detection of viral RNAemia and anti-RBD IgG (n = 25)	4	12	7	2
Detection of Detection of viral RNAemia and lack of anti-RBD IgG (n = 12)	5	5	1	1
Absence of viral RNAemia and detection of anti-RBD IgG (n = 272)	4	40	83	145
Absence of viral RNAemia and lack of anti-RBD IgG (n = 29)	2	9	4	14
Detection of viral N-antigenemia and anti-RBD IgG (n = 24)	6	16	0	2
Detection of viral N-antigenemia and lack of anti-RBD IgG (n = 19)	6	9	2	2
Absence of viral N-antigenemia and detection of anti-RBD IgG (n = 273)	2	36	90	145
Absence of viral N-antigenemia and lack of anti-RBD IgG (n = 22)	1	5	3	13

Table 2. Detection of SARS-CoV-2 RNAemia, N-antigenemia and anti-RBD IgG stratified by time since COVID-19 symptoms onset in critically ill patients. *RBD* receptor binding domain.

of plasma specimens in which viral RNAemia or N-antigenemia and anti-RBD IgG antibodies were co-detected was rather small (25 and 24 samples of 338, respectively).

Overall, specimens containing viral RNA or N protein had significantly lower serum SARS-CoV-2-RBD antibody levels (Fig. 2) than those in which these viral components were not detected. Moreover, decreasing antibody levels were observed in parallel to increasing levels of both RNAemia and N-antigenemia (Fig. 3). Yet overall, a fairly modest inverse correlation ($Rho = -0.35$; $P < 0.001$) was seen between virus RNAemia and SARS-CoV-2-RBD antibody levels (Fig. 4).

Data on SARS-CoV-2-N-reactive antibodies were only available for 50 plasma specimens, of which 16 tested positive by N-antigen LFIC assay. A trend ($P = 0.16$) towards higher N-antibody levels was seen for plasma testing negative by LFIC assay than in plasma testing positive.

Characterization of the biological form of SARS-CoV-2 RNA in plasma. A total of seven plasma specimens from unique patients with detectable SARS-CoV-2 RNAemia (median load, 3.2 log₁₀/ml; range, 3.0–3.8), drawn at a median of 9 days after symptoms onset (range, 3–12), were run on the SARS-CoV-2 RNA-viability RT-PCR assay. The data are shown in Table 3. The RT-PCR signal was completely abolished following PtCl₄ treatment in 6 of the 7 non-pretreated (heated) specimens, whereas in the remaining one (specimen 2, obtained 3 days after symptoms onset) viral RNA was still detected, albeit at a lower level (approximately 1 log₁₀). Treatment of heat-inactivated virus preparations with PtCl₄ usually resulted in a threefold reduction in the level of viral RNA detected (not shown). The data thus suggested that viral RNA was likely in a non-capsidated, free state in the majority of plasma specimens subjected to analysis.

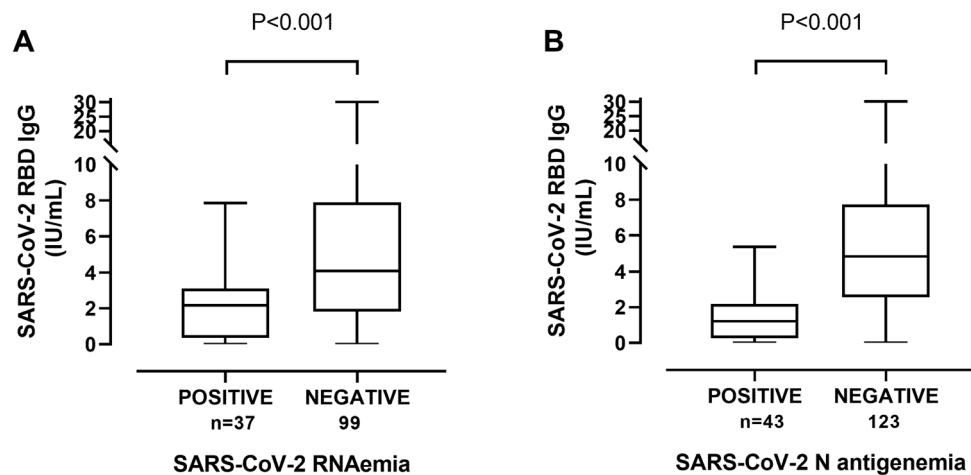


Figure 2. Box-plot depicting anti-SARS-CoV-2-S (RBD) antibody levels in plasma according to presence or absence of virus RNAemia (A) or N-antigenemia (B). P values are shown for comparison.

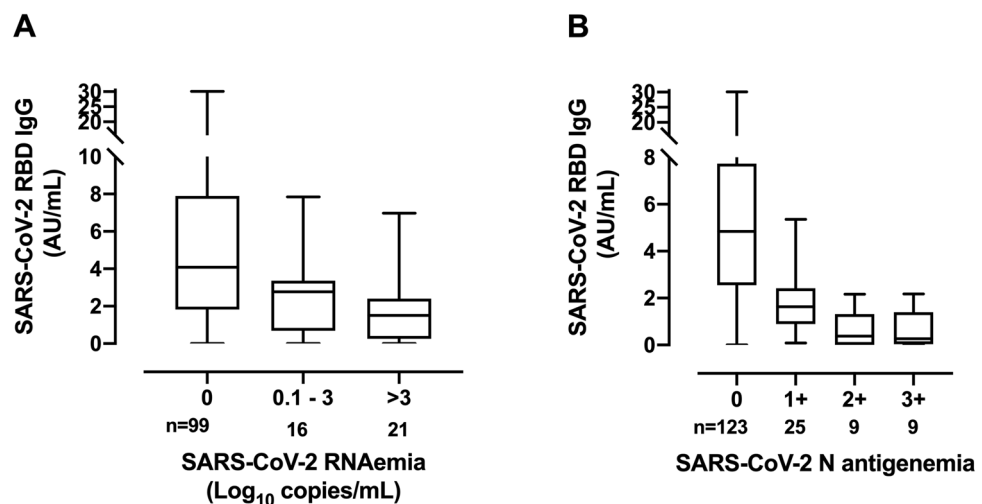


Figure 3. Box-plot depicting anti-SARS-CoV-2-S (RBD) antibody levels in plasma according to (A) the magnitude of virus RNAemia (in copies/ml) or (B) N-antigenemia (graded as described in the methods section).

Discussion

Occurrence of viral RNAemia and N-antigenemia early after SARS-CoV-2 infection has been associated with poor clinical outcomes, including increased mortality in critically ill COVID-19 patients^{5–18}. The magnitude of viral RNAemia and N-antigenemia may reflect the extent to which SARS-CoV-2 is replicating in the respiratory tract, which may itself impact on the clinical course of infection²⁶. In turn, SARS-CoV-2 specific antibodies may prevent or minimize infection of extrapulmonary sites by neutralizing free virions in the systemic compartment and contributing to virus clearance from bloodstream by immunocomplexed viral particles, which are then targeted for degradation by innate immune cells. Although mechanistically plausible, neither of the above assumptions have been clearly proven. To address these issues, we investigated the dynamics of SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia relative to that of SARS-CoV-2-specific antibodies, and the influence on these parameters of viral load in the URT at diagnosis, in a relatively homogeneous cohort of ICU patients. As previously reported^{6,18}, viral RNAemia and N-antigenemia occurred frequently in our cohort (36.5% and 42.2% of patients respectively), were first detected relatively early after COVID-19 symptoms onset (within 2 weeks), and were not detectable beyond day 32 after symptoms onset. In our cohort, the likelihood of detecting either of these viral components in plasma from ICU patients was directly related to the magnitude of SARS-CoV-2 load in NP at diagnosis. A similar finding was reported by Le Hingrat et al.¹⁶, albeit in a mixed cohort in which ICU patients were under-represented. Moreover, viral loads in NP and in first RT-PCR positive plasma specimens tended to correlate. Taken collectively, the data therefore point to a link between extent of virus replication in URT and virus burden in the blood compartment. Nevertheless, time to seroconversion was not correlated with viral load in NP. This

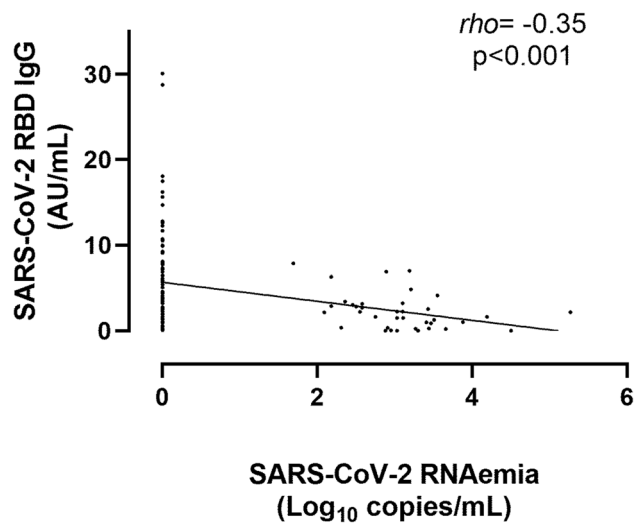


Figure 4. Overall correlation between anti-SARS-CoV-2-S (RBD) antibody and SARS-CoV-2 RNA levels in plasma. Rho and *P* values are shown.

Patient number/day at which plasma was drawn after symptoms onset	Pre-treatment (95 °C, 10 min)	PtCl ₄ (5 mM) treatment	RT-PCR N1 gene cycle threshold	
			Replicate 1	Replicate 2
1/5	No	No	36.5	36.4
		Yes	ND	ND
	Yes	No	36.4	36.4
		Yes	ND	ND
2/3	No	No	34.8	35.0
		Yes	37.3	37.1
	Yes	No	34.9	35.3
		Yes	ND	ND
3/7	No	No	34.5	34.7
		Yes	ND	ND
	Yes	No	34.9	35.3
		Yes	ND	ND
4/9	No	No	34.7	34.1
		Yes	ND	ND
	Yes	No	35.6	35.9
		Yes	ND	ND
5/12	No	No	34.7	35.8
		Yes	ND	ND
	Yes	No	35.8	35.8
		Yes	ND	ND
6/11	No	No	35.5	35.2
		Yes	ND	ND
	Yes	No	35.9	36.4
		Yes	ND	ND
7/11	No	No	36.5	37.7
		Yes	ND	ND
	Yes	No	36.6	ND
		Yes	ND	ND

Table 3. RT-PCR viability assay performed with plasma from unique intensive care unit patients. *ND* not detected.

is in contrast to data from a previously published study²⁷, although differences in patient characteristics across cohorts and notably immunoassays used across the studies may help explain the discrepancy.

Passive transfer of SARS-CoV-2-S-reactive monoclonal antibodies has been shown to mediate virus clearance from the respiratory tract in both experimental models and humans^{20,28,29}. Although virus-specific antibodies may plausibly contribute to SARS-CoV-2 clearance from the bloodstream, this assumption remains to be conclusively proven. In this context, demonstration of an inverse relationship between serum levels of SARS-CoV-2-reactive antibodies and the magnitude of SARS-CoV-2 RNAemia could indicate antibody involvement, provided that mature virus particles enter the blood compartment. Here, the frequency of detection of viral RNA or N protein in plasma was inversely related to serum SARS-CoV-2-RBD and anti-N antibody levels, respectively, and a trend towards a quantitative inverse association was observed, yet we found an at best modest (inverse) correlation between virus RNAemia and SARS-CoV-2-RBD antibody levels. Use of a semiquantitative assay precluded conducting a similar analysis for N-antigenemia, regarding which the data in the literature are contradictory. For example, in line with our findings, Martín-Vicente and colleagues¹⁷ reported that frequency of N-antigenemia early following ICU admission (24 h) was > 2.5 fold higher in the absence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies than in those with detectable antibodies. In addition, levels of anti-S antibodies correlated inversely (albeit modestly) with viral RNA load in plasma ($Rho = -0.45$; $P < 0.001$). Other studies also found a higher rate of detection of either viral RNAemia N-antigenemia or both in the presence of low or undetectable anti-S or anti-N antibody levels in mixed cohorts^{4,13,16}. In contrast, several studies failed to show an inverse correlation between neutralizing antibody titers and viral RNA levels in blood^{3,14,23}; nevertheless, antibodies with functional activities other than virus neutralization may contribute to virus clearance from blood. Interpretation of the above data is not straightforward, due to marked differences across studies in terms of patient characteristics, particularly the analytical features of the immunoassays employed, type of specimen processed (sera or plasma), use of unique or sequential specimens, and timing of sample collection after symptoms onset. In addition, since immunoassays are only capable of detecting either antibodies in a free state or antigen-antibody immunocomplexes with available antibody binding sites²², elucidating the biological form of the virus present in blood (either infectious or defective genome viral particles, free viral components or both) may help to correctly interpret virus-antibody dynamics. In this respect, by using a RT-PCR viability assay we showed that within the timeframe examined, most viral RNA present in blood is likely in a non-capsidated state, indicating that the main source of viral products (RNA and proteins) in blood could be PANoptosis in the URT²²; nonetheless, one out of seven plasma specimens yielded a RT-PCR viability profile compatible with presence of capsidated (protected) virus RNA. In this sense, apparently intact virus particles have been observed in plasma pellets using electron tomography and immunostaining³; of note, that latter specimen was obtained early after symptoms onset (3 days), suggesting that the presence of intact virions in the bloodstream may be restricted to a narrow window close to the time of contracting the infection.

The study has several limitations that must be acknowledged. First, its relatively small sample size, which precluded robust statistical subanalyses assessing the impact of demographics, clinical risk factors and use of different therapies on patient's outcomes. Second, at ICU admission, most patients were at an advanced phase of SARS-CoV-2 infection, when the clinical picture is mainly related to the aberrant virus-triggered inflammatory response. Third, the use of analytical methods with suboptimal sensitivity for RNAemia and N-antigenemia detection, compared to droplet digital PCR and chemiluminescent assays, respectively^{3,15,16}, and the lack of data on S-antigenemia. Moreover, functional characterization of antibodies, such evaluation of its virus neutralizing activity, was not done; yet plasma levels of antibodies binding the RBD strongly correlate with neutralizing antibody titers³⁰. In contrast, our analysis of sequential specimens from patients could be considered a strength of the research.

In summary, the data presented herein support that the rates of detection of SARS-CoV-2 RNAemia and N-antigenemia, but not time to first anti-S-antibody detection, are modulated by the level of virus replication in the URT. Moreover, although viral RNAemia and N-antigenemia were more likely to be documented in patients with low than high anti-S or anti-N antibody levels, the relatively modest correlation between these levels and viral RNA loads in plasma specimens argue against major antibody involvement in virus clearance from the bloodstream, at least within the time window examined (median of 12 days after onset of symptoms), in which free virus components instead of intact virus particles appeared to be the main biological form of SARS-CoV-2 in blood. Whether a different scenario takes place earlier after infection is a possibility whose clinical implications warrant further research.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 20 October 2021; Accepted: 11 May 2022

Published online: 18 May 2022

References

- Berlin, D. A., Gulick, R. M. & Martinez, F. J. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2451–2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009575> (2020).
- Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review. *JAMA* **324**, 782–793. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839> (2020).
- Jacobs, J.L. et al. SARS-CoV-2 viremia is associated with COVID-19 severity and predicts clinical outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **10**, ciab686. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab686> (2021).

4. Andersson, M. I. *et al.* SARS-CoV-2 RNA detected in blood products from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. *Wellcome Open Res.* **5**, 181. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16002.2> (2020).
5. Tang, K., Wu, L., Luo, Y. & Gong, B. Quantitative assessment of SARS-CoV-2 RNAemia and outcome in patients with coronavirus disease 2019. *J. Med. Virol.* **93**, 3165–3175. <https://doi.org/10.1002/jmv.26876> (2021).
6. Olea, B. *et al.* Lower respiratory tract and plasma SARS-CoV-2 RNA load in critically ill adult COVID-19 patients: Relationship with biomarkers of disease severity. *J. Infect.* **83**, 381–412. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.05.036> (2021).
7. Chen, X. *et al.* Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 1937–1942. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa449> (2020).
8. Miki, S. *et al.* On-admission SARS-CoV-2 RNAemia as a single potent predictive marker of critical condition development and mortality in COVID-19. *PLoS ONE* **16**, e0254640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254640> (2021).
9. Bermejo-Martin, J. F. *et al.* Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit. Care.* **24**, 691. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03398-0> (2020).
10. Gutmann, C. *et al.* SARS-CoV-2 RNAemia and proteomic trajectories inform prognostication in COVID-19 patients admitted to intensive care. *Nat. Commun.* **12**, 3406. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23494-1> (2021).
11. Ram-Mohan, N. *et al.* SARS-CoV-2 RNAemia predicts clinical deterioration and extrapulmonary complications from COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 218–226. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab394> (2022).
12. Hogan, C. A. *et al.* High frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and association with severe disease. *Clin. Infect. Dis.* **72**, e291–e295. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1054> (2021).
13. Eberhardt, K. A. *et al.* RNAemia corresponds to disease severity and antibody response in hospitalized COVID-19 patients. *Viruses* **12**, 1045. <https://doi.org/10.3390/v12091045> (2020).
14. Prebensen, C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA in plasma is associated with intensive care unit admission and mortality in patients hospitalized with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e799–e802. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1338> (2021).
15. Ogata AF, *et al.* Ultrasensitive serial profiling of SARS-CoV-2 antigens and antibodies in plasma to understand disease progression in COVID-19 patients with severe disease. *Clin. Chem.* **66**, 1562e72. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa213> (2020).
16. Le Hingrat, Q. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 789. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.025> (2020).
17. Martín-Vicente, M. *et al.* Absent or insufficient anti-SARS-CoV-2 S antibodies at ICU admission are associated to higher viral loads in plasma, antigenemia and mortality in COVID-19 patients. *J. Intern. Med.* **291**, 232–240. <https://doi.org/10.1111/joim.13386> (2022).
18. Olea, B. *et al.* SARS-CoV-2 N-antigenemia in critically ill adult COVID-19 patients: Frequency and association with inflammatory and tissue-damage biomarkers. *J. Med. Virol.* **94**, 222–228. <https://doi.org/10.1002/jmv.27300> (2022).
19. Shah, V. K., Fimal, P., Alam, A., Ganguly, D. & Chattopadhyay, S. Overview of immune response during SARS-CoV-2 infection: Lessons from the past. *Front. Immunol.* **11**, 1949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01949> (2020).
20. Kreuzberger N, *et al.* SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst. Rev.* **9**, CD013825. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013825.pub2> (2021).
21. Röltgen K, *et al.* SARS-CoV-2 antibody responses correlate with resolution of RNAemia but are short-lived in patients with mild illness. *medRxiv*: 17:2020.08.15.20175794. <https://doi.org/10.1101/2020.08.15.20175794> (2020).
22. Belogiannis, K. *et al.* SARS-CoV-2 antigenemia as a confounding factor in immunodiagnostic assays: A case study. *Viruses* **13**, 1143. <https://doi.org/10.3390/v13061143> (2021).
23. Li, Y. *et al.* SARS-CoV-2 viremia is associated with distinct proteomic pathways and predicts COVID-19 outcomes. *J. Clin. Invest.* **131**, e148635. <https://doi.org/10.1172/JCI148635> (2021).
24. Cuevas-Ferrando, E. *et al.* Platinum chloride-based viability RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection in complex samples. *Sci. Rep.* **11**, 18120. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97700-x> (2021).
25. Gozalbo-Rovira, R. *et al.* SARS-CoV-2 antibodies, serum inflammatory biomarkers and clinical severity of hospitalized COVID-19 patients. *J. Clin. Virol.* **131**, 104611. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104611> (2020).
26. Pujadas, E. *et al.* SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir. Med.* **8**, e70. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30354-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30354-4) (2020).
27. Masiá M, *et al.* SARS-CoV-2 seroconversion and viral clearance in patients hospitalized with COVID-19: Viral load predicts antibody response. *Open Forum Infect. Dis.* **8**, ofab005. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab005> (2021).
28. Du, L., Yang, Y. & Zhang, X. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2293–2306. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00752-2> (2021).
29. Weinreich, D. M. *et al.* A neutralizing antibody cocktail, in outpatients with covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 238–251. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035002> (2021).
30. Sánchez-Sendra, B. *et al.* Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern elicited by the comirnaty COVID-19 vaccine in nursing home residents. *Sci. Rep.* **12**, 3788. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07849-2> (2022).

Acknowledgements

We are grateful to all personnel who work at Clinic University Hospital, in particular to those at Microbiology laboratory and the Intensive Care Unit for their commitment in the fight against COVID-19. Eliseo Albert holds a Juan Rodés Contract (JR20/00011) from the Health Institute Carlos III. Ignacio Torres holds a Río Hortega Contract (CM20/00090) the Health Institute Carlos III. Enric Cuevas was funded by a predoctoral contract from the MICINN, Call 2018. We thank Siemens Healthineers (Erlangen, Germany) for providing reagents free of charge.

Author contributions

R.C., J.A., B.O., R.G.-R., E.G., E.C.-F., I.T., E.A., G.S., J.R.-D.: Methodology and validation of data. N.C., J.F. and M.L.B.: Medical care of ICU patients. D.N.: Conceptualization, supervision, writing the original draft. All authors reviewed the original draft.

Funding

This work received no private or public funds.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinf

Letter to the Editor

Initial SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens is not associated with severity and midterm resolution of pneumonia in COVID-19 patients

Dear editor

Several studies aimed at evaluating the incidence of and delineating risk factors associated with post-acute COVID-19 syndrome have been published in *Journal of Infection*.^{1–3} In this context, persistence of dyspnea, cough and chest pain, commonly associated with alterations in lung function tests and chest imaging have been reported in a non-negligible fraction of COVID-19 survivors up to 1 year after symptom onset.^{4–5} To our best knowledge, limited information has been published on the potential impact of SARS-CoV-2 viral load at COVID-19 diagnosis on the time course of clinical and radiological resolution of SARS-CoV-2 pneumonia.⁶ In the current retrospective, observational study we further assessed the potential link between viral load at the upper respiratory tract (URT) early after symptom onset, prior to hospitalization due to COVID-19 pneumonia, and recovery of lung function/resolution of lung abnormalities at medium term (median of 2 months) following hospital discharge.

A total of 131 adult COVID-19 patients (84 male/47 female; median age, 61 years; range, 19–85) presenting with pneumonia were enrolled. Patients were admitted to the Pneumology Service within two periods: between March 5 and December 4 2020, ($n = 97$), and between October 21 2021, and January 20 2022, ($n = 34$), during which COVID-19 in the Valencian Community was due (more than 97% of cases) to the ancestral Wuhan-Hu-1 (or Wuhan-Hu-1 G614) in the former and Omicron BA.1 in the latter period. The sample size was based on a convenience set of all available patients, without formal power calculations: only patients initially screened by the RT-PCR described below and who completed clinical, imaging and lung function evaluation by around 2 months after hospital discharge (median 57 days; IQR, 50–66) were included. Patient severity during hospital stay was stratified according to the WHO ordinary Outcomes Scale⁷ as either mild disease (WHO score 3–4), or severe disease (WHO score 5–7. At follow-up residual dyspnea was evaluated using modified British Medical Research Council guidelines.⁸ Patients also underwent lung function tests (spirometry) and chest X-ray (CXR). Unresolved cases were defined by Forced Vital Capacity (FVC) <80% (without Forced Expiratory Volume in 1 s-FEV1/FVC <70) and/or lung diffusion capacity (DLCO) <80% and/or persistent radiological alterations in the CXR.⁹ Persistence of residual lesions in the CXR was defined as any visible opacity on the CXR in the absence of prior history of pulmonary disease (except for asthma or sleep apnea) or uncontrolled cardiac or renal failure. Extent of radiological involvement after COVID-19 pneumonia was quantified using the adapted Radiographic Assessment of Lung Edema (RALE) score.¹⁰ The study

was approved by the INCLIVA Research Ethics Committee (June 2020), and informed consent was waived due to its retrospective nature. SARS-CoV-2 RNA loads in nasopharyngeal specimens (NP) were estimated using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) calibrated to the AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Viracell SA, Granada, Spain).¹¹ Across the Omicron BA.1 period, this variant was identified based on TaqPath S gene target failure (SGTF) and confirmed by whole-genome sequencing (not shown).

Medical records showed underlying pulmonary disease at the time of hospital admission (chronic obstructive pulmonary disease or asthma) in 20 patients. Importantly, all patients experiencing COVID-19 pneumonia presumably due to Omicron BA.1 had been fully vaccinated against COVID-19 with mRNA vaccines. Out of the 131 patients, 95 (72.5%) presented with mild COVID-19 pneumonia (WHO scale 4), while the remaining 36 patients had severe disease (WHO scale 5–7), requiring non-invasive ventilation ($n = 4$), high flow nasal oxygen cannula ($n = 11$) or respiratory support by invasive mechanical ventilation ($n = 21$). Median hospital stay was 10 days (range, 2–62). According to above-defined criteria, 45/131 patients (34.3%) were classified as not recovered by 2 months after hospital discharge (unresolved cases).

Initial SARS-CoV-2 RNA load in NP was quantified at a median of 6 days after symptom onset (IQR, 3–8). Median SARS-CoV-2 RNA loads did not differ significantly across the ancestral variant or Omicron BA.1-dominant study periods (6.2 log₁₀ copies/ml vs. 7.1 log₁₀ copies/ml, at equivalent sample collection times; $P = 0.07$). As shown in Fig. 1, patients displayed comparable ($P = 0.21$) viral loads in NP whether they recovered from pneumonia or not (median, 6.51 vs. 5.88 log₁₀ copies/ml). NP specimens from patients in the two groups had been collected within a comparable time frame after symptom onset ($P = 0.39$).

We next conducted a subanalysis assessing the potential impact of SARS-CoV-2 RNA load in NP on resolution according to time elapsed since symptom onset. The following timeframes were arbitrarily defined: 0–2 days, 3–5 days, 6–8 days and 9–10 days. Patients with NP collected 11 or more days after symptom onset ($n = 27$) were excluded due to the lack of matching across comparison groups (not shown). SARS-CoV-2 RNA load was comparable across patients within all timeframes regardless of whether they recovered or not (Table 1). Regression logistic models (Supplementary Table 1) confirmed the apparent lack of impact of initial SARS-CoV-2 RNA load on this outcome (OR, 1.72; 95% CI, 0.83–3.58; $P = 0.14$); this observation stood regardless of the SARS-CoV-2 variant presumably involved in COVID-19 cases (Wuhan-Hu-1: OR, 1.74; 95% CI, 0.74–4.09; $P = 0.20$; Omicron BA.1: OR, 1.74; 95% CI, 0.42–7.28; $P = 0.44$). As expected, pneumonia severity was identified as a factor associated with unresolved pneumonia.

Our findings are in contrast to those of Lerum and colleagues who reported a negative association between viral load at baseline and the diffusion capacity of the lungs for carbon monoxide

Table 1

Impact of SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens at diagnosis on recovery from COVID-19 pneumonia 2 months after hospital discharge.

Days from symptom onset to time of specimen collection	Median (range) SARS-CoV-2 RNA viral load (in log ₁₀ copies/ml) according to recovery from pneumonia/no. of patients		P value ^a
	Resolved	Unresolved	
0–2	8.1 (2.9–10.6)/14	8.4 (1.7–11.2)/11	0.80
3–5	7.1 (3.4–10.3)/25	7.8 (5.5–11.6)/6	0.70
6–8	7.1 (2.1–9.4)/24	6.7 (4.8–10)/11	0.56
9–10	5.6 (3.8–8.1)/7	5.0 (3.2–8.7)/6	0.60

^a Mann–Whitney U test. Two-sided exact P values are reported. A P value <0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

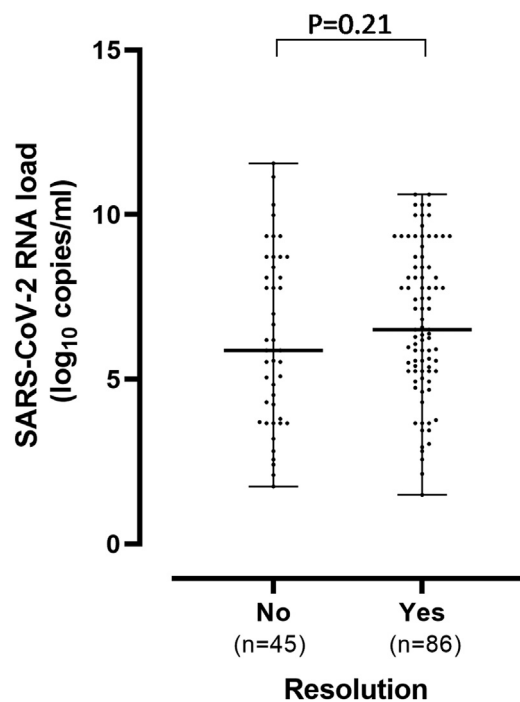


Fig. 1. SARS-CoV-2 RNA loads in nasopharyngeal specimens (NP) at diagnosis from COVID-19 patients who either recovered or not from pneumonia. P value for comparison of median values is shown.

(DL_{CO}%) by 3 months after hospital discharge, the most frequently affected pulmonary function test variable in the study group (recruited prior to the availability of COVID-19 vaccines).⁶ Nevertheless, no apparent association between viral load and resolution of computer tomography abnormal findings or other lung function parameters was observed. Of relevance, the study by Lerum et al.⁶ and ours differ in several potentially critical factors such as the timing of URT specimen collection (median 8 vs. 6 days since symptom onset, respectively), and timing of clinical evaluation of patients after hospital discharge (median of 3 and 2 months, respectively).

The current study has several limitations that deserve comment, the first being the relatively small sample size (particularly during the Omicron BA.1 wave). Second, specimen collection may have been performed too late after SARS-CoV-2 infection (median of 6 days) to capture peak viral loads. Third, no viral cultures were performed to evaluate the content of viable viral particles in the specimens. Fourth, importantly, no sequential specimens were available from participants, which hampered the assessment of SARS-CoV-2 RNA load kinetics in the URT at the individual level. Fifth, no computer tomography scans or lung function tests other than spirometry were systematically performed.

In summary, the data presented herein oppose the notion that SARS-CoV-2 at URT in patients eventually hospitalized with COVID-

19 pneumonia has a major impact on the recovery rate, according to clinical, imaging and lung functional spirometry parameters by around 2 months after hospital discharge. In this context, our findings do not support prescribing new antivirals with potent intrinsic activity against SARS-CoV-2 based upon the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in the URT early after symptom onset. Nevertheless, given the above-highlighted limitations, further studies are warranted to clarify this issue.

Author contributions

RC, BO: methodology and data validation. JT, JS-C, NC, and MLB: data gathering and analysis. DN: conceptualization, data analysis and manuscript writing.

Funding

This work received no private or public funds.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgements

We are grateful to residents and staff at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario and medical and nursing staff at Hospital Clínico Universitario of Valencia.

Data availability statement

The data presented in the manuscript have not been made available, but can be shared upon request.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.jinf.2022.10.031](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.031).

References

- Moreno-Pérez O, Merino E, Leon-Ramirez JM, Andres M, Ramos JM, Arenas-Jiménez J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: a Mediterranean cohort study. *J Infect* 2021;**82**:378–83.
- Taboada M, Cariñena A, Moreno E, Rodríguez N, Domínguez MJ, Casal A, et al. Post-COVID-19 functional status six-months after hospitalization. *J Infect* 2021;**82**:e31–3.
- Fernández-de-Las-Peñas C, Martín-Guerrero JD, Cancela-Cilleruelo I, Moro-López-Menchero P, Rodríguez-Jiménez J, Navarro-Pardo E, et al. Exploring the recovery curves for long-term post-COVID functional limitations on daily living activities: the LONG-COVID-EXP-CM multicenter study. *J Infect* 2022;**84**:722–46.
- Daines L, Zheng B, Pfeffer P, Hurst JR, Sheikh A. A clinical review of long-COVID with a focus on the respiratory system. *Curr Opin Pulm Med* 2022;**28**:174–9.
- Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet* 2021;**397**:220–32.

6. Lerum TV, Maltzahn NN, Aukrust P, Trøseid M, Henriksen KN, Kåsine T, et al. Persistent pulmonary pathology after COVID-19 is associated with high viral load, weak antibody response, and high levels of matrix metalloproteinase-9. *Sci Rep* 2021;**11**:23205.
7. WHO. Treatment Trial Design Master Protocol synopsis Final 18022020. www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/COVID-19. Date last accessed: July 9 2022..
8. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;**54**:581–6.
9. Sibila O, Molina-Molina M, Valenzuela C, Ríos-Cortés A, Arbilla-Etxarrie A, Torralba García Y, et al. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) Consensus for post-COVID-19 Clinical Follow-up. *Open Resp Arch* 2020;**2**:278–83.
10. Wong HYF, Lam H, Fong AH, Leung ST, Chin TW, Lo CSY, et al. Frequency and Distribution of Chest Radiographic Findings in COVID-19 Positive Patients. *Radiology* 2020;**296**:E72–8.
11. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect* 2021;**27**:472.e7–472.e10.

Rosa Costa

Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Valencia, Spain

Jaime Signes-Costa

Pulmonary Department, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Valencia, Spain

Beatriz Olea

Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Valencia, Spain

Julia Tarraso

Pulmonary Department, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Valencia, Spain

Nieves Carbonell, María Luisa Blasco

Medical Intensive Care Unit, Clinic University Hospital, INCLIVA
Health Research Institute, Valencia, Spain

David Navarro*

Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health
Research Institute, Valencia, Spain
Department of Microbiology, School of Medicine, University of
Valencia, Valencia, Spain

*Corresponding author at: Microbiology Service, Hospital
Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA. Av.
Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.
E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro)