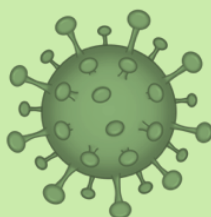




VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Medicina

CARGA VIRAL DEL SARS-CoV-2 EN TRACTO
RESPIRATORIO SUPERIOR: FACTORES QUE LA
MODULAN E IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS



TESIS DOCTORAL

Paula de Michelena García

Dirigida por David Navarro Ortega

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

Mayo 2024



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA [ò ʘ]
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**CARGA VIRAL DEL SARS-CoV-2 EN TRACTO
RESPIRATORIO SUPERIOR: FACTORES QUE LA
MODULAN E IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS**

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 Paula de Michelena García, titulado *“Carga viral del SARS-CoV-2 en tracto respiratorio superior: factores que la modulan e implicaciones diagnósticas”* 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 2024,



David Navarro Ortega

Agradecimientos

Me siento tan agradecida con todas y cada una de las personas y circunstancias que me han acompañado hasta este momento, que podría escribir unos agradecimientos más largos que la propia tesis doctoral; pero procuraré ser breve. Quiero dar las gracias en primer lugar a mi familia y amigos. En especial a mis padres, no solo por la confianza que han depositado siempre en mí, sino por darme la oportunidad de estudiar aquello que soñaba. Por su apoyo incondicional. También me gustaría agradecer profundamente a aquellos que ya no están físicamente conmigo, porque aunque no pueda verlos, les siento cerca en cada paso y han sido fundamentales para que yo esté aquí hoy. Y a María, por ser una especie de hada madrina estos últimos años.

A todos los residentes con los que he compartido esta etapa, desde los que fueron mis resis mayores y me acogieron con los brazos abiertos hasta mis resis pequeños que siguen haciéndome sentir igual de acogida, porque todos ellos han sido la mayor de las suertes. Por todo lo que he podido aprender de ellos tanto profesional como personalmente. Porque no se imaginan lo increíbles que son. Y porque sus actos del día a día hacen del mundo, indudablemente, un lugar mejor. Quisiera destacar a mis coRs, Diego y Jorge, ha sido un placer crecer a vuestro lado, conocerlos y formar el mejor de los equipos; gracias por haberlo puesto siempre tan fácil y hacer de esta etapa la aventura más divertida. A Arantxa, por su sensibilidad, esfuerzo y dedicación, por inspirarme tanto personal como profesionalmente, pero sobre todo por su amistad. A Daff, el residente mayor que cualquiera desearía, gracias por tu enorme corazón, por cuidar siempre de todos nosotros. A Bea, Devi y Elena, por su humanidad, unión y compañerismo; gracias por creer y confiar tanto en mí y por todo lo que hemos crecido juntas. A Blanca, porque es un ser de luz que nos ilumina cada día con su bondad innata e inteligencia emocional sin límites y porque su amistad es un auténtico regalo. Y por supuesto, y como no podía ser de otra manera, gracias a Rosa, no solo por ser la mejor residente mayor que podría haber tenido sino por ser también la amiga que jamás habría soñado. Gracias por haber sido el mejor ejemplo de trabajo, esfuerzo e ilusión; el espejo en el que mirarme, por enseñarme tanto incluso sin pretenderlo, por guiarme, acompañarme y por todos esos ratitos compartidos que atesoraré para siempre. Gracias por estar siempre a un audio de distancia.

A todos los adjuntos que forman parte del Servicio o que lo han hecho durante un tiempo a lo largo de estos años porque ha sido una verdadera suerte coincidir con todos y cada uno de ellos. Gracias por vuestra dedicación, por vuestro tiempo, por compartir vuestros conocimientos e inquietudes conmigo y por permitirme así aprender algo de cada uno de vosotros que formará parte de mi aprendizaje personal para siempre. También a las personas que forman parte del equipo de investigación más potente que haya podido conocer y con los que he tenido la oportunidad de trabajar y de aprender a lo largo de este periodo, por su entusiasmo contagioso y su afán por conseguir resultados prometedores tras un trabajo bien hecho fruto del esfuerzo. Me gustaría agradecer en especial a Nacho, porque sabe tan bien como yo que sin su ayuda, entrega, paciencia y buen hacer estos folios que siguen no hubiesen sido posibles, al menos para mí. También a Dixie, que no dudó en ayudarme cuando me sumergí en esas primeras bases de datos que dieron lugar a todo esto; y a Bea, que me ayudó a poner en orden algunos de esos datos en varias ocasiones. Y finalmente a Eliseo, por su implicación, su tiempo, su generosidad y su característica sonrisa amable que siempre te hace sentir reconfortado.

Tampoco puedo dejar de mencionar a los técnicos especializados de laboratorio con los que he compartido tantas horas y que me han ayudado, enseñado y cuidado tanto sin titubear. Gracias por vuestra paciencia y comprensión, por no haber dudado en explicarme lo que necesitase o quisiese saber, por hacer que todo resultase más fácil.

Y en último lugar, y mi mayor agradecimiento, es para mi director de tesis, el Dr. David Navarro. Por ser fuente de inspiración, ejemplo de trabajo y fiel impulsor del interés científico. Y en mi caso particular, por su ayuda incondicional, su confianza en mí y por darme la oportunidad y concederme el privilegio de lograr sacar este proyecto adelante. Por hacerlo literalmente posible. Y por formar parte del conjunto de buenas obras de las que he sido testigo y de las cuales he podido disfrutar todos estos años.

A mi abuelo

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 dispone el Real Decreto 99/2011, del 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. de Michelena P, Torres I, Albert E, Bracho A, González-Candelas F, Navarro D. Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in Delta-variant breakthrough COVID-19. *J Infect.* 2022 Apr; 84(4):579-613.
- II. de Michelena P, Torres I, Ramos-García Á, Gozalbes V, Ruiz N, Sanmartín A, Botija P, Poujois S, Huntley D, Albert E, Navarro D. Real-life performance of a COVID-19 rapid antigen detection test targeting the SARS-CoV-2 nucleoprotein for diagnosis of COVID-19 due to the Omicron variant. *J Infect.* 2022 May; 84(5):64-66.
- III. de Michelena P, Olea B, Torres I, González-Candelas F, Navarro D. SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens from outpatients with breakthrough COVID-19 due to Omicron BA.1 and BA.2. *J Med Virol.* 2022 Dec; 94(12):5836-5840.
- IV. de Michelena P, Torres I, Ferrando EC, Olea B, González-Candelas F, Sánchez G, Navarro D. RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with breakthrough coronavirus disease 2019 caused by the Delta and Omicron variants. *Clin Microbiol Infect.* 2023 Feb; 29(2):256.e1-256.e4.

Abreviaturas y acrónimos

- ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2.
- Ag: antígeno.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention.
- CoV: coronavirus.
- COVID-19: enfermedad por SARS-CoV-2.
- Ct: umbral de ciclo (del inglés, *Cycle Threshold*).
- CV: carga viral.
- E: proteína de envoltura SARS-CoV-2.
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control.
- ENF: exudado nasofaríngeo.
- GUSB: enzima β -glucuronidasa.
- HCoV: coronavirus humanos.
- HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- IC: intervalo de confianza.
- IL-1: interleucina 1.
- IL-6: interleucina 6.
- INCLIVA: Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico de Valencia.
- kb: miles de bases.
- LFIC: inmunocromatografía de flujo lateral (del inglés, lateral flow immunohromatography).
- M: proteína de membrana del SARS-CoV-2.
- MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio.
- μ l: microlitro.
- ml: mililitro.
- mM: micromolar.
- N: proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2.
- N°: número.

- NSP: proteínas no estructurales (del inglés, Non-Structural Proteins).
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ORF: marco de lectura abierto (del inglés, Open Reading Frame).
- pp1a: poliproteína 1a.
- pp1ab: poliproteína 1ab.
- qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa.
- PRDA: prueba rápida de detección de antígenos.
- RBD: dominio de unión al receptor (del inglés, Receptor Binding Domain).
- RE: retículo endoplasmático.
- RdRp: ARN polimerasa dependiente de ADN.
- rpm: revoluciones por minuto.
- RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.
- S: proteína de la espícula del SARS-CoV-2.
- SARS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo.
- SARS-CoV-2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2.
- SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda.
- TC: tomografía computarizada.
- TMPRSS2: proteasa transmembrana de serina de tipo 2.
- TRS: tracto respiratorio superior.
- UCI: unidad de cuidados intensivos.
- VOC: variante de preocupación (del inglés, variant of concern).

ÍNDICE

Agradecimientos.....	V
Presentación	IX
Abreviaturas y acrónimos	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.1. Origen del SARS-CoV-2	3
I.2. Taxonomía	4
I.3. Estructura y virología del SARS-CoV-2	5
I.4. Transmisión	8
I.5. Patogenia.....	9
I.6. Presentación clínica	10
I.7. Diagnóstico	12
I.8. Carga viral.....	15
I.9. Variantes	17
I.9.1. Variante Alfa B.1.1.7	18
I.9.2. Variante Delta B.1.617.2.....	19
I.9.3. Variante Ómicron B.1.1.529	19
I.10. Tratamiento	21
I.11. Vacunación	23
I.11.1. BNT162b2 (Pfizer-BioNtech).....	24
I.11.2. ARNm-1273 (Moderna).....	25
I.11.3. ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca).....	25
I.11.4. Ad26.COV.2.S (Johnson & Johnson)	26
II. HIPÓTESIS.....	29
III. OBJETIVOS.....	33
IV. METODOLOGÍA	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
V.1. Impacto en la carga de ARN del SARS-CoV-2 del tiempo transcurrido desde la vacunación completa hasta la infección por la variante Delta del COVID-19 (Artículo I)	49
V.2. Rendimiento en la vida real de una prueba rápida de detección de antígenos COVID-19 dirigida a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 para el diagnóstico de COVID-19 debido a la variante Ómicron (Artículo II)	55

V.3. Carga de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes ambulatorios afectados por el brote de COVID-19 debido a Ómicron BA.1 y BA.2 (Artículo III).....	60
V.4. Cargas de ARN del SARS-Cov-2 en pacientes con infección por COVID-19 causada por las variantes Delta y Ómicron (Artículo IV).....	66
VI. CONCLUSIONES	73
VII. BIBLIOGRAFÍA	77
VIII. ANEXOS	97
VIII.1 Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral.....	97
VIII.2 Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral.....	101
Artículos	103

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoV) abarcan un grupo de virus capaces de infectar tanto a animales como a humanos, causando en estos últimos infecciones respiratorias cuya presentación clínica puede variar de formas leves a graves. Previamente, en 2002 y 2012, respectivamente, dos coronavirus altamente patógenos de origen zoonótico, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), emergieron en humanos causando enfermedades respiratorias mortales y convirtiendo así a los coronavirus emergentes en una nueva preocupación de salud pública.

A finales de 2019, apareció en Wuhan, China, un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, que originó un brote de neumonía viral poco común hasta el momento. Esta nueva enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), altamente transmisible, se fue propagando rápidamente por todo el mundo, superando con creces al SARS-CoV y al MERS-CoV tanto en número de personas infectadas como en extensión geográfica de las zonas afectadas. De este modo, el brote por COVID-19 se convirtió en una amenaza de gran magnitud para la salud pública mundial que todavía perdura en la actualidad (1).

I.1. Origen del SARS-CoV-2

A finales de diciembre de 2019, se notificaron grupos de pacientes con neumonía de causa desconocida en diversos centros de salud de la provincia de Wuhan, en China, con síntomas similares a los que presentaron anteriormente los pacientes infectados por el SARS-CoV y/o el MERS-CoV. La mayoría de los casos diagnosticados en un primer momento fueron vinculados epidemiológicamente al Mercado Mayorista de Mariscos de Huanan. El 31 de diciembre se reportó desde la Comisión Municipal de Salud de Wuhan un brote de neumonía de causa no identificada y se informó a la Organización Mundial de la Salud (1).

Para principios de enero de 2020, la enfermedad se había propagado a otras ciudades de la provincia de Hubei y a otras partes de China, hallándose incluso en pacientes sin antecedentes de exposición al mercado (1). Los científicos identificaron un

nuevo *Betacoronavirus* nunca visto como agente causal y, el 30 de enero, la OMS declaró el brote como una emergencia de salud pública de preocupación internacional.

Finalmente, el 11 de febrero del 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus nombró oficialmente al nuevo coronavirus SARS-CoV-2, y la OMS denominó a la enfermedad COVID-19. El brote se extendió con rapidez a otras partes de China y fue declarado pandemia mundial el 11 de marzo. Aunque se piensa que el virus es de origen natural, todavía no se sabe con certeza cómo y cuándo se produjo la transmisión de animales a humanos (1).

I.2. Taxonomía

Los coronavirus (CoV) son virus envueltos de ARN monocatenario de polaridad positiva, 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 el momento actual, la familia *Coronaviridae* consta de 39 especies de coronavirus ordenadas en 27 subgéneros, 5 géneros y 2 subfamilias, las cuales se clasifican en el suborden *Cornidovirineae*, el orden *Nidovirales* y el reino *Riboviria*. Los coronavirus humanos, se encuentran dentro de la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*; y se agrupan genotípica y serológicamente en cuatro géneros principales: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (2).

El SARS-CoV-2 es un virus de la familia *Coronaviridae*, clasificado en el subgénero *Sarbecovirus* del género *Betacoronavirus* por un grupo de estudio perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (2). Las principales diferencias entre el SARS-CoV-2 y el resto de los SARS-CoV más estrechamente relacionados varían entre los distintos estudios dependiendo de la elección de la medida (nucleótidos o aminoácidos) y de la región del genoma (3).

El genoma del SARS-CoV-2, de ARN de cadena simple y sentido positivo, demuestra una estrecha relación filogenética con el SARS-CoV y otros coronavirus asociados a este presentes en murciélagos; de hecho es idéntico al del SARS-CoV en casi

un 80% de su secuencia, mientras que solo guarda un parecido de un 50% con el MERS-CoV (4). Además, el SARS-CoV-2, posee una característica genómica particular: la inserción de cuatro residuos de aminoácidos (PRRA) en la proteína S. Dicha 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 son los virus de ARN más grandes conocidos, deben su nombre a su apariencia similar a una corona y se cree que infectan fundamentalmente a vertebrados (5). El genoma del SARS-CoV-2 tiene un tamaño variable de 29,8 a 29,9 kb. Los genomas de los coronavirus humanos se organizan en un número variable de marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican proteínas específicas necesarias para la replicación y el ensamblaje del virus. ORF1b es una parte del gen ORF1a/b, el cual codifica una gran poliproteína que se procesa en múltiples proteínas no estructurales (nsp), incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). 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 el retículo endoplásmico rugoso en la poliproteína 1a (pp1a) y la poliproteína 1ab (pp1ab), respectivamente (6). Estas poliproteínas se escinden en 16 proteínas no estructurales (NSP): NSP 1-11, partiendo de pp1a; y NSP 12-16, partiendo de pp1ab. La liberación proteolítica de NSP 1 ocurre de forma rápida, lo que le permite interferir con los procesos de traducción de la célula huésped al inducir la degradación del ARNm celular (7). Las NSP 2-16 contienen el complejo de replicación y transcripción del virus y codifican múltiples enzimas con distintas funciones, incluyendo proteasas, helicasas, polimerasas, exonucleasas y endonucleasas, N7-metiltransferasa y 2'O-metiltransferasa, y enzimas de desubiquitinación (8).

El último tercio de los genomas de los coronavirus humanos contiene genes que codifican proteínas estructurales y accesorias. Las principales cuatro proteínas estructurales codificadas aquí son: la nucleocápside (N), la membrana (M), la envoltura (E) y la proteína de la espícula (S) (**figura I.1**) (9). La proteína N, que se asocia 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 (10). La proteína M es importante

para el ensamblaje viral, contiene un corto dominio N-terminal 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 imprescindible para el ensamblaje y la liberación viral (10).

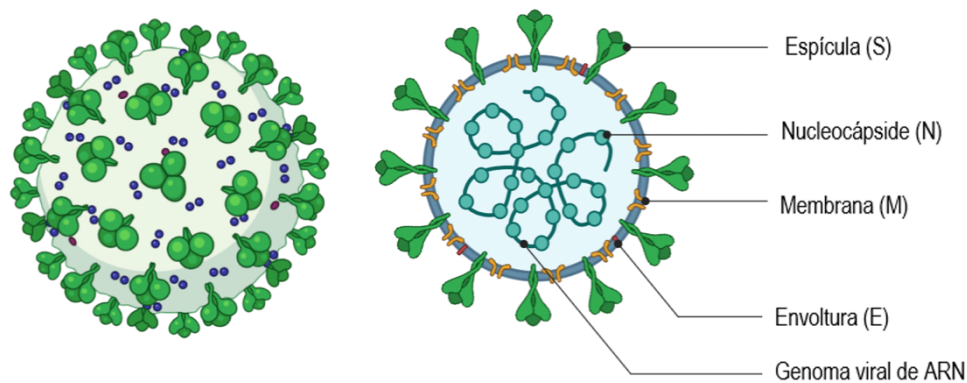


Figura I.1. Estructura del virus SARS-CoV-2.

Por último, la proteína S otorga a los coronavirus los característicos picos que componen su aspecto en forma de corona. Esta proteína, que 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 conocen con exactitud. Estas proteínas accesorias están 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 relacionada con la apoptosis de las células huésped a través de la activación de caspasa-3 (14).

La proteína S o proteína de la espícula es una glicoproteína estructural transmembrana de tipo I homotrimérica compuesta por tres partes o subunidades similares, correspondientes a tres dominios, dos de ellos funcionales (S1 y S2) y uno transmembranal, comprendido en la subunidad S2. Las tres subunidades que forman la proteína S encajan con el receptor ACE-2 como una llave y median la fusión de la cubierta membranosa del virus con la membrana de la célula que está siendo infectada (15). El receptor ACE2 se expresa en numerosos tipos de células en todo el cuerpo humano,

incluidos pulmones, mucosas oral y nasal, corazón, tracto gastrointestinal, riñones, hígado, bazo y cerebro (16), lo que advierte de la gran extensión de la infección que es capaz de causar el SARS-CoV-2.

Las subunidades S1 y S2 son funcionalmente distintas, lo que resulta imprescindible para la entrada del virus en las células huésped. La unión entre la proteína S y el receptor ACE-2 marca el punto de destino del virus en el organismo, pero es la activación de la proteína S lo que abre las puertas de la célula al virus (15). El dominio N-terminal de la subunidad S1 de la proteína contiene el dominio de unión al receptor (RBD) que interactúa directamente con el receptor ACE2 en la célula huésped, el cual es el receptor primario que el SARS-CoV-2 utiliza para la entrada celular (**figura I.2**) (17). El dominio C-terminal de la subunidad S2 fusiona las membranas virales y de la célula huésped para permitir la entrada del genoma viral en la célula huésped (18). Las subunidades funcionales del complejo S trimérico se encuentran en una conformación cerrada (etapa de prefusión) o abierta (etapa de postfusión) (19), con una subunidad siempre en una conformación abierta para permitir el reconocimiento y la unión al ACE2 (20). El RBD se conforma en cinco hebras β antiparalelas rodeadas por varias hélices α (21). De la conformación cerrada a la abierta, el RBD experimenta una reorganización estructural por la cual la región de la cabeza globular gira en el sentido de las agujas del reloj, alterando así su superficie electrostática (21). Una vez posicionado, numerosos residuos dentro del RBD forman enlaces de hidrógeno o puentes salinos con residuos del receptor ACE2, permitiendo una unión estrecha (22), mientras que la estructura cóncava del RBD permite tres regiones de unión distintas (21).

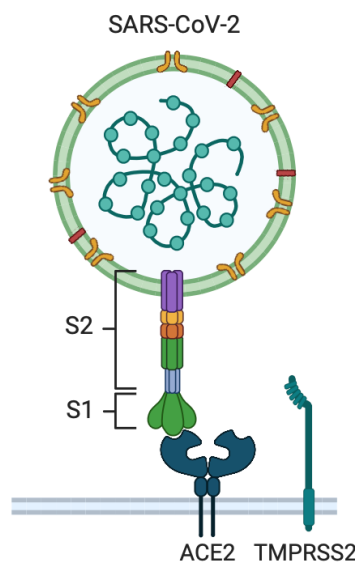


Figura I.2. Unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 en la célula huésped.

La activación de la proteína S está mediada la proteasa TMPRSS2 de la célula huésped, que facilita la fusión de las membranas virales y de la célula huésped y podría tener un papel en la propagación del virus en las vías respiratorias (23). TMPRSS2 corta la proteína S, lo que activa proteínas de la envoltura viral que favorecen la fusión con la membrana celular (15). Tras la unión entre la proteína S y el receptor de la célula huésped, las proteasas de esta escinden la proteína S, provocando así la liberación del dominio S2 y permitiendo por tanto la fusión y la entrada en la célula (24). Los virus entran en la célula rodeados de membrana celular, formando endosomas. En estas pequeñas bolsas celulares, se liberan catepsinas, otras proteínas que modifican de nuevo la proteína S, y proteasas que favorecen la liberación del ARN viral al citoplasma. Puesto que se trata de un virus ARN de sentido positivo, al ser liberado, el ARN viral se traduce directamente a poliproteínas, que son procesadas en proteínas funcionales responsables de la replicación y transcripción del virus. Por lo que por un lado se producen ARNs que son traducidos en proteínas estructurales del virus y por otro se generan ARNs genómicos que serán empaquetados en los nuevos viriones que se van formando. La RdRp es una enzima vital para la replicación del ARN viral, y es responsable de copiar el ARN viral en nuevas cadenas de ARN durante el proceso de replicación del virus. Durante este proceso, la RdRp utiliza la plantilla de ARN viral para sintetizar nuevas cadenas de ARN complementarias. Finalmente, los viriones se liberan al exterior de la célula infectando así a otras células (15).

I.4. Transmisión

El principal mecanismo de transmisión del SARS-CoV-2 es a través de la exposición a secreciones respiratorias de una persona infectada. Estas se transmiten de persona a persona mediante la excreción y posterior inhalación de aerosoles a través de gotas respiratorias debido al contacto cercano, la tos o los estornudos (25). A su vez, 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 (26). Sin embargo, aunque los coronavirus pueden persistir en superficies inanimadas durante horas e incluso días, se ha visto que la concentración del virus disminuye rápidamente a causa de la evaporación de las gotas de agua (27).

También se ha observado que tanto los pacientes sintomáticos como los asintomáticos pueden ser fuente de infección, de hecho se cree que la mayoría de los contagios se producen a partir de personas asintomáticas o incluso presintomáticas durante el periodo de incubación, especialmente en el caso de la variante Ómicron (25, 28). Generalmente, pese a que la transmisión puede tener lugar en diferentes entornos, como en la familia, la comunidad, el hospital y otros lugares concurridos, la transmisión nosocomial no parece ser la principal vía de transmisión debido a la aplicación de medidas de control de la infección en los entornos clínicos (29).

Con el objetivo de limitar la propagación del virus, se recomiendan medidas de protección, como el uso de equipos de protección individual, el mantenimiento de la ventilación en espacios cerrados, la distancia física con casos positivos y la desinfección de manos y superficies (30).

I.5. Patogenia

La enfermedad por COVID-19 se revela como una entidad de gran complejidad, con una marcada variabilidad en su presentación clínica y afectación de múltiples órganos. A pesar de que inicialmente se identifica al pulmón como el sitio primario de daño, la respuesta hiperinflamatoria asociada a esta enfermedad repercute en todo el organismo, generando disfunciones en los diferentes sistemas de órganos (31).

En cuanto a la patogenia de la infección por SARS-CoV-2 en humanos se puede manifestar desde síntomas leves hasta insuficiencia respiratoria grave. En el momento en que se une el virus a las células epiteliales del tracto respiratorio, este empieza a replicarse y migra hacia las vías respiratorias inferiores, entrando en las células epiteliales alveolares de los pulmones. La rápida replicación del SARS-CoV-2 en los pulmones puede desencadenar una fuerte respuesta inmunitaria que conduce a una tormenta de citoquinas, responsable en último lugar del síndrome de distrés respiratorio agudo e insuficiencia respiratoria, lo que supone la principal causa de muerte en pacientes con COVID-19 (32-33).

Los cambios histopatológicos en los pacientes con COVID-19 se producen principalmente en los pulmones. Los análisis realizados mostraron daño alveolar difuso

bilateral, formación de membrana hialina, descamación de neumocitos y depósitos de fibrina en pulmones de pacientes con COVID-19 grave. En algunos casos también se observó inflamación exudativa. Los ensayos de inmunohistoquímica detectaron el antígeno SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores, el epitelio bronquial y el epitelio de la glándula submucosa, así como en los neumocitos tipo I y tipo II, los macrófagos alveolares y las membranas hialinas de los pulmones (34, 32, 35, 36).

Por otro lado, se ha observado que los pacientes de edad avanzada (>60 años) y con enfermedades graves preexistentes tienen un mayor riesgo de desarrollar síndrome de dificultad respiratoria aguda y muerte (37-39). También se ha descrito fallo multiorgánico en algunos casos de COVID-19 (30, 34, 40).

I.6. Presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar desde síntomas leves a graves dependiendo de factores tales como la edad, la variante del SARS-CoV-2 responsable de la infección e incluso el estado de vacunación (41). En general, los síntomas más frecuentes son fiebre, fatiga y tos seca. Otros síntomas menos frecuentes son cefalea, hemoptisis, diarrea, anorexia, odinofagia, dolor torácico, escalofríos así como náuseas y vómitos (34, 32, 42, 43). También se han documentado casos de trastornos olfativos y del gusto (44). La mayoría de las personas mostraron síntomas tras un periodo de incubación de 1-14 días (más comúnmente alrededor de los 5 días), y la disnea y la neumonía se desarrollaron en una mediana de 8 días desde el inicio de la enfermedad (29).

En términos generales, se pueden discernir varias etapas que comúnmente se observan en pacientes con formas graves de la enfermedad, las cuales suelen correlacionarse con hallazgos clínicos y de laboratorio. En una primera fase, se evidencia una viremia en la que el virus ingresa al organismo a través del sistema respiratorio, llegando a los pulmones y manifestándose con los síntomas más característicos como fiebre, tos o malestar general. En este punto, ya se pueden observar indicadores como la linfopenia y el incremento de LDH y dímero D, que se asocian con un peor pronóstico. Posteriormente, entre 7 y 16 días después del inicio de la enfermedad, se inicia una fase de neumonía, en la que la situación clínica del paciente se deteriora rápidamente, siendo

la disnea el síntoma principal, acompañada de una reducción en la saturación de oxígeno. Durante esta etapa, el virus se disemina fuera del pulmón y se pierde el control inmunológico sobre la replicación viral (31).

Por último, se desarrolla una fase grave caracterizada por el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y el fallo multiorgánico, con alteraciones en los tiempos de coagulación y un aumento en marcadores como la ferritina, la proteína C reactiva, las transaminasas, el tiempo de protrombina y la trombocitopenia. Durante esta etapa, el organismo se encuentra en un estado de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), caracterizado por fiebre, taquicardia, taquipnea y linfopenia, junto con un aumento en los marcadores inflamatorios. Sin embargo, el desarrollo de shock es menos frecuente en comparación con otras enfermedades que cursan con una tormenta de citoquinas, como la sepsis, y generalmente no se observa elevación de los niveles de lactato (31).

Se cree que todas las edades de la población son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, cuya media de edad se sitúa en torno a los 50 años (29, 34, 32, 42, 43). Sin embargo, sí que se han observado diferencias respecto a las manifestaciones clínicas en función de esta. En general, se ha visto que los varones de edad avanzada (>60 años) con comorbilidades tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad respiratoria grave que requiera hospitalización o incluso de fallecer, al contrario que la mayoría de los jóvenes y los niños, que suelen presentar enfermedades leves o ser asintomáticos (29, 43, 45). Cabe mencionar que el riesgo de enfermedad no fue mayor en las mujeres embarazadas. Sin embargo, se notificaron pruebas de transmisión transplacentaria del SARS-CoV-2 de una madre infectada a un neonato, aunque fue un caso aislado (46, 47).

En cuanto a la gravedad de la enfermedad por COVID-19, se consideraron pacientes críticos aquellos que requirieron ventilación en una unidad de cuidados intensivos (UCI). Por lo general, estos pacientes presentaban insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o disfunción o fallo multiorgánico (29, 48). Se vio que en este grupo de pacientes, al ingreso, la opacidad en vidrio esmerilado fue el hallazgo radiológico más frecuente en la tomografía computarizada (TC) de tórax (34, 32, 42, 43). Además, la mayoría también desarrolló linfopenia marcada, similar a la observada en pacientes con SARS-CoV y MERS-CoV, y los no supervivientes desarrollaron linfopenia más grave con el tiempo (34, 32, 42, 43). Se reparó también en que los varones mayores de 68 años tenían un

mayor riesgo de insuficiencia respiratoria, lesión cardíaca aguda e insuficiencia cardíaca que condujo a la muerte, independientemente de los antecedentes de enfermedad cardiovascular (48).

Así mismo, a medida que ha ido avanzando la pandemia se ha observado que existe un problema cada vez más reconocido, consecuencia de la infección por el SARS-CoV-2, sobre el que se está desarrollando un importante volumen de literatura médica y es el COVID-19 persistente o prolongado. Este síndrome afecta a pacientes cuyos síntomas pueden ser persistentes o, por el contrario, aparecer tras un periodo asintomático, semanas o meses después de la infección inicial. El cuadro clínico es tan heterogéneo y multisistémico como en la fase aguda, por lo que se requiere un manejo multidisciplinar ya que las secuelas pueden generar un alto impacto en la calidad de vida y en el ámbito laboral y social. Además, su aparición no parece estar relacionada con la gravedad de la infección inicial, por lo que puede afectar tanto a pacientes leves, incluso asintomáticos, como a aquellos que han requerido hospitalización. Sin embargo, pese a que puede afectar a personas de cualquier edad, se ha visto que es más frecuente en mujeres de mediana edad (49).

I.7. Diagnóstico

El diagnóstico temprano es fundamental para controlar la propagación del COVID-19. En la actualidad, el estándar de oro se basa en la detección molecular del ácido nucleico del SARS-CoV-2 mediante qRT-PCR (**figura I.3**) (1). Existen en el mercado numerosos kits destinados a la detección del ácido nucleico viral dirigidos a los genes ORF1b (incluido RdRp), N, E o S (50). El procedimiento consiste en tomar una muestra con un hisopo de la nariz y/o de la garganta del paciente; y el tiempo de detección varía desde varios minutos a horas, dependiendo de la tecnología empleada (51). Sin embargo, la detección molecular puede verse afectada por diversos factores. De hecho, aunque el SARS-CoV-2 se ha detectado a partir de diversas fuentes respiratorias, como frotis faríngeos, saliva orofaríngea posterior, frotis nasofaríngeos, esputo y líquido bronquial, la carga vírica es mayor en las muestras del tracto respiratorio inferior (52). Y cabe destacar que es posible que la carga viral ya haya disminuido desde su nivel máximo al inicio de la enfermedad (52), lo que supone que los falsos negativos puedan ser comunes

cuando se utilizan hisopos orales, motivo por el que deben adoptarse múltiples métodos de detección para confirmar un diagnóstico de COVID-19 si existe una alta sospecha (53).

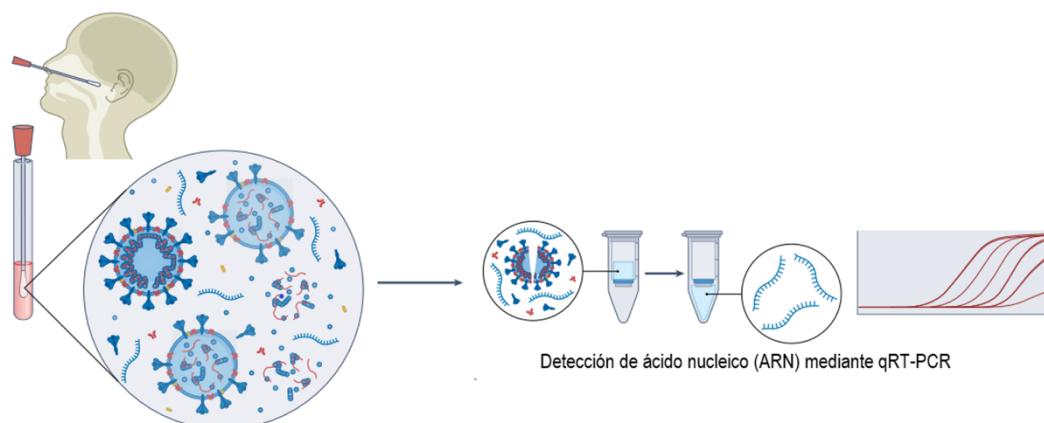


Figura I.3. Diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante qRT-PCR.

Otros métodos de diagnóstico consisten en la detección de proteínas virales (antígenos), mediante técnicas inmunológicas a través de una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral con el fin de detectar la presencia de la proteína N (nucleocápside) del SARS-CoV-2 en una muestra tomada de la nasofaringe del paciente (figura I.4).

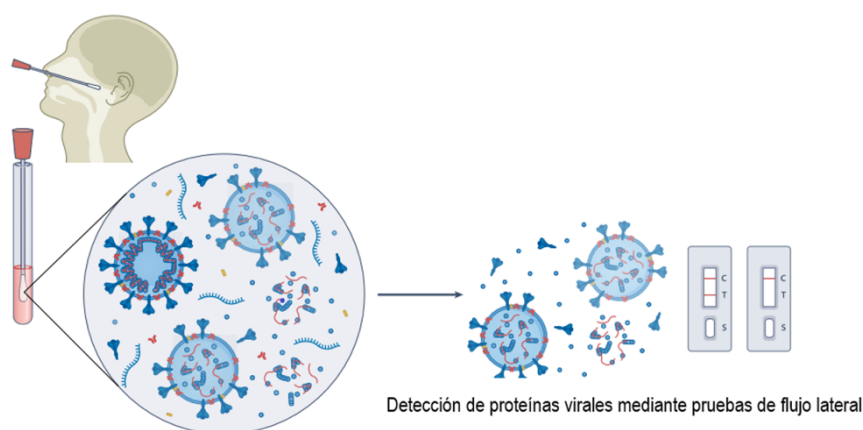


Figura I.4. Diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante prueba rápida de detección de antígenos.

Tras recoger la muestra respiratoria y aplicarla a la tira reactiva, el operador lee los resultados en un plazo de 10 a 30 minutos, con o sin ayuda de un instrumento lector, el cual ofrece la ventaja de estandarizar la interpretación de los resultados pero presenta el inconveniente de necesitar un equipo auxiliar. La mayoría de las pruebas rápidas de detección de antígeno (PRDA) fabricadas actualmente requieren muestras de hisopo nasal

o nasofaríngeo, no obstante, las distintas empresas están llevando a cabo estudios para evaluar el rendimiento de sus pruebas utilizando tipos de muestra alternativos para ampliar potencialmente las opciones de uso y facilitar la realización de pruebas seguras y eficientes. Sin embargo, la contrapartida de la simplicidad del funcionamiento de las PRDA es la disminución de la sensibilidad con respecto a las pruebas de biología molecular. La sensibilidad de las distintas PRDA en comparación con la qRT-PCR en muestras de las vías respiratorias superiores parece ser muy variable oscilando entre el 0-94% (54); en cambio, la especificidad ha demostrado ser sistemáticamente alta (>97%) (54). Se recomienda realizar validaciones emparejadas de pruebas de ácidos nucleicos y pruebas de antígeno mediante estudios clínicos con el fin de determinar cuáles de las pruebas de detección de antígenos en proceso de elaboración e incluso comercialización muestran resultados aceptables en estudios de campo representativos. En general, las recomendaciones establecidas por la OMS reconocen que estas pruebas deben cumplir unos requisitos mínimos de rendimiento que se basan en una sensibilidad $\geq 80\%$ y una especificidad $\geq 97\%$ en comparación con un ensayo de referencia de ácidos nucleicos. También recomiendan utilizarlas en aquellos casos en los que las pruebas de biología molecular no estén disponibles o en aquellos escenarios en los que los plazos prolongados de entrega impidan su utilidad clínica (54). De este modo, una vez los resultados sean aceptables, se pueden incluir estas pruebas de diagnóstico rápido en un algoritmo diagnóstico con el fin de reducir el número de pruebas moleculares contribuyendo así a una rápida identificación y gestión de los casos de COVID-19. Pese a la necesidad de realizar pruebas sobre el rendimiento en el mundo real y acerca de los aspectos operativos, se ha observado que la probabilidad de que las PRDA funcionen bien es más elevada en pacientes con cargas virales elevadas (valores de Ct ≤ 25 o $>10^6$ copias genómicas del virus/mL), en las fases presintomáticas y sintomáticas precoces (1-3 días antes de la aparición de los síntomas y durante los primeros 5 días de estos). De esta forma, las limitaciones que pueden presentar estas PRDA por tanto son la presencia de falsos negativos en aquellos pacientes que presenten >5-7 días desde el inicio de síntomas o cargas virales más bajas (54).

Por último, las pruebas serológicas del SARS-CoV-2 que detectan anticuerpos contra la proteína N o S podrían complementar el diagnóstico molecular, principalmente en fases tardías tras el inicio de la enfermedad o para estudios retrospectivos (55). No obstante, sigue sin conocerse al completo el alcance y la duración de las respuestas

inmunitarias; y las pruebas serológicas disponibles muestran diferencias en su sensibilidad y especificidad, lo cual debe tenerse en cuenta al decidir sobre las pruebas serológicas y la interpretación de sus resultados.

I.8. Carga viral

La carga viral de SARS-CoV-2, es decir, la cantidad de material genético del virus presente en una muestra biológica, ha demostrado una distribución extendida en diversas partes del cuerpo más allá del tracto respiratorio, detectándose a su vez ARN de SARS-CoV-2 en sangre periférica, heces, orina y secreciones oculares (56). El aislamiento del virus a partir de muestras no respiratorias no tuvo éxito en la mayoría de los estudios (56), habiéndose notificado muy pocos casos de presencia de virus infecciosos en muestras no respiratorias. Además, se observó que las cargas virales de las muestras del tracto respiratorio eran notablemente más elevadas que las de las muestras provenientes de otras localizaciones, lo que podría sugerir que la presencia de virus infeccioso en el resto de las zonas sería poco probable.

Como se ha mencionado en el apartado de diagnóstico (I.7), para diagnosticar la infección por SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio, se emplea la detección de ARN viral utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica permite cuantificar la cantidad de ARN viral presente en la muestra clínica (57). Los resultados se expresan como el número de copias de ARN viral por mililitro de medio de transporte viral o por hisopo, o mediante el valor del ciclo umbral específico de la prueba (Ct) (58). El valor de Ct (*cycle threshold*) está inversamente correlacionado con la concentración inicial de ARN viral en la muestra, es decir, a mayor valor de Ct, menor cantidad de ARN viral presente. Además, utilizando un estándar externo con un número definido de copias de ARN, los valores de Ct se pueden convertir en números absolutos de copias de ARN viral por mililitro, lo que proporciona una medida cuantitativa más precisa de la carga viral (59).

Si bien es cierto que en el contexto del estudio de la carga de ARN del SARS-CoV-2, las técnicas analíticas desempeñan un papel fundamental en la detección y cuantificación de este en muestras clínicas, estas técnicas no solo requieren una adecuada

extracción y amplificación del ARN viral, sino también la consideración de factores que pueden influir en la calidad de los resultados. Entre estos factores, la celularidad de la muestra y los controles de housekeeping son aspectos cruciales que garantizan la fiabilidad de los datos obtenidos. El término housekeeping hace referencia a genes que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento básico de una célula y que se expresan de manera constante en diferentes tipos celulares y condiciones ambientales. Estos genes desempeñan funciones fundamentales en procesos celulares como el metabolismo, la estructura celular y la regulación génica. Puesto que la presencia de células en las muestras puede afectar a la eficiencia de la extracción de ARN y la precisión de las mediciones de carga viral, en el ámbito de la investigación molecular, los genes housekeeping se utilizan como controles internos para validar y normalizar los resultados de la PCR. Un ejemplo de un gen housekeeping comúnmente utilizado en la PCR es la β -glucuronidasa (GUSB), que codifica una enzima involucrada en el metabolismo de carbohidratos en las células (60). La amplificación de ARN de β -glucuronidasa se emplea como control interno en ensayos de PCR para garantizar la calidad y consistencia de los resultados, verificando así la integridad de la muestra y la eficiencia de la reacción.

A pesar de que la qRT-PCR no puede determinar directamente la capacidad de infección del virus, puesto que es incapaz de diferenciar entre virus vivos, también llamados competentes para la replicación (infecciosos), y ARN viral residual (no infeccioso), se ha hallado una relación entre la cantidad de ARN viral y la presencia de virus infecciosos. La dosis infectiva se refiere a la cantidad de virus necesaria para establecer una infección en un huésped susceptible. Aunque la relación exacta entre la carga viral y la dosis infectiva del SARS-CoV-2 aún no se comprende completamente, se presume que existe una relación entre la carga viral en la muestra y la capacidad de transmitir la infección. Diversos estudios han tratado de establecer una correlación entre la cantidad de ARN viral y la capacidad de infección, observándose una disminución gradual en la probabilidad de aislar el virus a medida que aumentan los valores de Ct en muestras recogidas durante los primeros 8 días tras del inicio de los síntomas (59). En general, la evidencia sugiere que las personas con una carga viral más alta pueden tener una mayor capacidad de transmitir el virus a otros, lo que subraya la importancia de controlar y reducir la propagación de la enfermedad, especialmente en entornos donde la interacción entre individuos es frecuente.

En torno al inicio de los síntomas, la carga viral alcanza su punto máximo en el tracto respiratorio para posteriormente disminuir en un periodo variable de una a tres semanas, si bien la duración y magnitud de esta pueden variar entre pacientes. Por lo general, el ARN viral se vuelve indetectable en el tracto respiratorio superior aproximadamente dos semanas después del inicio de los síntomas. No obstante, no se comprende completamente la relación entre la detección de la carga viral y la infectividad, debido a que la presencia de ARN viral puede no representar un virus vivo y, por tanto, transmisible (61). La información sobre la transmisión en pacientes asintomáticos es limitada. Ciertos estudios sugieren que la transmisibilidad del virus es elevada cerca del inicio de los síntomas e incluso antes de su aparición (62), lo que se ha visto que sucede especialmente con la variante Ómicron. En un par de investigaciones, no se hallaron diferencias significativas en la carga viral entre pacientes sintomáticos y asintomáticos (63), por lo que todavía quedan preguntas importantes por responder sobre el momento y la duración de la infectividad en estos últimos (64).

Por todo ello, se ha observado que la detección de la carga viral es esencial para prevenir la posible transmisión de la infección. Es fundamental tener en cuenta que existen algunas variables que pueden influir tanto en la detección del ARN viral como en su utilidad, como son el medio de transporte utilizado para la muestra, las condiciones de almacenamiento y la calidad de la muestra; por lo que pueden causar ciertas limitaciones al extrapolar los resultados de la carga viral a la posible infectividad del virus (57).

I.9. Variantes

Se ha observado que la mayoría de las mutaciones virales tienen un impacto limitado en la capacidad de los virus para infectar, replicarse, escapar a la inmunidad del huésped y transmitirse; sin embargo, ciertas mutaciones pueden proporcionarles una ventaja competitiva y, a través de la selección natural, concederles la capacidad de convertirse en dominante. Muchas de las mutaciones observadas en las variantes del SARS-CoV-2 se encuentran en el RBD o en el dominio N-terminal de la proteína S, lo cual altera la estructura tridimensional de la proteína S. Estos cambios no solo pueden afectar a la capacidad de transmisión del virus, sino que también pueden permitirle escapar mejor de la respuesta inmunitaria, por ejemplo de los anticuerpos neutralizantes provocados por la administración de vacunas o la infección natural (28).

Desde que comenzó la pandemia por COVID-19, la OMS ha rastreado y vigilado las variantes del SARS-CoV-2 para identificar aquellas variantes de preocupación (VOC). A finales de 2019 apareció por primera vez en Wuhan (China) la cepa primaria del virus, también denominada cepa Wuhan-Hu-1, B.1 o cepa de tipo salvaje, la cual se propagó por todo el mundo en la primera oleada de infecciones (28). Sin embargo, el virus SARS-CoV-2 ha mutado en numerosas ocasiones, y las estimaciones sugieren que los linajes circulantes adquieren mutaciones nucleotídicas a un ritmo de entre una y dos mutaciones al mes (65). El método actual de identificación de variantes se basa en el uso de pruebas genómicas como la secuenciación completa del genoma, la secuenciación parcial del gen S o ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (66). A fecha de 25 de enero de 2022, la OMS informó de cinco variantes de preocupación (Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron), dos variantes de interés (Lambda y Mu) y tres variantes en seguimiento (pendientes de asignar) (28).

I.9.1. Variante Alfa B.1.1.7

La variante Alfa del SARS-CoV-2, perteneciente al linaje B.1.1.7, se documentó por primera vez en Reino Unido en septiembre de 2020 y se clasificó como variante preocupante el 18 de diciembre del mismo año (66). Esta variante presenta mutaciones en la proteína S que podrían tener efectos biológicos potenciales (68). En primer lugar, presenta la mutación N501Y, la cual aumenta la afinidad de unión del RBD al receptor ACE2 (69); y la mutación P681H situada en el sitio de escisión de furina 682-685, adyacente a los dominios S1 y S2 (70), que favorece que este sea menos ácido, provocando que se reconozca y escinda con mayor eficacia (71). El sitio de escisión de furina S1/S2 favorece la entrada en las células epiteliales respiratorias y determina en parte la transmisibilidad del virus. Esta variante posee a su vez una mutación D614G, dentro del sitio de escisión de furina S1/S2, aumentando la afinidad de unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 así como la infectividad (72). Existen otras mutaciones dentro de esta variante que aumentan la capacidad del virus para escapar a la detección de anticuerpos, como la delección de dos aminoácidos en los sitios 69-70 en el dominio N-terminal de la proteína S (73).

La variante Alfa se ha relacionado con un aumento del 50-70% respecto a la transmisibilidad y con un riesgo entre un 30-60% mayor de ingreso hospitalario y muerte

en comparación con la cepa primaria (74). Por otro lado, se descubrió que la variante alfa tenía un impacto mínimo en la eficacia de las vacunas actuales (75) mientras que el riesgo de reinfección seguía siendo similar para esta variante que para las anteriores (76).

I.9.2. Variante Delta B.1.617.2

La variante Delta, del linaje B.1.617.2, se documentó por primera vez en la India en octubre de 2020 y se clasificó como variante de preocupación el 11 de mayo de 2021 (77). Las mutaciones en la proteína S, P681R y D614G, afectan de forma similar a su afinidad de unión al receptor ACE2 y a su transmisibilidad (78-80). A diferencia de la mutación E484K observada en variantes anteriores, la variante Delta contiene la mutación E484Q, que junto con una mutación L452R también localizada dentro del RBD, causa una afinidad significativamente mayor por el receptor ACE2 que la cepa primaria o la mutación E484K sola (81). Por último, esta variante contiene la mutación T478K, situada en la interfaz entre la proteína S y el receptor ACE2 cuando se une, aumentando así el potencial electrostático de la proteína S y mejorando la afinidad de unión (82).

Las mutaciones presentes en la variante Delta mejoraron la transmisibilidad del virus como resultado de una mayor afinidad de unión al receptor ACE2 (83), por lo que la variante Delta se convirtió rápidamente en la variante dominante en países como el Reino Unido (84), Estados Unidos (85), Europa y finalmente en todo el mundo (86). Se ha observado que escapa mejor a la neutralización (87) y se ha asociado a una mayor gravedad de la enfermedad, así como a un mayor riesgo de ingreso hospitalario en comparación con la infección por la variante alfa (88).

I.9.3. Variante Ómicron B.1.1.529

La variante Ómicron pertenece al linaje B.1.1.529. Se descubrió por primera vez en noviembre de 2021 en Sudáfrica y Botsuana antes de detectarse en múltiples países y se clasificó como variante de preocupación el 26 de noviembre de 2021 (77). Ómicron tiene siete deleciones de aminoácidos en el dominio N-terminal de S y aproximadamente 30 sustituciones en el dominio de unión al receptor S, algunas de las cuales están implicadas de forma crítica en la unión de anticuerpos neutralizantes (89). En la **tabla I.1.** se

muestran aquellas mutaciones que tienen lugar en la proteína S del SARS-CoV-2 y que presentan un impacto potencial en la transmisibilidad del virus.

Tabla I.1. Supresiones, inserciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 de las variantes Delta (B.1.617) y Ómicron (B.1.1.527) con impacto potencial en la transmisibilidad del virus.

Variante Ómicron (B.1.1.527)	Variante Delta (B.1.617)
A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, Δ212, ins215EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	L452R, T478K, D614G, P681R

De las más de 30 mutaciones en la proteína S (90), 23 habían sido identificadas con anterioridad, incluidas K417N, T478K, E484A, D614G, H655Y, P681H y N501Y (91). 15 mutaciones de Ómicron están contenidas dentro del RBD (92), lo que confiere a esta variante una afinidad de unión significativamente mayor al receptor ACE2 (91). Además, diversas mutaciones únicas en el RBD de la variante Ómicron deterioran la eficacia de los anticuerpos neutralizantes, incluyendo K417N, N440K, G446S, E484A, Q493R, G496S, G339D, S371L, y S375F (92).

La aparición de Ómicron ha ido seguida de un aumento de las infecciones en todo el mundo. Aunque parece manifestarse en forma de enfermedad leve, un elevado número de infecciones podría seguir dando lugar a altas tasas de ingreso hospitalario y muerte en aquellos individuos vulnerables al virus (28). Las mutaciones en la variante Ómicron, las cuales mejoran su afinidad de unión (91) y su capacidad para escapar a los anticuerpos neutralizantes (92) probablemente impulsaron su rápida propagación, al igual que su rápida tasa de replicación (unas 70 veces más rápida que la de las cepas Delta y primaria) (93). A su vez, se ha observado una tasa de reinfección de la variante Ómicron más de diez veces superior a la de las variantes anteriores en estudios realizados (94).

La variante Ómicron original se denomina BA.1 debido a la detección de varias subvariantes de la variante en circulación. La aparición de BA.1 se correspondió con un oleada de infecciones por SARS-CoV-2 en todo el mundo dada su mayor transmisibilidad y mayor riesgo de reinfección respecto a las variantes anteriores (95), no obstante coincidió en el tiempo con la circulación de las subvariantes BA.2 y BA.3, siendo posteriormente BA.2 la responsable de un número cada vez mayor de los casos notificados (96).

I.10. Tratamiento

Desde el principio de la pandemia, el tratamiento y manejo del COVID-19 ha experimentado cambios significativos a medida que se ha aprendido más sobre el propio SARS-CoV-2, de forma que las autoridades sanitarias se han visto obligadas a actualizar y publicar las guías y recomendaciones para abordar la enfermedad (28). En un principio se centró en el alivio de los síntomas y el apoyo a las funciones vitales de los pacientes, lo que no resultó ser suficiente en aquellos con una presentación clínica más grave, motivo por el cual se tuvo que recurrir a otro tipo de tratamientos, entre los que 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 (97).

Actualmente, el tratamiento se pauta en función de la gravedad inicial del cuadro clínico, la probabilidad de que la enfermedad progrese (en relación con el estado vacunal, comorbilidades o inmunodepresión), el tiempo de evolución y las posibles complicaciones. De modo que puede incluir: tratamiento sintomático, tratamiento antiviral, bloqueo de la respuesta inflamatoria, oxigenoterapia, anticoagulación profiláctica y tratamiento de las posibles complicaciones (25).

El tratamiento en el COVID-19 leve se dirige principalmente al alivio sintomático mediante antipiréticos, analgésicos y/o antitusivos según las necesidades del paciente. Sin embargo, existen casos en los que la terapia antiviral con el remdesivir puede resultar beneficiosa. El remdesivir es un antiviral que actúa como inhibidor de la ARN polimerasa dependiente del ARN viral con actividad inhibitoria in vitro contra el SARS-CoV y el MERS-CoV. En estos casos se observó tras su uso una mejora de los resultados clínicos y una reducción de la mortalidad, por lo que fue identificado tempranamente como un

candidato terapéutico prometedor para el COVID-19 debido a su capacidad para inhibir el SARS-CoV-2 in vitro (97). De este modo se vio, que empleado en pacientes seleccionados, podía reducir la duración de los síntomas y el tiempo de recuperación, minimizar el contagio, evitar la progresión de la gravedad así como disminuir las necesidades de oxígeno. Por lo que el tratamiento con remdesivir no solo fue capaz de reducir la carga de la enfermedad, sino que también pudo disminuir el uso de los escasos recursos sanitarios durante la pandemia (97). Incluso se advirtió que la mejora en la recuperación persistió cuando se realizó un ajuste por el uso de glucocorticoides, lo que sugiere que el beneficio de la dexametasona, como se mostró en el ensayo *Randomized Evaluation of Covid-19 Therapy* (RECOVERY) puede ser aditivo al del remdesivir (98). En general, los pacientes que mantienen una sintomatología leve a lo largo de todo el episodio de COVID-19, presentan un pronóstico y una recuperación excelentes (95).

Por otro lado, cuando existe ya afectación pulmonar, hablamos de un COVID-19 moderado o grave, por lo que el tratamiento sintomático quedaría relegado para casos puntuales en los que no se requiriese hospitalización. Sin embargo, en estas fases de la enfermedad la mayoría de los pacientes suelen requerir ingreso para su observación y tratamiento. Este consistiría principalmente en medidas de apoyo y en el uso de terapias antivirales disponibles, como el remdesivir. En los escenarios más graves, en los que además sobreviene la hipoxia y se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica, la terapia depende del uso de agentes inmunomoduladores para reducir la inflamación sistémica antes de que se provoque una disfunción multiorgánica. En estos casos el uso de corticoides, que ayudan a reducir el estado hiperinflamatorio de estos pacientes, puede estar justificado junto con el uso de anticuerpos monoclonales como tocilizumab (inhibidor de IL-6) o anakinra (antagonista del receptor de IL-1) (33). La inmunoglobulina intravenosa también puede desempeñar un papel en la modulación de un sistema inmunitario que se encuentra en un estado de inflamación sistémica reduciendo la gravedad del cuadro. En general, el pronóstico y la recuperación de estos pacientes con una presentación crítica de la enfermedad son malos, por lo que una actuación rápida puede tener un alto impacto de cara a la mortalidad y/o calidad de vida de los pacientes (99).

No obstante, desde un primer momento debido a la necesidad de frenar el avance de la pandemia, se desarrollaron y autorizaron varias vacunas para prevenir la infección

por COVID-19, lo que cambió drásticamente el panorama, pues estas vacunas demostraron ser eficaces para prevenir presentaciones graves de la enfermedad y reducir la propagación del virus. Por lo que podríamos decir que el enfoque abarca desde el manejo sintomático hasta la prevención mediante vacunas y el desarrollo de tratamientos específicos para combatir el virus. Es de especial relevancia considerar la constante evolución de la pandemia, de modo que los protocolos y las recomendaciones de tratamiento se deben actualizar constantemente. Las autoridades sanitarias, como la OMS, el ECDC, los Institutos Nacionales de Salud y los CDC de los Estados Unidos, ofrecen orientación y actualizan periódicamente las pautas y recomendaciones para el tratamiento y manejo del COVID-19 (28).

I.11. Vacunación

El desarrollo de vacunas contra el COVID-19 ha sido un hito crucial en la lucha global contra la pandemia, debido a que esta amenaza microbiológica impulsó una rápida búsqueda internacional de vacunas seguras y eficaces contra el virus SARS-CoV-2 (28). Su importancia trasciende la mera profilaxis individual, ya que estas intervenciones farmacológicas representan un paradigma en la inmunización colectiva y la contención de la propagación viral. En consonancia con el desarrollo de vacunas anteriores, tanto para el SARS-CoV como para el MERS-CoV, la proteína S fue un objetivo clave para el desarrollo de la vacuna contra el COVID-19 (100). Numerosos estudios han explorado la eficacia de las vacunas aprobadas; sin embargo, se reportan grandes variaciones en la eficacia de estas. Esta variabilidad se debe probablemente a varios factores de los estudios, como el país, la fecha en la que se detecte el caso y el tamaño de la población del estudio, así como a las variantes del SARS-CoV-2 que circulaban durante el periodo de estudio. Estos factores, junto con la forma en que se comunica la eficacia, hacen que sea difícil comparar las vacunas y comprender plenamente la eficacia de cada una de ellas (28).

En este contexto, resulta fundamental examinar de cerca la innovadora tecnología del ARNm y su aplicación en las vacunas contra el COVID-19, así como comprender la relevancia y el impacto de estas vacunas en el contexto nacional. Las vacunas de ARNm se han revelado como una poderosa alternativa a las vacunas convencionales tradicionales por su elevada potencia, seguridad y eficacia, su capacidad para un rápido desarrollo

clínico y su potencial para una fabricación rápida y de bajo coste (101). La eficacia de esta tecnología de vacunas se puso de manifiesto cuando Pfizer-BioNTech desarrolló y aprobó vacunas de ARNm contra la pandemia de COVID-19, puesto que se desarrollaron en un tiempo récord, menos de un año después de que el mundo se viera afectado por la pandemia por COVID-19. Esta tecnología se basa en la capacidad del ARNm para transmitir instrucciones genéticas a las células del cuerpo humano, lo que desencadena la producción de proteínas específicas. En el caso de las vacunas contra el COVID-19, el ARNm utilizado contiene información genética para producir la proteína S del virus SARS-CoV-2. Una vez que se administra la vacuna, las células del cuerpo utilizan este ARNm como una plantilla para producir la proteína S viral, la cual se presenta en la superficie de las células, lo que desencadena una respuesta inmune adaptativa. El sistema inmunológico reconoce la proteína S como extraña y produce anticuerpos específicos y células T que pueden reconocer y atacar al virus real si el individuo se expone posteriormente. Además, las vacunas de ARNm no contienen el virus vivo ni partes del virus, lo que las hace seguras y altamente efectivas en la prevención de la enfermedad. Su aplicación en el contexto nacional ha sido fundamental para contener la propagación del virus y mitigar el impacto de la pandemia en la salud pública y la economía. Este desarrollo sin precedentes de Comirnaty® (Pfizer-BioNTech) y Spikevax® (Moderna) y su vacunación generalizada a millones de personas ayudó a controlar la crisis sanitaria mundial provocada por el COVID-19. Hasta la fecha, diferentes vacunas contra el COVID-19 han sido desarrolladas y autorizadas para su uso en diferentes partes del mundo. A continuación se detallan las que han tenido una mayor relevancia en nuestro país.

I.11.1. BNT162b2 (Pfizer-BioNtech)

La vacuna BNT162b2 (Comirnaty) es una vacuna de ARNm modificado con nucleósidos, que codifica una proteína S modificada del SARS-CoV-2 y que se desarrolló mediante un esfuerzo de colaboración entre Pfizer (Nueva York, EE. UU.) y BioNTech (Mainz, Alemania) (17). La vacuna fue incluida en la lista de la OMS para uso de emergencia el 31 de diciembre de 2020 (77) y, a fecha de 24 de enero de 2022, se ha aprobado su uso en 136 países (102). Es una vacuna bien tolerada por la población a la que va dirigida. Por lo general, se han notificado reacciones leves como enrojecimiento e hinchazón en el lugar de la inyección (reacción a la vacunación en general más

comúnmente notificada) (103). Otras reacciones menos frecuentes son fatiga, dolor muscular, dolor de cabeza, escalofríos y aún con menor frecuencia reacciones alérgicas o anafilaxia (104). Además, en un estudio llevado a cabo por Barda et al. en el que evaluaron la seguridad de la vacuna comparado con un grupo control, informaron acerca de que la BNT162b2 se asociaba con un mayor riesgo de miocarditis, linfadenopatía, apendicitis e infección por herpes zóster (105).

I.11.2. ARNm-1273 (Moderna)

La vacuna ARNm-1273 (Spikevax) desarrollada por Moderna (MA, EE.UU.) es una vacuna de ARNm encapsulado en nanopartículas lipídicas que expresa la proteína S del SARS-CoV-2, estabilizada antes de la fusión (106). Obtuvo la aprobación de la OMS para su inclusión en la lista de uso de emergencia el 30 de abril de 2021 (77), y desde el 24 de enero de 2022, ha sido aprobada para su uso en 85 países (102). Los efectos adversos más comúnmente informados fueron fatiga, dolor muscular, dolor de cabeza, escalofríos, dolor articular y dolor/reacción en el lugar de la inyección (104, 106). Las reacciones adversas graves, como la reacción alérgica y la anafilaxia, son raras aunque no inconcebibles (104).

I.11.3. ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca)

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222, Vaxzevria) consiste en un vector no replicante del adenovirus de chimpancé ChAdOx1, modificado para codificar la proteína S del SARS-CoV-2 (107). Fue desarrollada mediante la colaboración entre la Universidad de Oxford y AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido), incluida en la lista de la OMS para uso de emergencia el 16 de febrero de 2021 (77), y aprobada para su uso en 137 países, a fecha de 24 de enero de 2022 (102). En cuanto a las posibles reacciones adversas, las más comunes fueron: a nivel local el picor leve y moderado, el dolor, el enrojecimiento, la hinchazón, la sensibilidad y el calor; mientras que a nivel sistémico predominaron los escalofríos, la fatiga, la fiebre, el dolor de cabeza, el dolor muscular y las náuseas (108). No obstante, otros síntomas informados, aunque con poca frecuencia, fueron dolor torácico intenso, hemorragia nasal y reacciones alérgicas (109).

I.11.4. 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 SARS-CoV-2 en una conformación estabilizada previa a la fusión y que sólo requiere una dosis (110). Este vector fue desarrollado a partir del adenovirus humano recombinante de tipo 26 por la empresa farmacéutica Janssen Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ, EE. UU.) (110), y fue incluido en la lista de la OMS para uso de emergencia el 12 de marzo de 2021 (77). A fecha de 24 de enero de 2022, se ha aprobado el uso de Ad26.COV.2.S en 106 países (102). Por lo general, la vacuna Ad26.COV.2.S es segura y bien tolerada. No obstante, las reacciones sistémicas más comunes tras la vacunación fueron el dolor de cabeza, la fatiga y la mialgia, mientras que el dolor en el lugar de la inyección fue la reacción local más común (110). Al igual que otras vacunas, Ad26.COV.2.S se ha asociado a acontecimientos adversos graves, aunque poco frecuentes, como reacciones alérgicas y trombosis del seno venoso cerebral (104, 111).

Hipótesis

II. HIPÓTESIS

La dinámica de la carga viral de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior es un tema crucial en la lucha contra la pandemia de COVID-19. En este contexto, se plantea la siguiente hipótesis: la magnitud de la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior podría diferir según la variante del SARS-CoV-2 y el tiempo transcurrido tras la vacunación.

Considerando la rápida evolución de la pandemia y la introducción de la vacunación masiva, es necesario investigar cómo estos factores pueden afectar a la carga viral en el tracto respiratorio superior. Los hallazgos de este estudio podrían tener implicaciones significativas para la práctica clínica y la salud pública, pudiendo así ayudar en la toma de decisiones relacionadas con el manejo de casos, la implementación de políticas de prevención y la estrategia de vacunación, lo que a su vez podría contribuir a reducir la propagación del virus y mitigar el impacto de la pandemia en la población.

Objetivos

III. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral incluye cuatro objetivos principales:

III.1. Estudiar el impacto del tiempo transcurrido desde la vacunación completa contra el COVID-19 en la magnitud y la dinámica de descenso de la carga de ARN de la variante Delta (B.1.617) en el tracto respiratorio superior.

Existen estudios como el publicado por Teyssou et al. (112) en el que se mostraban diferencias sustanciales entre las cargas de ARN de las variantes de preocupación del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior (TRS).

Con respecto a la variante Delta, se informó una tendencia hacia cargas virales más altas en individuos con COVID-19 no vacunados en comparación con aquellos vacunados con una variedad de vacunas COVID-19 (113). Varios estudios coinciden en que, aunque las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de personas con infección por la variante Delta son comparables a las encontradas en personas infectadas no vacunadas, la eliminación del ARN viral parece ocurrir a un ritmo más rápido en los primeros sujetos (114-117).

Sin embargo, los análisis en estos estudios no se estratificaron por el tiempo transcurrido desde la vacunación completa contra el COVID-19 (114-116) o el estado clínico (asintomático frente a sintomático) en el momento del diagnóstico por PCR a tiempo real (RT-PCR) (114-117).

Por ese motivo, nos planteamos agregar matices a la suposición mencionada con anterioridad y demostrar que entre los pacientes con COVID-19, tanto la magnitud como la dinámica de descenso de la carga de ARN de la variante Delta en el tracto respiratorio superior se ven notablemente afectadas por el tiempo transcurrido desde la vacunación completa contra el COVID-19.

III.2. Evaluar el rendimiento clínico del dispositivo de prueba rápida de detección de antígenos Panbio™ COVID-19 en muestras nasofaríngeas para el diagnóstico de la variante Ómicron (B.1.1.529) del COVID-19.

Las pruebas rápidas de detección de antígenos (PRDA) dirigidas a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2, que muestran una sensibilidad superior al 80%, han demostrado ser útiles para el diagnóstico precoz de la infección por SARS-CoV-2 en individuos sintomáticos (118).

Estas PRDA se optimizaron para la detección de la variante ancestral Wuhan-Hu-1, y la aparición de las variantes del SARS-CoV-2, que incorporan mutaciones no sinónimas dentro de la secuencia de aminoácidos de la nucleocápside, puede afectar a la eficiencia diagnóstica de las PRDA; por tanto, como señalaron Kontogianni et al. en un estudio publicado recientemente en el *Journal of Infection* (119), los ensayos mediante PRDA deben evaluarse por su rendimiento en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 debida a las variantes correspondientes.

En este contexto, dos estudios (120-121) mostraron que el dispositivo de prueba rápida Panbio™ para la detección del Ag COVID-19 (Abbott Diagnostic GmbH, Jena, Alemania) tenía una menor sensibilidad para la detección de la variante alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2 en comparación a los linajes no alfa.

Como en muchos otros países, la variante Ómicron del SARS-CoV-2 ha superado a la variante Delta y actualmente domina en España. Se ha sugerido que las PRDA pueden ser menos sensibles para detectar la variante Ómicron (122), pero esta suposición no está respaldada por estudios de rendimiento de las PRDA en la vida real. Por ello, nos planteamos realizar un estudio prospectivo en centros de salud de atención primaria para evaluar el rendimiento clínico del dispositivo de prueba rápida de antígenos Panbio™ COVID-19 en muestras nasofaríngeas realizadas en el punto de atención para el diagnóstico de la variante Ómicron del COVID-19.

III.3. Comparar la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 y BA.2.

La variante Ómicron del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) comprende actualmente cinco subvariantes conocidas como BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5 (123). En febrero de 2022 se produjo un rápido aumento de Ómicron BA.2 en España. Desde entonces, esta subvariante ha superado a Ómicron BA.1 convirtiéndose en la predominante en mayo de 2022 (124).

Los datos de vigilancia mundial sugieren claramente una mayor transmisibilidad de BA.2 en comparación con BA.1 (125-127), aunque las razones de la actual dominancia de BA.2 aún no se han establecido firmemente. Los datos han demostrado que todas las subvariantes de Ómicron, incluida BA.2, son neutralizadas de forma comparable por los sueros de los pacientes de Ómicron (127), y que se obtienen títulos similares de anticuerpos neutralizantes contra BA.2 y BA.1 en personas vacunadas con ARN mensajero (ARNm) reforzado (128). Esto apoya la idea de que la rápida propagación de BA.2 está relacionada con una mayor transmisibilidad más que con un mayor escape inmunológico, lo que encaja con un modelo de tipo infeccioso susceptible y recuperado (129).

El aumento de la carga vírica en el tracto respiratorio superior (TRS) tras la irrupción de la infección por BA.2 puede explicar en parte su mayor transmisibilidad en comparación con BA.1; no obstante, los pocos estudios que han abordado esta cuestión han arrojado resultados contradictorios (130-133).

De este modo, nos planteamos comparar la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 y BA.2.

III.4. Comparar la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las variantes Delta (B.1.617) y Ómicron (B.1.1.529).

La nueva variante del SARS-CoV-2, Ómicron (BA.1.1.529), se notificó por primera vez en Sudáfrica en noviembre de 2021 (134) y desde entonces se ha propagado rápidamente debido a su aparente mayor transmisibilidad (135-136) hasta convertirse en dominante en muchos países.

La evasión de los anticuerpos neutralizantes que se unen a la proteína S provocada durante las infecciones naturales o después de la vacunación puede explicar la ventaja de transmisión de la variante Ómicron sobre la variante Delta (137-141). Sin embargo, una mayor eficiencia de replicación en el tracto respiratorio superior, que podría traducirse en mayores cargas virales, también puede contribuir a una mayor transmisibilidad; de hecho, la variante Ómicron se caracteriza por un total de diez sustituciones de aminoácidos localizadas dentro del motivo de unión al receptor, que pueden afectar a la afinidad del SARS-CoV-2 por el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (142-144).

Anteriormente demostramos que el tiempo transcurrido desde la vacunación ejerce un impacto importante en la magnitud de las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes con la variante Delta (145). Se hizo una observación similar para la variante Ómicron (146).

En este trabajo, nos propusimos comparar las cargas de ARN del SARS-CoV-2 y del virus potencialmente infeccioso en muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por la variante Delta y las de muestras recogidas de pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por la variante Ómicron. Esta última se detectó mediante el ensayo de viabilidad de transcripción inversa RT-PCR, que puede discriminar entre partículas víricas potencialmente infecciosas y ARN vírico libre (encapsulado) (147).

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Pacientes

Los diferentes estudios, todos de naturaleza observacional retrospectiva a excepción del segundo trabajo (de Michelena. J Infect. 2022) que fue también observacional pero prospectivo, incluyeron cohortes de pacientes que obtuvieron resultados positivos en la prueba qRT-PCR para la detección de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudados nasofaríngeos (ENF), entre los años 2021 y 2022; excepto el segundo trabajo que incluye 90 pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 pero con resultado finalmente negativo. Los pacientes procedían de centros de atención primaria del Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa y del Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Todos ellos presentaban síntomas en el momento de la toma de muestra, así como la pauta completa de vacunación establecida entonces según las características de cada paciente, a excepción del segundo trabajo (de Michelena J Infect 2022), en el cual fueron 228 de 244 pacientes los que presentaron dicha pauta completa.

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.º pacientes	Fecha del episodio
1-de Michelena. J Infect. 2022.	Observacional retrospectivo	HCUV	107	Mayo a agosto de 2021
2-de Michelena. J Infect. 2022.	Observacional prospectivo	HCUV	244	Enero de 2022
3-de Michelena. J Med Virol. 2022.	Observacional retrospectivo	HCUV	277	Febrero a marzo de 2022
4-de Michelena. Clin Microbiol Infect. 2023.	Observacional retrospectivo	HCUV	240	Septiembre de 2021 a febrero 2022

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. Impacto en la carga de ARN del SARS-CoV-2 del tiempo transcurrido desde la vacunación completa hasta la infección por la variante Delta del COVID-19 (Artículo I)

Características de los pacientes: este estudio incluyó a 107 participantes (60 hombres y 57 mujeres) con resultado positivo en la prueba de qRT-PCR para detectar ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudado nasofaríngeo, en el periodo comprendido entre mayo y agosto de 2021. Los participantes fueron pacientes con presencia de síntomas en los 4 primeros días previos a la toma de la muestra del exudado nasofaríngeo que desarrollaron enfermedad por COVID-19 con una mediana de 65 días (rango, 17-199) tras la finalización de la pauta completa de vacunación.

Los síntomas recogidos en general incluyeron fiebre, tos seca, rinorrea, disnea, mialgia, fatiga, anosmia, ageusia, odinofagia, diarrea, conjuntivitis y cefalea. A su vez, consideramos que recibieron la pauta de vacunación completa aquellos pacientes cuya última dosis de la vacuna empleada hubiese sido administrada al menos 15 días previos a la toma de la muestra. Los 107 participantes (rango de edad de 50 a 94 años) fueron muestreados en el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valencia y en centros de atención primaria en el Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa en Valencia, España. Del total de pacientes, 73 recibieron la vacuna Comirnaty® (Pfizer/BioNTech), 13 Spikevax® (Moderna), 12 Vaxzevria® (AstraZeneca) y 9 la vacuna contra el COVID-19 de Janssen.

IV.1.2. Rendimiento en la vida real de una prueba rápida de detección de antígenos COVID-19 dirigida a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 para el diagnóstico de COVID-19 debido a la variante Ómicron (Artículo II)

Características de los pacientes: este trabajo reclutó 244 pacientes consecutivos (mediana de edad, 40 años; intervalo, 2-96; 141 mujeres) con sospecha clínica de COVID-19, 232 de los cuales eran adultos (mediana de edad, 41 años; intervalo, 17-96) y 12 niños (mediana de edad, 15 años; intervalo, 2-16), que acudieron a tres centros de atención primaria seleccionados aleatoriamente y adscritos al Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa de Valencia (España) entre el 10 y el 21 de enero de 2022. Sólo se incluyeron pacientes con síntomas desarrollados en los 5 días previos a la toma de la muestra. Cabe destacar que 228 pacientes habían sido completamente vacunados (dos dosis) con vacunas COVID-19 autorizadas antes del reclutamiento y 222 no tenían registros históricos de infección previa por SARS-CoV-2 en el momento de la inscripción. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación INCLIVA del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). Dado que la estrategia de análisis se consideró práctica clínica habitual según las autoridades sanitarias locales, este comité renunció al consentimiento informado por escrito.

IV.1.3. Carga de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes ambulatorios afectados por el brote de COVID-19 debido a Ómicron BA.1 y BA.2 (Artículo III)

Características de los pacientes: este estudio reclutó una muestra por conveniencia de 277 pacientes ambulatorios (170 mujeres/107 varones) con COVID-19 ($n = 130$ por BA.1 y $n = 147$ por BA.2), con una mediana de edad de 48 años (rango, 12-97) y atendidos en el Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa entre el 1 de febrero y el 23 de marzo de 2022. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de INCLIVA y se renunció a la solicitud del consentimiento informado debido a su carácter retrospectivo.

IV.1.4. Cargas de ARN del SARS-Cov-2 en pacientes con infección por COVID-19 causada por las variantes Delta y Ómicron (Artículo IV)

Características de los pacientes: el estudio incluyó 240 pacientes ambulatorios adultos consecutivos (edad ≥ 16 años) que acudieron al Departamento de Salud del Clínico-Malvarrosa (Valencia, España) entre septiembre de 2021 y febrero de 2022, de los cuales 121 (74 mujeres; mediana de edad, 40 años; rango, 16-101 años) y 119 (65 mujeres; mediana de edad, 48; rango, 16-89 años) desarrollaron infección sintomática por SARS-CoV-2 debida a las variantes Ómicron y Delta, respectivamente. La infección sintomática se definió como aquella que se desarrollaba al menos 15 días después de recibir la última dosis de vacunación. Para establecer el tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas (cualquiera de ellos) se utilizaron datos relativos a signos o síntomas potencialmente asociados al COVID-19, como fiebre, tos, rinorrea, odinofagia, cefalea, mialgia, disnea, ageusia y anosmia, obtenidos de las historias clínicas de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico de Valencia (2021/165), y se renunció al consentimiento informado por su carácter retrospectivo.

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 (DeltaSwab Virus, Deltalab, Barcelona, España).

En el caso del segundo trabajo (de Michelena. J Infect. 2022), se recogieron dos muestras nasofaríngeas por paciente, uno de los cuales (proporcionado por el fabricante) se utilizó para la PRDA, mientras que el otro se colocó, al igual que para el resto de los estudios, en 3 ml de medio de transporte universal (DeltaSwab Virus, Deltalab, Barcelona, España) y se entregó al Servicio de Microbiología del HCUV para la prueba RT-PCR. La PRDA se realizó inmediatamente después de la toma de muestras siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.3. Detección del ARN del SARS-CoV-2 en muestras de exudado nasofaríngeo mediante qRT-PCR

Para la extracción del ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas se utilizó el kit Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation acoplado al instrumento automatizado Thermo Scientific™ KingFisher Flex (148). Para la amplificación del ARN del SARS-CoV-2 se empleó el kit TaqPath COVID-19 Combo (Thermo Fisher Scientific, MS, EE. UU.) dirigido a los genes ORF1ab, N y S del SARS-CoV-2, utilizando el termociclador de tipo QS5 de Applied Biosystems (**figura IV.1**).

Con el fin de cuantificar la carga viral, se incluyó el control AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 (Viracell SA, Granada, España). Este control se utilizó para calcular la CV de ARN del SARS-CoV-2, expresada en copias/ml y se tomó como referencia el Ct de RT-PCR para el gen N.

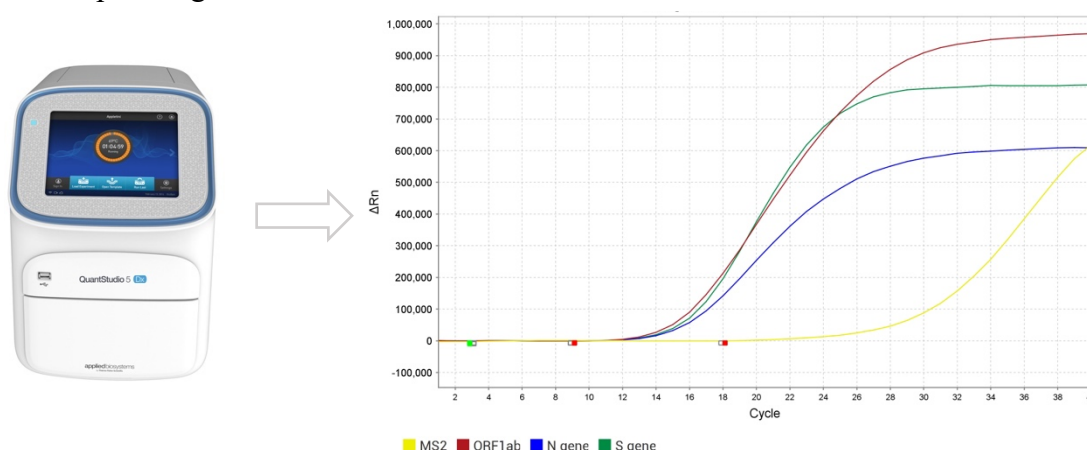


Figura IV.1. Curva de amplificación positiva para los genes N, S y ORF1ab del SARS-CoV-2 obtenidas mediante qRT-PCR por el QuantStudio5.

IV.4. Detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo mediante la prueba rápida de detección de antígenos

Para el segundo trabajo (de Michelena, J Infect. 2022), se utilizó el dispositivo de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIC) Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Abbott Diagnostic GmbH, Jena, Alemania) para la detección del antígeno de COVID-19 en muestras nasofaríngeas. Se siguieron las recomendaciones del fabricante tanto para el almacenamiento del dispositivo como para la realización e interpretación de los

resultados, garantizando así la integridad del reactivo y la validez de los resultados. Este procedimiento consiste brevemente en obtener una muestra de la nasofaringe del paciente mediante una torunda, la cual se homogeniza en el líquido de reacción durante unos segundos para posteriormente, mediante un envase cuentagotas, añadir de 3 a 5 gotas de la muestra en el pocillo de reacción del dispositivo inmunocromatográfico. Una vez transcurridos 15 minutos, se puede leer el resultado.

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

En el tercer trabajo (de Michelena. J Med Virol. 2022.), se empleó la amplificación del gen de mantenimiento de la β -glucuronidasa (GUSB) para evaluar la celularidad de las muestras seleccionadas, siguiendo un protocolo previamente publicado (60). 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 primer trabajo (de Michelena. J Infect. 2022.), la implicación de la variante Delta se documentó mediante secuenciación del genoma completo o RT-PCR específica de la variante (SARS-CoV-2 PCR variant, Ascires, Sistemas Genómicos, Valencia, España). Durante el periodo de estudio del segundo y cuarto trabajo (de Michelena. J Infect. 2022, de Michelena. Clin Microbiol Infect. 2023), la variante Ómicron se identificó utilizando la secuenciación del genoma completo o bien se dedujo basándose en el fallo de la diana del gen S en la RT-PCR utilizando el kit Thermo Fisher. Para el tercer trabajo (de Michelena. J Med Virol. 2022), las subvariantes de Ómicron se identificaron basándose en los perfiles de detección de fallo de diana del gen S (SGTF) y no SGTF de TaqPath para BA.1 y BA.2, respectivamente. Este criterio discriminatorio demostró una precisión del 100% mediante secuenciación del genoma completo (no mostrado) en 149 especímenes (BA.1, n = 101; BA.2, n = 48).

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

En el cuarto artículo (de Michelena. Clin Microbiol Infect. 2023), se empleó un protocolo previamente publicado (147). Brevemente, 300 µl de muestras nasofaríngeas se pretrataron o se sometieron a un tratamiento simulado con cloruro de platino 2,5 mM, que impide la amplificación del ARN viral descubierto en ADN en tubos LoBind (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital (150 rpm). El ARN viral se extrajo utilizando la plataforma KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) y se detectó mediante RT-PCR cuantitativa, dirigida a la secuencia del gen de la nucleocápside (N). Cada ensayo de RT-PCR cuantitativa se realizó por duplicado e incluyó agua libre de nucleasas como control negativo. Los datos se presentan como la relación de los umbrales de ciclo (Ct) de la RT-PCR para el amplicón N devuelto por los especímenes pretratados o no tratados.

IV.8. 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 demografía, la presencia o ausencia de síntomas de COVID-19 y la fecha de inicio de estos, el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la realización de la RT-PCR, el estado de vacunación, el tiempo transcurrido hasta completar la pauta de vacunación, carga viral (en Ct y en copias/ml), variante, ingreso, éxitus y episodios previos de infección por SARS-CoV-2. Luego se procedió a su análisis.

IV.9. Definiciones

Pacientes con pauta de vacunación completa: aquellos pacientes que han recibido dos o más dosis de la vacuna, según indicara el programa de vacunación establecido en ese momento, y una vez transcurridos al menos 15 días desde la última dosis contraen la infección por el virus SARS-CoV-2.

qRT-PCR: 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.10. Análisis estadístico

Las medianas de las variables continuas se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis, para comparar dos o más grupos según procediera.

En el segundo trabajo (de Michelena. J Infect. 2022), para analizar la concordancia entre los resultados proporcionados por los dos ensayos a estudio se calculó el coeficiente Kappa de Cohen. En el tercer y cuarto trabajo (de Michelena. J Med Virol. 2022, de Michelena. Clin Microbiol Infect. 2023), la comparación de frecuencias entre los grupos se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se indicaron los valores p exactos de dos caras bilaterales.

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 cuatro secciones, cada una enfocada en un objetivo específico. La presentación de los resultados sigue el orden de publicación de los artículos. Los resultados se presentan de la siguiente manera:

En primer lugar, se presentan los resultados relacionados con el impacto en la magnitud y cinética de descenso de las cargas de ARN del SARS-CoV-2 del tiempo transcurrido desde la vacunación completa hasta la enfermedad por COVID-19 causada por la variante Delta.

En segundo lugar, se presentan los resultados con respecto al rendimiento en la vida real de una prueba rápida de detección de antígenos COVID-19 dirigida a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 para el diagnóstico de COVID-19 debido a la variante Ómicron.

En tercer lugar, se presentan los resultados concernientes a las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 y BA.2.

Por último, se presentan los resultados relativos a las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causado por las variantes Delta y Ómicron.

V.1. Impacto en la carga de ARN del SARS-CoV-2 del tiempo transcurrido desde la vacunación completa hasta la infección por la variante Delta del COVID-19 (Artículo I)

En este primer trabajo, nuestro objetivo fue demostrar que entre los pacientes con COVID-19, tanto la magnitud como la dinámica de descenso de la carga de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior, se ven notablemente afectadas por el tiempo transcurrido desde la vacunación completa contra el COVID-19.

V.1.1. Grupos de estudio

Para ello, estratificamos arbitrariamente a los 107 participantes según el tiempo transcurrido entre la vacunación completa y el inicio de los síntomas en tres grupos, que se equilibraron con respecto al número de participantes; grupo 1: 15 a 45 días (mediana de días 35, n=28), grupo 2: 46 a 90 días (mediana de días 57,7, n=39) y grupo 3: 91 a 200 días (mediana de días 133, n=40) como se muestra en la **tabla V.1**.

Tabla V.1. Características de los participantes con infección por la variante Delta del SARS-CoV-2 según el tiempo transcurrido entre la vacunación completa y el inicio de los síntomas.

Parámetro	Tiempo transcurrido entre la vacunación completa y el inicio de los síntomas			P valor
	15–45 días (mediana, 35)	46–90 días (mediana, 57,5)	91–200 días (mediana, 133)	
Nº pacientes (%)	28 (26,2)	39 (36,4)	40 (37,4)	-
Mediana de edad en años (rango)	57 (50–69)	58,5 (50–78)	84,5 (51–94)	<0,0001
Hombres / Mujeres (%)	14 (50) / 14 (50)	17 (43) / 22 (57)	19 (47,5) / 21 (52,5)	0,87
Carga inicial de ARN del SARS-CoV-2; log ₁₀ copias/ml (rango)	7,5 (3,4–10,9)	9,0 (4,3–11,2)	8,7 (4,3–11,9)	0,16
Días entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico molecular de la infección mediante RT-PCR (rango)	2 (0–4)	2 (0–4)	2 (0–4)	0,91
Hospitalización (%)	0 (0)	5 (12,8)	9 (22,5)	0,03
Vacuna empleada (%)				
Comirnaty®	15 (53,6)	21 (53,8)	37 (92,5)	<0,0001
Spikevax®	2 (7,1)	9 (23,1)	2 (5,0)	
Vaxzevria®	10 (35,7)	2 (5,1)	0 (0)	
Janssen COVID-19	1 (3,6)	7 (17,9)	1 (2,5)	

Los participantes presentaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a edad, tasa de hospitalización (mayor edad y más ingresos hospitalarios en el grupo 3) y

vacuna utilizada, pero fueron comparables en cuanto al tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico por RT-PCR (mediana, 2 días) y el sexo.

Ninguno de los participantes de nuestra cohorte tenía una condición inmunosupresora o estaba bajo terapia inmunosupresora en el momento del inicio de los síntomas. La mayoría de los pacientes presentaron una enfermedad leve ($n = 93$), mientras que 14 tuvieron que ser hospitalizados (uno en la unidad de cuidados intensivos).

Por otro lado, para descartar el sesgo relacionado con la vacuna utilizada, posteriormente realizamos un subanálisis similar restringido a sujetos vacunados con Comirnaty®, la vacuna utilizada en la mayoría de los participantes en la cohorte actual, tal y como se refleja en la **tabla V.2**.

Tabla V.2. Características de los participantes con infección por la variante Delta del SARS-CoV-2 según el tiempo transcurrido entre la vacunación completa con la vacuna Comirnaty® contra el COVID-19 y el inicio de los síntomas.				
Parámetro	Tiempo transcurrido entre la vacunación completa y el inicio de los síntomas			P valor
	15-45 días (mediana, 37)	46-90 días (mediana, 56)	91-200 días (mediana, 135)	
Nº pacientes (%)	15 (20,5)	21 (28,8)	37 (50,7)	-
Mediana de edad en años (rango)	53 (50–69)	59 (50–78)	85 (51–94)	<0,0001
Hombres / Mujeres (%)	7 (46,7) / 8 (53,3)	10 (47,6) / 11(52,4)	16 (40) / 21 (60)	0,94
Carga inicial de ARN del SARS-CoV-2; $\log_{10}$ copias/ml (rango)	5,6 (3,4–10,9)	8,1 (4,3–11,2)	8,7 (4,3–11,9)	0,09
Días entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico molecular de la infección mediante RT-PCR (rango)	2 (0–4)	2 (0–4)	2 (0–4)	0,96
Hospitalización (%)	0	2 (9,5)	9 (22,5)	0,06

En este caso, siguieron existiendo diferencias significativas entre los grupos en cuanto a edad (mayor edad en el grupo 3), pero no respecto a la hospitalización.

V.1.2. Carga de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de personas con COVID-19 en función del tiempo transcurrido desde la vacunación completa

En primer lugar, comparamos la carga inicial de ARN del SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo de los pacientes estratificados previamente según el tiempo transcurrido desde la vacunación.

Tomando la cohorte en su conjunto, observamos un aumento en las cargas iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas, asociado positivamente con el tiempo transcurrido desde la vacunación, independientemente de la vacuna utilizada. Los datos se muestran en la **figura V.1**. No obstante, también vimos una clara tendencia a una menor carga inicial de ARN del SARS-CoV-2 en los participantes del grupo 1 en comparación con los otros dos grupos.

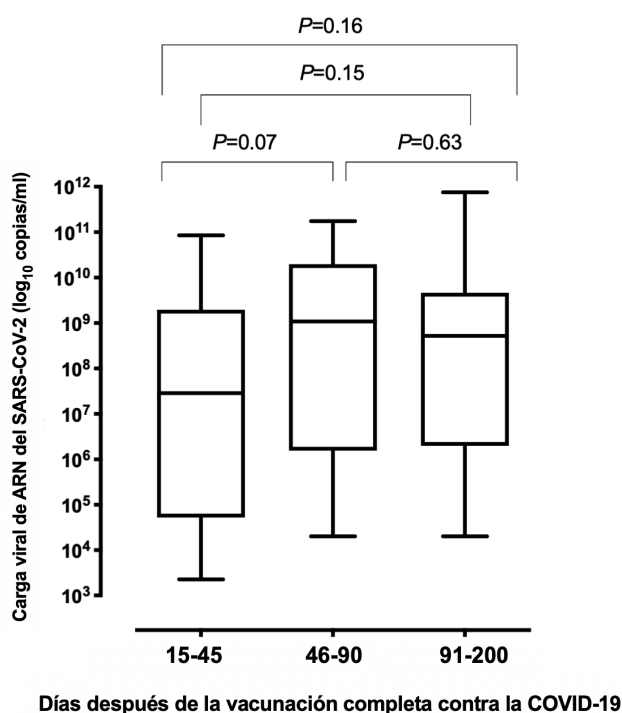


Figura V.1. Cargas iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en todos los participantes.

Del mismo modo, al analizar la evolución de las cargas de ARN del SARS-CoV-2 a lo largo del tiempo desde el inicio de los síntomas, como se puede apreciar en la **figura V.2.**, observamos una disminución de la carga de ARN viral aparentemente más rápida en los pacientes del grupo 1.

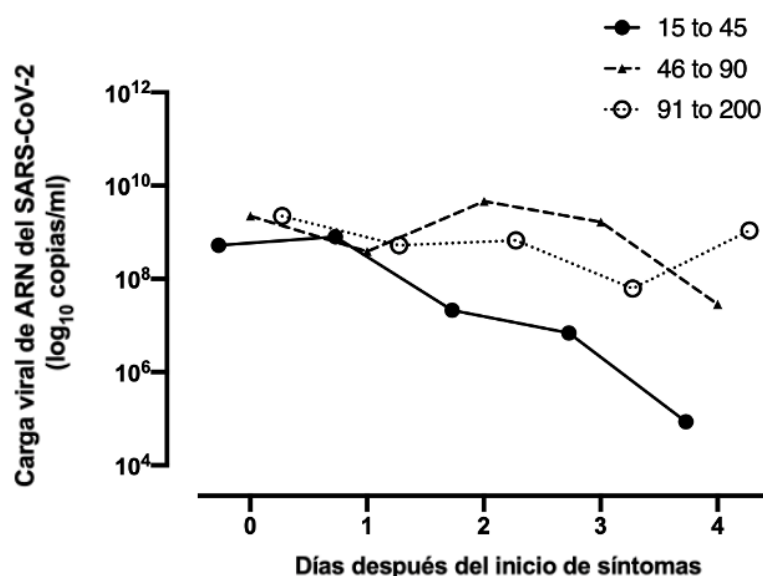


Figura V.2. Cinética de la carga de ARN del SARS-CoV-2 durante los primeros 4 días después de los síntomas en todos los participantes.

V.1.3. Carga de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de personas con COVID-19 en función del tiempo transcurrido desde la vacunación completa con Comirnaty®

Como hemos comentado, para descartar el sesgo relacionado con la vacuna utilizada, posteriormente realizamos un subanálisis restringido a sujetos vacunados con Comirnaty®.

Del mismo modo, como se muestra en la **figura V.3.**, las cargas iniciales de ARN del SARS-CoV-2 aumentaron gradualmente con el tiempo transcurrido desde la vacunación, con diferencias significativas en las cargas virales entre los participantes de los grupos 1 y 3 ($P = 0,03$). Nuevamente, la disminución de la carga sucedió más rápido en los pacientes del grupo 1 que en los otros dos grupos de estudio, tal y como se refleja en la **figura V.4.**

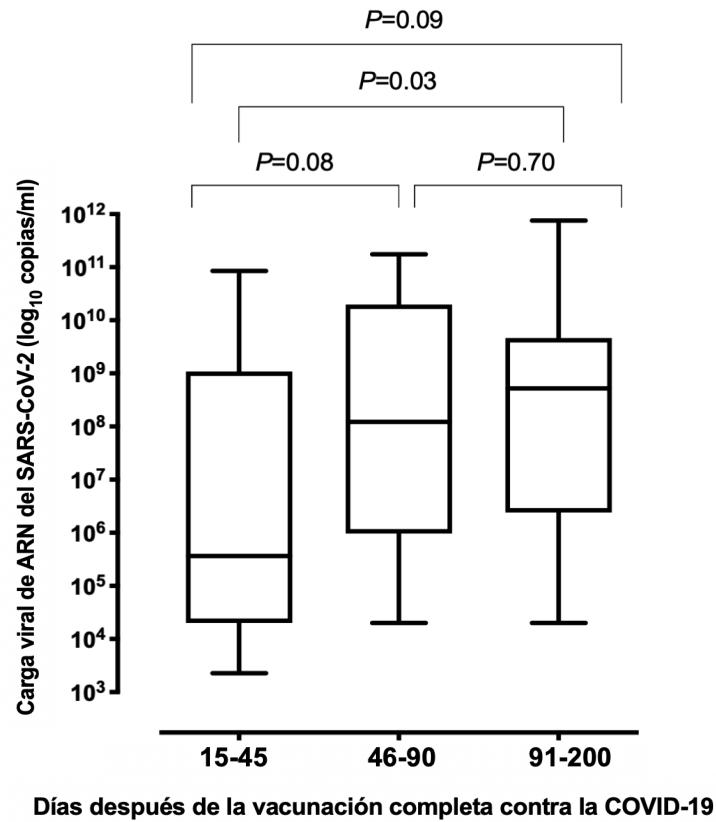


Figura V.3. Cargas iniciales de ARN del SARS-CoV-2 en los participantes vacunados con la vacuna Comirnaty®.

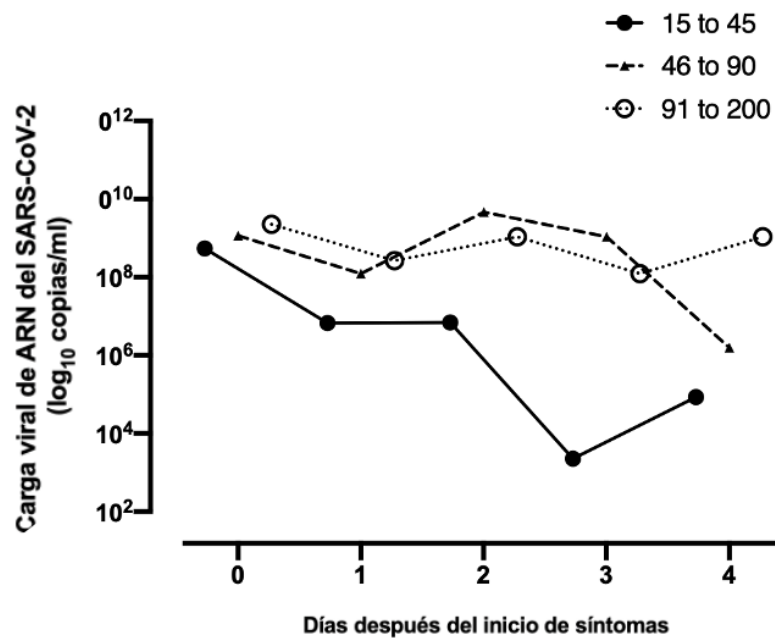


Figura V.4. Cinética de la carga de ARN del SARS-CoV-2 durante los primeros 4 días después de los síntomas en los participantes vacunados con la vacuna Comirnaty®.

V.1.4. Discusión

Los datos obtenidos respaldan que la carga inicial de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 es más elevada en aquellos pacientes con mayor tiempo transcurrido tras la pauta de vacunación completa contra el COVID-19. Por el contrario, en los pacientes con menor tiempo transcurrido tras la pauta de vacunación completa contra el COVID-19 parece haber una clara tendencia a una menor carga inicial, así como una disminución de la carga de ARN viral aparentemente más rápida. Nuestros resultados están en consonancia con los publicados por Levine-Tiefenbrun M. et al (117), cuyo estudio apoya también el hecho de que los individuos recientemente vacunados tengan cargas de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 más bajas que aquellos no vacunados y que estas aumenten positivamente conforme aumenta el tiempo transcurrido tras la vacunación.

El presente estudio tiene varias limitaciones:

- El tamaño relativamente modesto de la muestra.
- La posibilidad de que las cargas máximas de ARN de la variante Delta se hayan alcanzado antes de que aparecieran los síntomas, y no de forma uniforme entre los participantes de los grupos de estudio.
- Los pacientes del grupo 3 eran mucho mayores que los de los demás grupos; de modo que es posible que las personas mayores presenten una cinética diferente de la carga de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 en el TRS, una disminución de la respuesta inmunitaria tras la vacunación, o ambas cosas, en comparación con los pacientes de los demás grupos del estudio.
- No dispusimos de muestras secuenciales de los participantes para el estudio de la evolución de las cargas de ARN del SARS-CoV-2.

V.2. Rendimiento en la vida real de una prueba rápida de detección de antígenos COVID-19 dirigida a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 para el diagnóstico de COVID-19 debido a la variante Ómicron (Artículo II)

En este segundo trabajo, nuestro objetivo fue evaluar el rendimiento clínico del dispositivo de prueba rápida de detección de antígenos Panbio™ COVID-19 en muestras nasofaríngeas para el diagnóstico de la variante Ómicron del COVID-19.

V.2.1. Grupo de estudio

Con este fin, se reclutaron 244 pacientes consecutivos (mediana de edad, 40 años; intervalo, 2-96; 141 mujeres) con sospecha clínica de COVID-19, 232 de los cuales eran adultos (mediana de edad, 41 años; rango, 17-96) y 12 niños (mediana de edad, 15 años; rango, 2-16).

En total, 126 pacientes (51,6%) dieron positivo tanto por RT-PCR como por las PRDA y 90 pacientes (36,8%) dieron negativo por ambos ensayos. Por su parte, 28 pacientes (11,4%) arrojaron resultados discordantes (RT-PCR+/PRDA-). La concordancia entre los resultados proporcionados por los dos ensayos fue buena (estadística κ de Cohen: κ , 0,78; IC 95%, 0,69-0,85). Es importante destacar que el tiempo transcurrido hasta la recogida de la muestra fue comparable ($P = 0,69$) entre los pacientes RT-PCR+/PRDA+ y RT-PCR+/PRDA- (mediana, 2 días; intervalo, 0-5).

V.2.2. Sensibilidad y especificidad de las PRDA

La mediana de la carga de ARN viral fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en las muestras RT-PCR+/PRDA+ que en las que arrojaron resultados RT-PCR+/PRDA-, como observamos en la **figura V.5**. La especificidad y sensibilidad globales de las PRDA fueron del 100% (IC 95%, 95,9-100%) y del 81,8% (IC 95%, 75-87,1%), respectivamente. Como se muestra en la **tabla V.3**, la sensibilidad del ensayo de las PRDA aumentó en paralelo con la carga de ARN del SARS-CoV-2, alcanzando el 95,6% en muestras con cargas virales $\geq 7,5 \log_{10}$ copias/ml ($Ct \leq 20$).

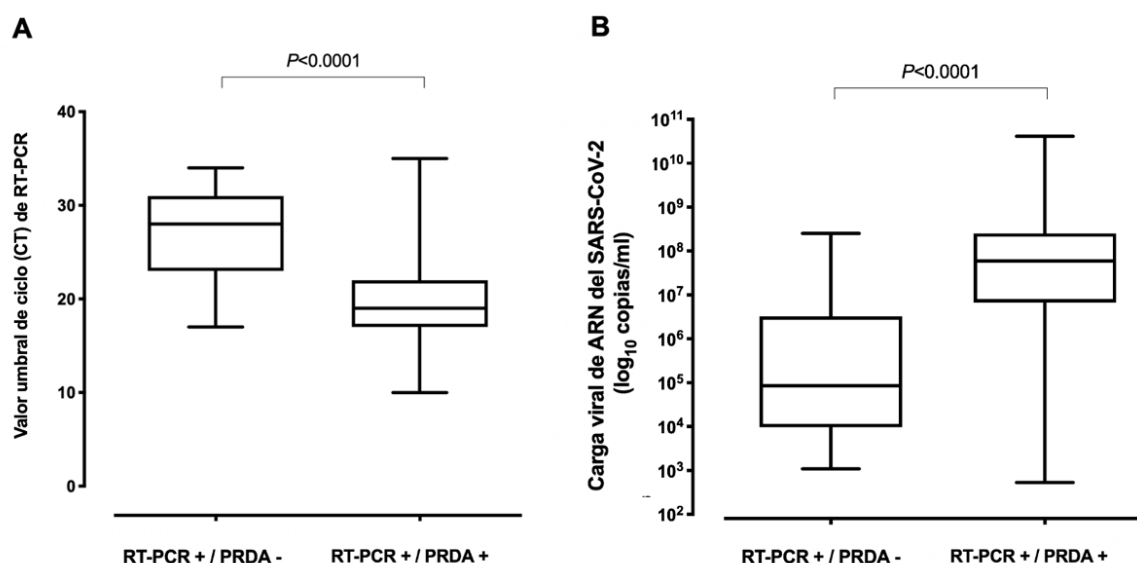


Figura V.5. Valor umbral de ciclo (Ct) de RT-PCR (A) y cargas de ARN viral (B) en muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes con COVID-19 causado por la variante Ómicron que dieron positivo o negativo con el dispositivo de prueba rápida Panbio™ COVID-19 Ag (abbott diagnostic GmbH, Jena, Alemania).

Tabla V.3. Sensibilidad global del dispositivo de prueba rápida Panbio™ para la detección de Ag COVID-19 en función de la carga de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas.

Ct RT-PCR	Carga de ARN del SARS-CoV-2 (log ₁₀ copias/ml)	Sensibilidad (IC 95%)
≤ 20	≥ 7,5	95,6 (89,2–98,3)
≤ 25	≥ 5,8	92,6 (86,6–96,1)
≤ 30	≥ 4,3	87,2 (80,7–91,8)
≤ 35	≥ 2,7	81,8 (75–87,1)

Curiosamente, la sensibilidad del ensayo aumentó del 79,6% (IC 95%, 66,4–88,5) cuando se consideraron los especímenes recogidos en los días 0-1 tras el inicio de los síntomas, al 86,4% (IC 95%, 66,7–95,3) cuando se agruparon los especímenes obtenidos en los días 4-5, como se refleja en la **tabla V.4**. En general, el valor predictivo negativo de las PRDA para una prevalencia estimada del 30% y el 35% (representativa de nuestro Departamento de Salud durante el periodo de estudio) fue del 92,8% (IC 95%, 85,8–96,5) y del 91,1% (IC 95%, 82,8–95,6), respectivamente.

Tabla V.4. Resultados de la RT-PCR del SARS-CoV-2 y de la prueba rápida Panbio™ para la detección de Ag COVID-19 en muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes con COVID-19 según el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas.		
Resultado de la prueba rápida Panbio™ Ag COVID-19 en los grupos de estudio	Resultado RT-PCR SARS-CoV-2	
	Positivo	Negativo
Total pacientes (n=244)		
Positivo	126	0
Negativo	28	90
Pacientes testados 0-1 días tras el inicio de los síntomas (n=71)		
Positivo	39	0
Negativo	10	21
Pacientes testados 2-3 días tras el inicio de los síntomas (n=129)		
Positivo	68	0
Negativo	15	46
Pacientes testados 4-5 días tras el inicio de los síntomas (n=44)		
Positivo	19	0
Negativo	3	22

V.2.3. Discusión

La variante Ómicron del SARS-CoV-2 presenta una o más mutaciones en el gen de la nucleoproteína (P13L, Del31-33, R203 K y G203 K) (148) que pueden afectar a la sensibilidad de las PRDA, como se describe en estudios publicados previamente (149).

Encontramos un estudio que sugiere que el ensayo Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device funcionaba peor para el diagnóstico de COVID-19 debido a la infección por la variante Ómicron en población vacunada (sensibilidad del 36,1%) en comparación con Delta (sensibilidad del 67,7%) (150). Sin embargo, en ese trabajo (150), las muestras nasofaríngeas se diluyeron en medio de transporte viral y se criopreservaron antes de la PRDA. Al utilizar virus vivos aislados de muestras clínicas, el ensayo Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device mostró una sensibilidad analítica comparable para la detección de Ómicron y Delta en un estudio (89), pero inferior para Ómicron en otro (151). No obstante, ningún estudio publicado ha evaluado el rendimiento de las PRDA realizado en el punto de atención para el diagnóstico de la variante Ómicron del COVID-19.

En una serie compuesta en su mayoría por personas adultas vacunadas sin antecedentes de infección por SARS-CoV-2 y sometidas a pruebas en los 5 días siguientes al inicio de los síntomas, demostramos que el Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device mostraba una especificidad exquisita y una sensibilidad global aceptable (81,8%) para el diagnóstico de Ómicron, cifras con las que ambas superaban los requisitos de la agencia reguladora para la aprobación temporal (al menos 98% y 80%, respectivamente) (118).

En nuestra experiencia, el rendimiento clínico del ensayo Panbio™ COVID-19 para la variante Ómicron fue comparable al de informes anteriores para la variante Wuhan-Hu-1 G614 (especificidad del 100% y sensibilidad del 81,4% en pacientes adultos no vacunados con un curso clínico de <5 días) (149).

Curiosamente, la sensibilidad del ensayo de las PRDA también pareció aumentar con el tiempo transcurrido tras el inicio de los síntomas, lo que sugiere que la infección por la variante Ómicron en pacientes vacunados puede ser sintomática incluso en presencia de cargas de ARN por debajo del umbral para la detección viral mediante PRDA. Aunque es especulativo, este fenómeno puede estar relacionado con la menor capacidad de la variante Ómicron para antagonizar la respuesta del interferón de la célula huésped (152).

En resumen, encontramos que el Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device funciona bien como prueba en el punto de atención para el diagnóstico precoz de COVID-19 debido a la variante Ómicron en centros de atención primaria.

Las limitaciones del presente estudio son las siguientes:

- La subvariante Ómicron B.1.529.2 (BA.2), que carece de la delección 69-70, puede clasificarse incorrectamente como tal basándose en el resultado del SGTF; no obstante, esta subvariante no pudo identificarse en muestras secuenciadas durante el periodo de estudio en nuestro departamento de salud.
- No fue posible comparar el rendimiento clínico de las PRDA para el diagnóstico de COVID-19 entre Ómicron y otras variantes de interés debido al predominio absoluto de la primera en el momento del estudio.

- El escaso número de niños, personas con experiencia en SARS-CoV-2 y personas no vacunadas que se inscribieron impidió realizar subanálisis sólidos para estos grupos de población.

V.3. Carga de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes ambulatorios afectados por el brote de COVID-19 debido a Ómicron BA.1 y BA.2 (Artículo III)

En este tercer trabajo, nuestro objetivo fue comparar la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 y BA.2.

V.3.1. Grupos de estudio

Se incluyeron un total de 277 pacientes con COVID-19. La mayoría se presentó con enfermedad paucisintomática y solo 28 requirieron finalmente hospitalización (24 debido a BA.1 y 4 a BA.2; $P = 0,007$). Todos los pacientes habían completado una pauta de vacunación contra el COVID-19 (en la mayoría de los casos vacunas basadas en ARNm) y alrededor del 60% habían sido reforzados con vacunas heterólogas u homólogas.

Como se muestra en la **tabla V.5.**, los pacientes con COVID-19 debido a BA.1 ($n = 130$) y BA.2 ($n = 147$) se emparejaron por edad, sexo, estado de vacunación contra el SARS-CoV-2, tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna (mediana, 109 días frente a 104 días) y tiempo de realización de la prueba RT-PCR tras el inicio de los síntomas (mediana, 2 días, intervalo, 0-7 días).

Tabla V.5. Características relevantes de los pacientes con enfermedad por COVID-19 debido a las subvariantes BA.1 y BA.2 del SARS-CoV-2 Ómicron.

Parámetro	Linaje de la variante de Ómicron del SARS-CoV-2 causante del brote de COVID-19		<i>P</i>
	BA.1 (n = 130)	BA.2 (n = 147)	
Mediana de edad en años (rango)	48 (12-97)	49 (13-97)	0,48
Sexo (femenino/masculino)	84/50	92/64	0,58
Mediana de días hasta RT-PCR tras el inicio de los síntomas (rango)	2 (0-7)	2 (0-7)	0,47
Nº de pacientes que completaron un calendario de vacunación regular (tipo)	59 (Comirnaty®, <i>n</i> = 48; Spikevax®, <i>n</i> = 10; Vaxzevria®, <i>n</i> = 1)	62 (Comirnaty®, <i>n</i> = 50; Spikevax®, <i>n</i> = 9; Vaxzevria®, <i>n</i> = 3)	0,59
Nº de pacientes que recibieron una dosis de vacunación de refuerzo (tipo)	71 (Homóloga, <i>n</i> = 38/ Heteróloga, <i>n</i> = 33)	85 (Homóloga, <i>n</i> = 38; Heteróloga, <i>n</i> = 47)	0,61
Mediana de días desde la recepción de la última dosis de vacuna (rango)	109 (20-434)	104 (19-326)	0,66
Nº de pacientes con antecedentes de infección por SARS-CoV-2 previos a la vacunación	7	17	0,08

Cabe destacar que la celularidad en las muestras nasofaríngeas de los individuos infectados por BA.1 y BA.2 era comparable, como se demostró mediante el ensayo basado en el gen de la β -glucuronidasa humana-RT-PCR (60) (no mostrado). En general, las cargas de ARN viral en las muestras nasofaríngeas fueron comparables ($P = 0,31$) para BA.1 (mediana, 7,1 log₁₀ copias/ml; intervalo, 2,7-10,6) y BA.2 (mediana, 7,5 log₁₀ copias/ml; intervalo, 2,7-10,6).

V.3.2. Carga de ARN de las subvariantes de Ómicron BA.1 y BA.2 del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de personas con COVID-19 en función del tiempo transcurrido desde la vacunación completa

Cuando las cargas de ARN del SARS-CoV-2 de los participantes se representaron gráficamente en función del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, como se puede observar en la **figura V.6.**, la carga viral máxima pareció alcanzarse antes en BA.2 que en BA.1 (día 1 frente a día 3-5; $P = 0,002$). Sin embargo, se observó una notable variabilidad individual en ambos grupos de comparación.

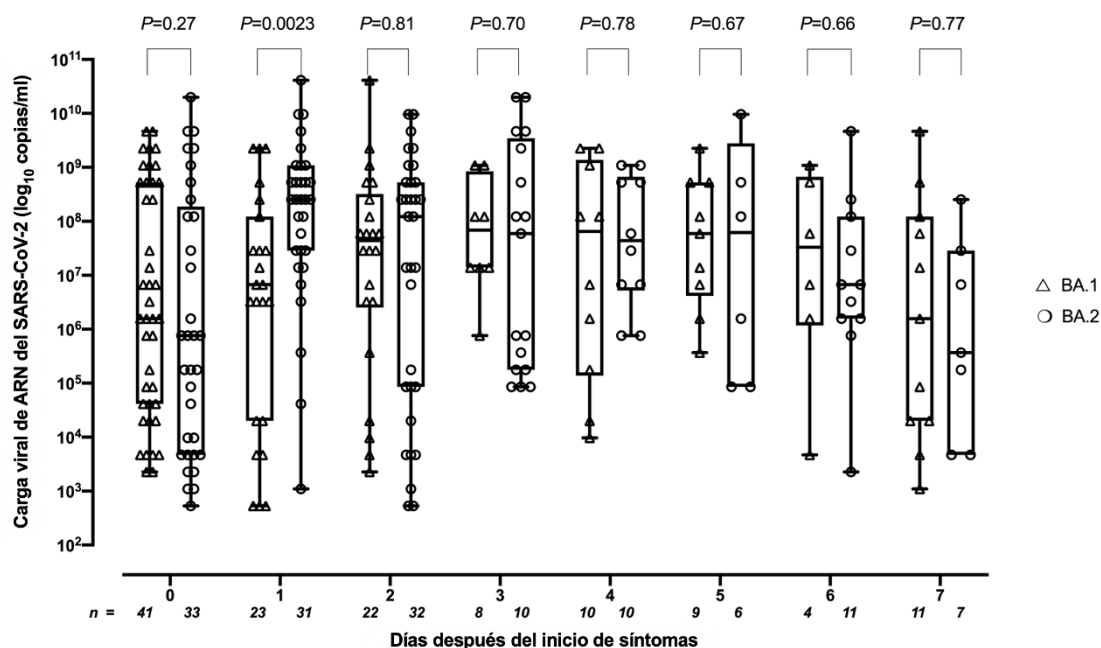


Figura V.6. Cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 o BA.2 según el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas.

Dado que el tiempo transcurrido desde la vacunación parece ejercer un impacto importante en la magnitud de la carga de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes con COVID-19 por la variante Delta (145), evaluamos si esto pudiera extenderse a Ómicron BA.1 y BA.2. Al igual que en el estudio mencionado anteriormente (145), establecimos arbitrariamente tres marcos temporales para las comparaciones (días 16-90, 91-180 y >180). Como se muestra en la **figura V.7.**, el tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna no tuvo un impacto significativo en las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en el TRS ni para BA.1 ni para BA.2, aunque se evidenció una clara tendencia hacia cargas virales más elevadas con el tiempo transcurrido desde la vacunación para BA.2 pero no para BA.1. Además, la carga

de ARN del SARS-CoV-2 no difirió en magnitud entre BA.1 y BA.2 en ningún periodo dado.

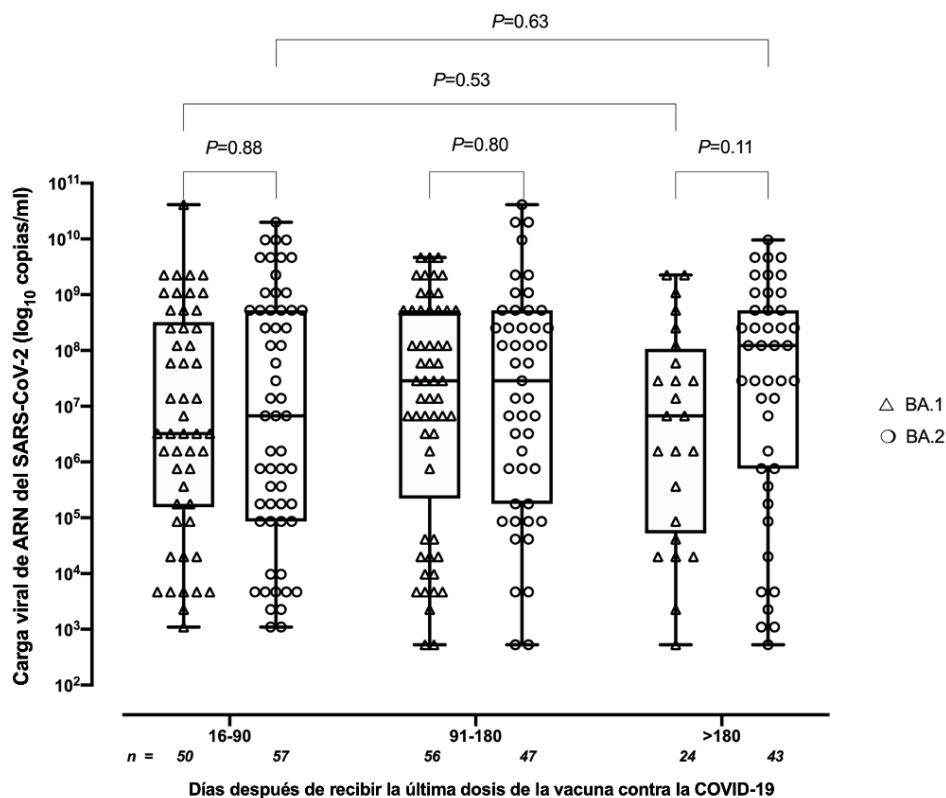


Figura V.7. Cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por las subvariantes de Ómicron BA.1 o BA.2 en función del tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacuna.

V.3.3. Discusión

Nuestros datos sugieren que las cargas globales de ARN del SARS-CoV-2 de la variante Ómicron en las muestras nasofaríngeas no difieren significativamente entre BA.1 y BA.2 en pacientes con COVID-19 muestreados en un plazo de 7 días (mediana, 2 días) desde el inicio de los síntomas.

Todos los participantes en el presente estudio habían sido completamente vacunados, y más de la mitad había recibido una dosis de vacuna de refuerzo; además, pocos de ellos (n = 24) presentaban aparentemente inmunidad híbrida en el momento de la prueba. Esto es importante dado que la inmunidad híbrida, resultante de la infección natural y la vacunación, puede conferir una mayor protección frente a la infección por

SARS-CoV-2 y el COVID-19 grave causados por las diferentes variantes de interés, incluida Ómicron (153-155).

No se sabe con certeza si nuestras observaciones pueden extrapolarse a otras poblaciones que difieran sustancialmente en los parámetros de respuesta inmunitaria de base en el momento de la infección por Ómicron. En concordancia con nuestros resultados, Marking et al. (130) investigaron las infecciones en trabajadores sanitarios triplemente vacunados, con y sin infección previa por SARS-CoV-2, e informaron de cargas de ARN viral comparables en TRS para BA.1 y BA.2. Por el contrario, Qassim et al. (132) hallaron cargas de ARN viral significativamente mayores en las infecciones por BA.2 en comparación con las debidas a BA.1 (Ct 3,5 menor por RT-PCR). No obstante, la distribución por edades, el estado de vacunación de los participantes y el porcentaje de individuos con infección previa por SARS-CoV-2 diferían entre su estudio y el nuestro.

Del mismo modo, los datos de un amplio estudio sueco indicaban aparentemente que la infección por la subvariante BA.2 de Ómicron se asociaba con niveles de ARN viral en el TRS ~100 veces superiores a los de BA.1, al principio del curso de la infección (131). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P = 0,06$). La falta de información sobre las características de los participantes en su estudio, en particular sobre su estado de vacunación y la presentación clínica de la infección por SARS-CoV-2 en el momento de la prueba, impide la comparación directa con nuestro estudio.

En nuestra experiencia, la carga de ARN viral de los casos por COVID-19 parecía alcanzar un pico antes en BA.2 que en BA.1, aunque esta observación debe tomarse con cautela debido al enfoque poblacional de nuestro análisis. Los datos de un estudio reciente (133), que sugieren una cinética de replicación comparable de las subvariantes BA.1 y BA.2 en cultivo celular y tras la infección natural por Ómicron SARS-CoV-2, no respaldan nuestros hallazgos; aunque otro estudio (156) descubrió que la subvariante BA.2 es más fusogénica que BA.1, lo que podría tener un impacto en la dinámica de replicación del virus en el TRS. Especulamos que las diferencias en las características de las respuestas inmunitarias innatas mediadas por interferones o por anticuerpos funcionales y células T provocadas por BA.2 y BA.1 pueden explicar nuestros hallazgos.

En trabajos previos pusimos de manifiesto que en personas vacunadas contra el SARS-CoV-2 que habían sufrido un brote de COVID-19 las cargas de ARN de la variante Delta del SARS-CoV-2 en el exudado nasofaríngeo aumentaban paralelamente al tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna. Este también puede ser el caso de la variante Ómicron según un estudio reciente (132). Aquí encontramos una tendencia a una relación directa entre el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna y la magnitud de la carga del SARS-CoV-2 en exudados nasofaríngeos para BA.2 pero no para BA.1. Esta observación es compatible con una respuesta de anticuerpos de protección cruzada menos eficaz y que disminuye más rápidamente provocada por las vacunas basadas en Wuhan-Hu-1 contra BA.2 en comparación con BA.1, o ambas (156).

Las limitaciones del presente estudio son las siguientes:

- No se dispuso de muestras secuenciales de los participantes, lo que impidió la caracterización precisa de la cinética de la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el TRS a nivel individual.
- No se realizaron cultivos virales para evaluar el contenido de partículas víricas viables en los exudados nasofaríngeos de los pacientes de los dos grupos.
- No se dispuso de datos sobre anticuerpos específicos contra el virus o inmunidad de células T de los participantes.
- Queda por determinar si nuestras observaciones pueden extrapolarse a los pacientes hospitalizados, los cuales estaban infrarrepresentados en la serie actual.

V.4. Cargas de ARN del SARS-Cov-2 en pacientes con infección por COVID-19 causada por las variantes Delta y Ómicron (Artículo IV)

En el último trabajo, nuestro objetivo fue comparar la carga de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de pacientes vacunados con enfermedad por COVID-19 causada por las variantes Delta y Ómicron.

V.4.1. Grupos de estudio

Se recogió una única muestra nasofaríngea de 240 individuos con infección sintomática por SARS-CoV-2 debida a la variante Delta u Ómicron en el momento en que los pacientes solicitaron asistencia médica (una mediana de 2 días tras el inicio de los síntomas; intervalo, 0-7 días en ambos grupos de estudio).

V.4.2. Carga de ARN de la variante Delta y Ómicron del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de personas con COVID-19 en función del tiempo transcurrido desde la vacunación completa

En general, las cargas de ARN viral fueron significativamente mayores ($P = 0,003$) para la variante Ómicron (mediana, $8,1 \log_{10}$ copias/ml; intervalo, $4,0-10,9 \log_{10}$ copias/ml) que para la variante Delta (mediana, $7,5 \log_{10}$ copias/ml; intervalo, $3,0-11,6 \log_{10}$ copias/ml). Como se muestra en la **tabla V.6.**, los pacientes de los dos grupos eran comparables en cuanto al calendario de vacunación empleado, la mediana del tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de vacunación (134 días [intervalo, 16-324 días] para Ómicron y 158 días [intervalo, 20-318 días] para Delta; $P = 0,13$) y la infección por SARS-CoV-2 antes de la vacunación.

Tabla V.6. Características de los pacientes con infección sintomática intercurrente por coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 causada por la variante Ómicron o Delta.

Parámetro	Nº de participantes con COVID-19 debido a la variante Ómicron (n = 121)	Nº de participantes con COVID-19 debido a la variante Delta (n = 119)	P valor
Edad, mediana (rango)	40 (16–101)	48 (16–89)	0,001
Sexo (femenino/masculino)	74/47	65/54	0,30
Día de la muestra nasofaríngea tras el inicio de los síntomas, mediana (rango)	2 (0–7)	2 (0–7)	0,98
Calendario de vacunación			
Dos dosis de Comirnaty®	72	71	0,1
Dos dosis de Spikevax®	15	17	
Dos dosis de Vaxzevria®	9	16	
Una dosis de Janssen	5	4	
Tres dosis de Comirnaty®	10	9	
Tres dosis de Spikevax®	0	2	
Tres dosis de Comirnaty®; tercera dosis de Spikevax®	9	0	
Dos dosis de Vaxzevria®; tercera dosis de Spikevax®	1	0	0,12
Infección por SARS-CoV-2 antes de la vacunación, n (%)	8 (6,6)	3 (2,5)	
Tiempo transcurrido desde la última dosis de vacunación y la recogida de la muestra nasofaríngea (días), n (rango)	134 (16–324)	158 (20–318)	0,13
COVID-19, coronavirus disease 2019.			

Para evaluar el impacto del tiempo transcurrido desde la finalización de la vacunación en las cargas de ARN del SARS-CoV-2 Ómicron y Delta en las muestras nasofaríngeas, definimos arbitrariamente los siguientes marcos temporales: 16-90, 91-180 y >180 días. Los especímenes se recogieron en momentos comparables desde el

momento del inicio de los síntomas a través de estas ventanas temporales para ambos casos de las variantes Ómicron y Delta.

Como se muestra en la **figura V.8.**, se observaron mayores cargas de ARN viral asociadas con el tiempo transcurrido desde la vacunación para ambas variantes, sobre todo para Ómicron. Se observaron cargas de ARN viral más altas para Ómicron que para Delta en todos los periodos: 16-90 días (mediana, 6,83 frente a 5,88 log₁₀ copias/ml; intervalo, 3,91-10,68 frente a 3,67-9,66 log₁₀ copias/ml; $P = 0,10$), 91-180 días (mediana, 8,09 frente a 7,46 log₁₀ copias/ml; intervalo, 4,30-10,92 frente a 3,03-11,56 log₁₀ copias/ml; $P = 0,003$) y 181-330 días (mediana, 8,56 frente a 8,10 log₁₀ copias/ml; intervalo, 6,51-10,29 frente a 3,03-10,61 log₁₀ copias/ml; $P = 0,11$).

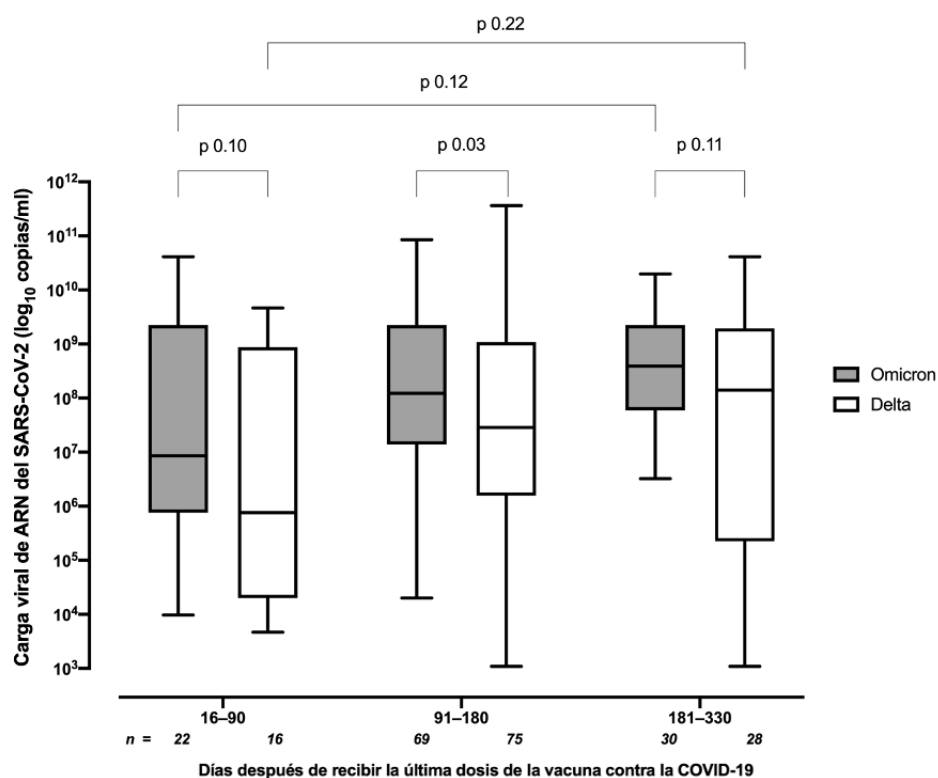


Figura V.8. Cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes con infección por COVID-19 causada por la variante Ómicron o Delta estratificadas por el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacunación (en los días 15-90, 91-180 y 180-330).

Para evaluar la proporción relativa de ARN viral libre en las muestras nasofaríngeas, se sometieron al ensayo de viabilidad de transcripción inversa (RT)-PCR un total de 17 y 15 muestras procedentes de pacientes con un brote de COVID-19 causado por las variantes Ómicron y Delta, respectivamente, como se puede observar en la **tabla**

V.7. La relación del Ct para la RT-PCR tratada o no tratada con cloruro de platino para la diana N fue mayor para Ómicron que para Delta en dos experimentos diferentes (media, 0,62 frente a 0,57, respectivamente; intervalo, 0,57-0,98 frente a 0,61-0,87, respectivamente), aunque no se alcanzó significación estadística ($P = 0,10$).

Tabla V.7. Ensayo RT-PCR de viabilidad del SARS-CoV-2 realizado en muestras nasofaríngeas de pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por la variante Ómicron o Delta.

Parámetro	Variante Ómicron (n=17)	Variante Delta (n=15)	<i>P</i> valor ^a
Mediana del Ct (rango) por RT-PCR en ENF pretratados con PtCl ₄ / no tratados (experimento 1)	37,3 (29,8-40) / 23,3 (17,2-37,8)	37,4 (27,2-40) / 21,6 (16,6-34,9)	0,10
Mediana del Ct (rango) por RT-PCR en ENF pretratados con PtCl ₄ / no tratados (experimento 2)	36,2 (29,9-40) / 23,5 (17,2-40)	37,2 (27,2-40) / 21,7 (17,0-35,2)	0,11
CT, cycle threshold; N secuencia amplificada dentro del gen de la nucleocápside (N).			
^a Las proporciones se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney.			

V.4.3. Discusión

En el presente estudio se hicieron varias observaciones clave. En primer lugar, se observó que las cargas de ARN para las variantes Ómicron y Delta del SARS-CoV-2 en las muestras nasofaríngeas aumentaban en los individuos con enfermedad por COVID-19 con el tiempo transcurrido desde la recepción de la última dosis de la vacuna. Esto apoya la noción de que la disminución de la inmunidad inducida por la vacuna tiene un impacto importante en las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior, lo que concuerda con los datos publicados anteriormente sobre la variante Delta (145, 146). El tamaño del efecto fue más marcado para la variante Ómicron, lo que

probablemente refleja su ventaja sobre la variante Delta en la evasión de respuestas inmunes inducidas por vacunas (137-141).

En segundo lugar, las cargas de ARN de la variante Ómicron del SARS-CoV-2 tendieron a ser superiores a las de Delta independientemente del tiempo transcurrido desde la vacunación, aunque solo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los días 91 y 180; especulamos que la primera variante podría superar a la segunda en términos de eficiencia replicativa en el tracto respiratorio superior, lo que concuerda con hipótesis anteriores (157). No obstante, nuestra observación debe interpretarse con cautela porque el pico de carga viral puede producirse antes en las infecciones causadas por Delta que en las causadas por Ómicron (115). En contraste con nuestros resultados, Miguères et al. (140) informaron de cargas de ARN más elevadas para Delta que para Ómicron en participantes vacunados, aunque no revelaron si los grupos de comparación estaban emparejados por el tiempo transcurrido desde la vacunación. A su vez, Puhach et al. (141) hallaron cargas de ARN viral comparables (valores de Ct del gen E) para ambas variantes en individuos que experimentaron infección por SARS-CoV-2 una media de aproximadamente 5 meses después de la vacunación, en consonancia con nuestras observaciones. En tercer lugar, el ensayo de viabilidad RT-PCR no reveló indicios de una mayor carga de ARN infeccioso en las muestras nasofaríngeas recogidas de pacientes infectados con la variante Ómicron o Delta, lo que coincide con los datos de un estudio anterior que utilizó un ensayo de formación de focos inducido por el virus (141), técnica utilizada en virología para cuantificar la capacidad de un virus para infectar células y replicarse dentro de ellas.

Las limitaciones del presente estudio son las siguientes:

- No pudimos descartar diferencias en la calidad (celularidad) de las muestras de los pacientes de los grupos de comparación, que podrían haber influido en las cargas de ARN viral medidas.
- No se realizaron cultivos virales para evaluar el contenido de partículas virales viables en las muestras nasofaríngeas recogidas de los pacientes de los dos grupos.
- No se dispuso de datos sobre las comorbilidades de los pacientes, que también podrían haber influido en la magnitud de las cargas de ARN viral en el tracto respiratorio superior (158).

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. El tiempo transcurrido tras la vacunación completa contra el SARS-CoV-2 tiene un impacto directo en la magnitud y la cinética de aclaramiento de las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior de los pacientes con enfermedad por COVID-19 causada por la variante Delta.
2. La prueba rápida de detección de antígenos de Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device para el diagnóstico de la variante Ómicron del COVID-19 tiene un rendimiento diagnóstico comparable al de la variante Wuhan-1.
3. Las subvariantes BA.1 y BA.2 de Ómicron generan cargas virales similares en el tracto respiratorio superior al principio de la infección por SARS-CoV-2 en el contexto de un brote de COVID-19 que se desarrolla en una población altamente vacunada.
4. Al igual que observamos con la variante Delta, el tiempo transcurrido tras la vacunación completa contra el SARS-CoV-2 tiene un impacto directo en la magnitud y la cinética de aclaramiento de las cargas de ARN del SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas de pacientes con COVID-19 causado por la variante Ómicron, especialmente para esta última.

Bibliografia

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hu, B, Guo, H, Zhou, P, Shi, Z L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021; 19(3):141–154. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, Groot RJ De, Gulyaeva AA, Haagmans BL, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv* [Internet]. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020; 5(4):536–44. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
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. *Lancet* [Internet]. 2020; 395(10224):565–74. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
5. Payne S. Family Coronaviridae. *Viruses*. 2017; 149–158. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9>
6. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* [Internet]. 2020; 19(100682):100682. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
7. Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler L-A, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2020; 27(10):959–66. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>
8. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The nonstructural proteins directing Coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv Virus Res* [Internet]. 2016; 96:59–126. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.008>
9. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* [Internet]. 2006; 66:193–292. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](http://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
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. *Adv Exp*

- Med Biol [Internet]. 2006; 581:163–73. Disponible en: http://ddoi.org/10.1007/978-0-387-33012-9_29
11. Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch B-J. Coronavirus spike protein and tropism changes. Adv Virus Res [Internet]. 2016; 96:29–57. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>
 12. Wong HH, Fung TS, Fang S, Huang M, Le MT, Liu DX. Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3. Virology [Internet]. 2018; 515:165–75. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.028>
 13. Azad GK, Khan PK. Variations in Orf3a protein of SARS-CoV-2 alter its structure and function. Biochem Biophys Rep [Internet]. 2021; 26(100933):100933. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100933>
 14. Ren Y, Shu T, Wu D, Mu J, Wang C, Huang M, et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. Cell Mol Immunol [Internet]. 2020; 17(8):881–3. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41423-020-0485-9>
 15. Coronavirus SARS-CoV-2: estructura, mecanismo de infección y células afectadas [Internet]. Genotipia. 2020. Disponible en: https://genotipia.com/genetica_medica_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/
 16. 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. J Pathol [Internet]. 2004; 203(2):631–7. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/path.1570>
 17. 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 [Internet]. 2003; 77(16):8801–11. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003>
 18. Li F. Structure, function, and evolution of Coronavirus spike proteins. Annu Rev Virol [Internet]. 2016; 3(1):237–61. Disponible en: <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
 19. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science [Internet]. 2020; 367(6483):1260–3. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.abb2507>

20. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veerler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* [Internet]. 2020; 181(2):281-292.e6. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
21. 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* [Internet]. 2021; 4:630955. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/frai.2021.630955>
22. 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* [Internet]. 2020; 581(7807):215–20. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
23. 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* [Internet]. 2011; 85(9):4122–34. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/JVI.02232-10>
24. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* [Internet]. 2015; 202:120–34. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
25. Mensa J, Soriano A, Lopez-Suñe E, Llinares, P, Barberan J, Poliakova Y. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2023. 33ª ed. Barcelona; Antares; 2023.
26. 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* [Internet]. 2021; 13(3). Disponible en: <http://doi.org/10.3390/v13030408>
27. Guo L, Wang M, Zhang L, Mao N, An C, Xu L, et al. Transmission risk of viruses in large mucosalivary droplets on the surface of objects: A time-based analysis. *Infect Dis Now* [Internet]. 2021; 51(3):219–27. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.idnow.2020.11.001>
28. Young M, Crook H, Scott J, Edison P. Covid-19: virology, variants, and vaccines. *BMJ Med* [Internet]. 2022; 1(1):e000040. Disponible en: <http://doi.org/10.1136/bmjmed-2021-000040>
29. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA*

- [Internet]. 2020; 323(13):1239–42. Disponible en: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
30. 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. *Environ Pollut* [Internet]. 2020; 265(Pt B):115010. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115010>
 31. Gancedo Alcalde I. Reacción inflamatoria del covid-19 comparada con otras respuestas inflamatorias graves. Zaragoza. Universidad de Zaragoza. 2021. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/111214/files/TAZ-TFG-2021-816.pdf>
 32. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* [Internet]. 2020; 395(10223):497–506. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
 33. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020; 395(10229):1033–4. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
 34. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020; 395(10223):507–13. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
 35. Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, Gary J, Bollweg BC, Bullock H, et al. Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal Coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020; 26(9):2005–15. Disponible en: <http://doi.org/10.3201/eid2609.202095>
 36. Zeng Z, Xu L, Xie X-Y, Yan H-L, Xie B-J, Xu W-Z, et al. Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion. *Histopathology* [Internet]. 2020; 77(5):823–31. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/his.14138>
 37. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with Coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2020; 180(7):934–43. Disponible en: <http://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>

38. Liu Y, Mao B, Liang S, Yang J-W, Lu H-W, Chai Y-H, et al. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *Eur Respir J* [Internet]. 2020; 55(5):2001112. Disponible en: <http://doi.org/10.1183/13993003.01112-2020>
39. 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* [Internet]. 2020; 21(7):893–903. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30309-0](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30309-0)
40. Yao XH, Li TY, He ZC, Ping YF, Liu HW, Yu SC, et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* [Internet]. 2020; 49(5):411–7. Disponible en: <http://doi.org/10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193>
41. Gao P, Liu J, Liu M. Effect of COVID-19 vaccines on reducing the risk of long COVID in the real world: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022; 19(19):12422. Disponible en: <http://doi.org/10.3390/ijerph191912422>
42. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* [Internet]. 2020; 323(11):1061–9. Disponible en: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
43. Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, Liang W-H, Ou C-Q, He J-X, et al. Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 2020; 382(18):1708–20. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
44. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, et al. Self-reported olfactory and taste disorders in patients with severe acute respiratory Coronavirus 2 infection: A cross-sectional study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020; 71(15):889–90. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/cid/ciaa330>
45. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 infection in children. *N Engl J Med* [Internet]. 2020; 382(17):1663–5. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMc2005073>
46. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet* [Internet]. 2020; 395(10226):809–15. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30360-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30360-3)

47. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* [Internet]. 2020; 11(1):3572. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41467-020-17436-6>
48. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ* [Internet]. 2020; 368:m1091. Disponible en: <http://doi.org/10.1136/bmj.m1091>
49. López-Sampalo A, Bernal-López MR, Gómez-Huelgas R. Persistent COVID-19 syndrome. A narrative review. *Rev Clin Esp (Barc)* [Internet]. 2022; 222(4):241–50. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.rceng.2021.10.001>
50. Bordi L, Nicastrì 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. *Euro Surveill* [Internet]. 2020; 25(8). Disponible en: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000170>
51. Chan JF-W, Yip CC-Y, To KK-W, Tang TH-C, Wong SC-Y, Leung K-H, 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. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020; 58(5). Disponible en: <http://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
52. 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* [Internet]. 2020; 382(12):1177–9. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>
53. 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. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020; 9(1):582–5. Disponible en: <http://doi.org/10.1080/22221751.2020.1735265>
54. Antigen detection in diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays, interim guidance. Organización Mundial de la Salud, 2020. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>
55. 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). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020; 71(15):778–85. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>

56. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2023;21(3):147–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>
57. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020; 579(7798):270–3. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
58. 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. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020; 505:172–5. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
59. 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* [Internet]. 2021; 12(1):267. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41467-020-20568-4>
60. 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. *J Med Virol* [Internet]. 2021; 93(1):48–50. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/jmv.26112>
61. 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* [Internet]. 2022; 12(1):7397. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41598-022-11439-7>
62. 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* [Internet]. 2021; 10(12):2696. Disponible en: <http://doi.org/10.3390/jcm10122696>
63. 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* [Internet]. 2020; 26(8):1920–2. Disponible en: <http://doi.org/10.3201/eid2608.200681>
64. 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* [Internet]. 2020; 92(9):1676–80. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/jmv.25936>

65. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambaut A, Lemey P, Baele G. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evol* [Internet]. 2020; 6(2):veaa061. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/ve/veaa061>
66. European Centre for Disease Prevention and Control/World Health Organization Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants: second update, August 2022. ECDC and WHO European Region: Stockholm and Copenhagen; 2022. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-characterisation-sars-cov-2-variants-second-update>
67. 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. *Microorganisms* [Internet]. 2021; 9(4):793. Disponible en: <http://doi.org/10.3390/microorganisms9040793>
68. 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* [Internet]. 2020; 78(4):779-784.e5. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
69. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell* [Internet]. 2020; 182(5):1295-1310.e20. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>
70. Huang Y, Yang C, Xu X-F, Xu W, Liu S-W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2020; 41(9):1141–9. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
71. Scudellari M. How the coronavirus infects cells - and why Delta is so dangerous. *Nature* [Internet]. 2021; 595(7869):640–4. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/d41586-021-02039-y>
72. 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* [Internet]. 2020; 183(3):739-751.e8. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>
73. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody

- escape. Science [Internet]. 2021; 371(6534):1139–42. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.abf6950>
74. 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 [Internet]. 2021; 372(6538):eabg3055. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.abg3055>
 75. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. Nature [Internet]. 2021; 593(7857):130–5. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
 76. Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling M-J, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. EBioMedicine [Internet]. 2021; 71(103561):103561. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103561>
 77. Who.int. Coronavirus disease (COVID-19): vaccines. World health organization. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
 78. Plante JA, Liu Y, Liu J, Xia H, Johnson BA, Lokugamage KG, et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. Nature [Internet]. 2021; 592(7852):116–21. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
 79. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell [Internet]. 2020; 182(4):812–827.e19. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
 80. Volz E, Hill V, McCrone JT, Price A, Jorgensen D, O'Toole Á, et al. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. Cell [Internet]. 2021; 184(1):64–75.e11. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.020>
 81. 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 [Internet]. 2022; 77(1):111–7. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/all.15065>
 82. 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 [Internet]. 2021; 93(9):5638–43. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/jmv.27062>
83. 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 [Internet]. bioRxiv. 2021. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/2021.08.30.458303>
 84. Torjesen I. Covid-19: Delta variant is now UK's most dominant strain and spreading through schools. BMJ [Internet]. 2021; 373:n1445. Disponible en: <http://doi.org/10.1136/bmj.n1445>
 85. Reuters.com. Delta COVID variant now dominant strain worldwide, U.S. deaths surge-officials. O'donnell C, Mason J, Reuters. Disponible en: <https://www.reuters.com/business/healthcare-pharmaceuticals/delta-covid-variant-now-dominant-worldwide-drives-surge-us-deaths-officials-2021-07-16/>
 86. Euro.who.int. SARS-CoV-2 delta variant now dominant in much of European region; efforts must be reinforced to prevent transmission, warns who regional office for Europe and ECDC. World health organization. Disponible en: <https://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2021/sars-cov-2-delta-variant-now-dominant-in-much-of-european-region-efforts-must-be-reinforced-to-prevent-transmission,-warns-who-regional-office-for-europe-and-ecdc>
 87. Kumar A, Asghar A, Raza K, Narayan RK, Jha RK, Satyam A, et al. Demographic characteristics of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) variant infections in Indian population [Internet]. bioRxiv. 2021. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2021.09.23.21263948>
 88. Sheikh A, McMenamin J, Taylor B, Robertson C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. Lancet [Internet]. 2021; 397(10293):2461–2. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01358-1](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01358-1)
 89. Deerrain J, Druce J, Tran T, Batty M, Yoga Y, Fennell M, et al. Assessment of the analytical sensitivity of 10 lateral flow devices against the SARS-CoV-2 omicron variant. J Clin Microbiol [Internet]. 2022; 60(2):e0247921. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/jcm.02479-21>
 90. Ecdc.europa.eu. SARS-CoV-2 variants of concern as of 20 January 2022. European centre for disease prevention and control. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

91. 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* [Internet]. 2022; 602(7898):664–70. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-021-04386-2>
92. Cao Y, Wang J, Jian F, Xiao T, Song W, Yisimayi A, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature* [Internet]. 2022; 602(7898):657–63. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-021-04385-3>
93. Med.hku.hk. HKUMed finds omicron SARS-CoV-2 can infect faster and better than delta in human bronchus but with less severe infection in lung. The University of Hong Kong, LKS faculty of medicine. Disponible en: <https://www.med.hku.hk/en/news/press/20211215-omicron-sars-cov-2-infection>
94. Sheikh A, Kerr S, Woolhouse M, McMenamin J, Robertson C, EAVE II Collaborators. 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* [Internet]. 2022; 22(7):959–66. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00141-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00141-4)
95. Imperial College Covid-19 Response Team. Report 49: growth, population distribution and immune escape of omicron in England, 2021. Disponible en: <https://www.imperial.ac.uk/media/imperial-college/medicine/mrc-gida/2021-12-16-COVID19-Report-49.pdf>
96. BA.2 lineage report. Outbreak.info. Disponible en: <https://outbreak.info/situation-reports?pango=BA.2>
97. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19 - final report. *N Engl J Med* [Internet]. 2020; 383(19):1813–26. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>
98. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021;384(8):693–704. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2021436>
99. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant* [Internet]. 2020; 39(5):405–7. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>
100. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: Status report. *Immunity* [Internet]. 2020; 52(4):583–9. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007>

101. Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, et al. A comprehensive review of mRNA vaccines. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032700>
102. covid19.trackvaccines.org. COVID-19 vaccine Tracker. Disponible en: <https://covid19.trackvaccines.org/>
103. Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* [Internet]. 2020; 383(25):2439–50. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>
104. Beatty AL, Peyser ND, Butcher XE, Cocohoba JM, Lin F, Olgin JE, et al. Analysis of COVID-19 vaccine type and adverse effects following vaccination. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021; 4(12):e2140364. Disponible en: <http://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.40364>
105. Barda N, Dagan N, Ben-Shlomo Y, Kepten E, Waxman J, Ohana R, et al. Safety of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine in a nationwide setting. *N Engl J Med* [Internet]. 2021; 385(12):1078–90. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2110475>
106. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* [Internet]. 2021; 384(5):403–16. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
107. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Triggler CR. A review of the progress and challenges of developing a vaccine for COVID-19. *Front Immunol* [Internet]. 2020; 11:585354. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585354>
108. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2020; 396(10249):467–78. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
109. Al Khames Aga QA, Alkhaffaf WH, Hatem TH, Nassir KF, Batineh Y, Dahham AT, et al. Safety of COVID-19 vaccines. *J Med Virol* [Internet]. 2021; 93(12):6588–94. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/jmv.27214>
110. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. *N Engl J*

- Med [Internet]. 2021; 384(23):2187–201. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>
111. Salmerón Ríos S, Mas Romero M, Cortés Zamora EB, Tabernero Sahuquillo MT, Romero Rizos L, Sánchez-Jurado PM, et al. Immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in frail or disabled nursing home residents: COVID-A study. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2021; 69(6):1441–7. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/jgs.17153>
 112. 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* [Internet]. 2021;83(4):e1–3. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.027>
 113. Costa R, Olea B, Bracho MA, Albert E, de Michelena P, Martínez-Costa C, et al. 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* [Internet]. 2022;84(4):579–613. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.018>
 114. Chia PY, Xiang Ong SW, Chiew CJ, Ang LW, Chavatte J-M, Mak T-M, et al. Virological and serological kinetics of SARS-CoV-2 Delta variant vaccine-breakthrough infections: a multi-center cohort study [Internet]. *bioRxiv*. 2021. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2021.07.28.21261295>
 115. Singanayagam A, Hakki S, Dunning J, Madon KJ, Crone MA, Koycheva A, et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2022; 22(2):183–95. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00648-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00648-4)
 116. Siedner MJ, Boucau J, Gilbert RF, Uddin R, Luu J, Haneuse S, et al. Duration of viral shedding and culture positivity with postvaccination SARS-CoV-2 delta variant infections. *JCI Insight* [Internet]. 2022; 7(2). Disponible en: <http://doi.org/10.1172/jci.insight.155483>
 117. Levine-Tiefenbrun M, Yelin I, Alapi H, Katz R, Herzel E, Kuint J, et al. Viral loads of Delta-variant SARS-CoV-2 breakthrough infections after vaccination and booster with BNT162b2. *Nat Med* [Internet]. 2021; 27(12):2108–10. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41591-021-01575-4>

118. Drain PK. Rapid diagnostic testing for SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2022; 386(3):264–72. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMcp2117115>
119. Kontogianni K, Cubas-Atienzar AI, Wooding D, Buist K, Thompson CR, Williams CT, et al. Lateral flow antigen tests can sensitively detect live cultured virus of the SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage. *J Infect* [Internet]. 2021; 83(1):e1–4. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.05.033>
120. Jian M-J, Chung H-Y, Chang C-K, Lin J-C, Yeh K-M, Chen C-W, et al. SARS-CoV-2 variants with T135I nucleocapsid mutations may affect antigen test performance. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2022; 114:112–4. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.006>
121. van Ogtrop ML, van de Laar TJW, Eggink D, Vanhommerig JW, van der Reijden WA. Comparison of the performance of the PanBio COVID-19 antigen test in SARS-CoV-2 B.1.1.7 (alpha) variants versus non-B.1.1.7 variants. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021; 9(3):e0088421. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/Spectrum.00884-21>
122. [https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-dev....](https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-dev...) 2022.
123. Tegally H, Moir M, Everatt J, Giovanetti M, Scheepers C, Wilkinson E, et al. Continued emergence and evolution of Omicron in South Africa: New BA.4 and BA.5 lineages [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.05.01.22274406>
124. La actualización de casos de COVID se realiza 2 veces a la semana. Los datos están actualizados a 19-08-2022. 2022. Accessed May 23, 2022. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActu...>
125. World Health Organization Statement on Omicron Sublineage BA.2, 2022. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage...>
126. Lyngse FP, Kirkeby CT, Denwood M, Christiansen LE, Mølbak K, Møller CH, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Omicron VOC subvariants BA.1 and BA.2: Evidence from Danish households [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.01.28.22270044>
127. Evans JP, Zeng C, Qu P, Faraone J, Zheng Y-M, Carlin C, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sub-lineages BA.1, BA.1.1, and BA.2. *Cell Host Microbe*

- [Internet]. 2022; 30(8):1093-1102.e3. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2022.04.014>
128. Yu J, Collier A-RY, Rowe M, Mardas F, Ventura JD, Wan H, et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2 variants. *N Engl J Med* [Internet]. 2022; 386(16):1579–80. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMc2201849>
 129. Dimeglio C, Loubes J-M, Miguères M, Sauné K, Trémeaux P, Lhomme S, et al. Influence of vaccination and prior immunity on the dynamics of Omicron BA.1 and BA.2 sub-variants. *J Infect* [Internet]. 2022; 84(6):834–72. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.03.014>
 130. Marking U, Havervall S, Greilert Norin N, Bladh O, Christ W, Gordon M, et al. Correlates of protection, viral load trajectories and symptoms in BA.1, BA.1.1 and BA.2 breakthrough infections in triple vaccinated healthcare workers [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.04.02.22273333>
 131. Lentini A, Pereira A, Winqvist O, Reinius B. Monitoring of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1/BA.2 variant transition in the Swedish population reveals higher viral quantity in BA.2 cases [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.03.26.22272984>
 132. Qassim SH, Chemaitelly H, Ayoub HH, AlMukdad S, Tang P, Hasan MR, et al. Effects of BA.1/BA.2 subvariant, vaccination and prior infection on infectiousness of SARS-CoV-2 omicron infections. *J Travel Med* [Internet]. 2022; 29(6). Disponible en: <http://doi.org/10.1093/jtm/taac068>
 133. Singh J, Panwar A, Anantharaj A, Rani C, Bhardwaj M, Kumar P, et al. BA.1 and BA.2 sub-lineages of Omicron variant have comparable replication kinetics and susceptibility to neutralization by antibodies [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.01.28.22269990>
 134. World Health Organization Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 variant of concern. Disponible en: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1....](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1....)
 135. Espenhain L, Funk T, Overvad M, Edslev SM, Fonager J, Ingham AC, et al. Epidemiological characterisation of the first 785 SARS-CoV-2 Omicron variant cases in Denmark, December 2021. *Euro Surveill* [Internet]. 2021; 26(50). Disponible en: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.50.2101146>
 136. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the omicron (B.1.1.529) variant. *N Engl J Med*

- [Internet]. 2022; 386(16):1532–46. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>
137. Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell* [Internet]. 2022; 185(3):447-456.e11. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.032>
 138. Cele S, Jackson L, Khoury DS, Khan K, Moyo-Gwete T, Tegally H, et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* [Internet]. 2022; 602(7898):654–6. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41586-021-04387-1>
 139. Grabowski F, Kochańczyk M, Lipniacki T. The spread of SARS-CoV-2 Variant Omicron with a doubling time of 2.0-3.3 days can be explained by immune evasion. *Viruses* [Internet]. 2022; 14(2):294. Disponible en: <http://doi.org/10.3390/v14020294>
 140. Miguères M, Dimeglio C, Trémeaux P, Abravanel F, Raymond S, Lhomme S, et al. Influence of immune escape and nasopharyngeal virus load on the spread of SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Infect* [Internet]. 2022; 84(4):e7–9. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.036>
 141. Puhach O, Adea K, Hulo N, Sattoune P, Genecand C, Iten A, et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated patients infected with SARS-CoV-2 WT, Delta and Omicron. *Nat Med*. 2022; 28:1491–1500. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.01.10.22269010>
 142. Jung C, Kmiec D, Koepke L, Zech F, Jacob T, Sparrer KMJ, et al. Omicron: What makes the latest SARS-CoV-2 variant of concern so concerning? *J Virol* [Internet]. 2022; 96(6):e0207721. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/jvi.02077-21>
 143. Rath SL, Padhi AK, Mandal N. Scanning the RBD-ACE2 molecular interactions in Omicron variant. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2022; 592:18–23. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.006>
 144. Wu L, Zhou L, Mo M, Liu T, Wu C, Gong C, et al. SARS-CoV-2 Omicron RBD shows weaker binding affinity than the currently dominant Delta variant to human ACE2. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022; 7(1):8. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41392-021-00863-2>
 145. de Michelena P, Torres I, Albert E, Bracho A, González-Candelas F, Navarro D. Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in Delta-

- variant breakthrough COVID-19. *J Infect* [Internet]. 2022; 84(4):579–613. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.006>
146. Levine-Tiefenbrun M, Yelin I, Alapi H, Herzel E, Kuint J, Chodick G, et al. Waning of SARS-CoV-2 booster viral-load reduction effectiveness. *Nat Commun* [Internet]. 2022; 13(1):1237. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41467-022-28936-y>
 147. Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Pérez-Cataluña A, Falcó I, Navarro D, Martin-Latil S, et al. Platinum chloride-based viability RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection in complex samples. *Sci Rep* [Internet]. 2021; 11(1):18120. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41598-021-97700-x>
 148. <https://covdb.stanford.edu/page/mutation-viewer/omicron>. 2022.
 149. 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* [Internet]. 2021; 27(3):472.e7-472.e10. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.004>
 150. Adamson B, Sikka R, Wyllie AL, Premsrirut P. Discordant SARS-CoV-2 PCR and rapid antigen test results when infectious: A December 2021 occupational case series [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2022.01.04.22268770>
 151. Bekliz M, Perez-Rodriguez F, Puhach O, Adea K, Melancia SM, Baggio S, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests for Omicron variant [Internet]. *bioRxiv*. 2021. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2021.12.18.21268018>
 152. Bojkova D, Widera M, Ciesek S, Wass MN, Michaelis M, Cinatl J Jr. Reduced interferon antagonism but similar drug sensitivity in Omicron variant compared to Delta variant of SARS-CoV-2 isolates. *Cell Res* [Internet]. 2022; 32(3):319–21. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41422-022-00619-9>
 153. Krammer F, Srivastava K, Alshammary H, Amoako AA, Awawda MH, Beach KF, et al. Antibody responses in seropositive persons after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *N Engl J Med* [Internet]. 2021; 384(14):1372–4. Disponible en: <http://doi.org/10.1056/NEJMc2101667>
 154. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with

- SARS-CoV-2. *Nat Med* [Internet]. 2021; 27(6):981–4. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41591-021-01325-6>
155. Stamatatos L, Czartoski J, Wan Y-H, Homad LJ, Rubin V, Glantz H, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science* [Internet]. 2021; 372(6549):1413–8. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.abg9175>
 156. Yamasoba D, Kimura I, Nasser H, Morioka Y, Nao N, Ito J, et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. *Cell* [Internet]. 2022; 185(12):2103-2115.e19. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.035>
 157. Peacock TP, Brown JC, Zhou J, Thakur N, Newman J, Kugathasan R, et al. 2022. The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry [Internet]. *bioRxiv*. 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.1101/2021.12.31.474653>
 158. Maltezou HC, Raftopoulos V, Vorou R, Papadima K, Mellou K, Spanakis N, et al. Association between upper respiratory tract viral load, comorbidities, disease severity, and outcome of patients with SARS-CoV-2 infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2021; 223(7):1132–8. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiaa804>

Anexos

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

Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in Delta-variant breakthrough COVID-19. J Infect. 2022 Apr; 84(4):579-613.

Paula de Michelena (1), Ignacio Torres (1), Eliseo Albert (1), Alma Bracho (2, 3), Fernando González-Candelas (2, 3), David Navarro (1, 4).

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 Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Paula de Michelena 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

28,2

Artículo II

Real-life performance of a COVID-19 rapid antigen detection test targeting the SARS-CoV-2 nucleoprotein for diagnosis of COVID-19 due to the Omicron variant. J Infect. 2022 May; 84(5):e64-e66.

Paula de Michelena (1), Ignacio Torres (1), Ángela Ramos-García (2), Victoria Gozalbes (3), Nidia Ruiz (4), Ana Sanmartín (5), Pilar Botija (5), Sandrine Poujois (1), Dixie Huntley (1), Eliseo Albert (1), David Navarro (1, 6).

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

2.-Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, Centro de Salud Benimaclet, Valencia, España.

3.-Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, Centro de Salud Salvador Pau, Valencia, España.

4.-Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, Centro de Salud Serrería, Valencia, España.

5.-Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa, Dirección de Atención Primaria, Valencia, España.

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

Contribución del aspirante:

Paula de Michelena 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

28,2

Artículo III

SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens from outpatients with breakthrough COVID-19 due to Omicron BA.1 and BA.2. J Med Virol. 2022 Dec; 94(12):5836-5840.

Paula de Michelena (1), Beatriz Olea (1), Ignacio Torres (1), Fernando González-Candelas (2, 3), David Navarro (1, 4).

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 Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Paula de Michelena 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

12,7

Artículo IV

RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with breakthrough coronavirus disease 2019 caused by the Delta and Omicron variants. Clin Microbiol Infect. 2023 Feb; 29(2):256.e1-256.e4.

Paula de Michelena (1), Ignacio Torres (1), Enric Cuevas-Ferrando (2), Beatriz Olea (1), Fernando González-Candelas (3, 4), Gloria Sánchez (2), David Navarro (1, 5).

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

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

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

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

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

Contribución del aspirante:

Paula de Michelena 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

14,2

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 la doctoranda, Paula de Michelena, 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, Paula de Michelena, 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

10. Tian D., Sun Y., Zhou J., Ye Q. The global epidemic of the SARS-CoV-2 delta variant, key spike mutations and immune escape. *Front Immunol* 2021;12:751778 PubMed PMID: 34917076. Pubmed Central PMCID: PMC8669155. Epub 2021/12/18. eng.

Xiucui Han¹

Department of Clinical Laboratory, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou, 310052, China

Pengfei Xu¹

Clinical Laboratory, Zhejiang Hospital, Hangzhou, China

Hao Wang¹

Department of Clinical Laboratory, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou, 310052, China

Jianhua Mao*

Department of nephrology, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou 310052, China

Qing Ye*

Department of Clinical Laboratory, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou, 310052, China

*Corresponding authors: Department of Clinical Laboratory, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou, 310052, China
E-mail addresses: maojh88@zju.edu.cn (J. Mao), qingye@zju.edu.cn (Q. Ye)

¹ These authors contributed equally to this work.

Accepted 4 January 2022

Available online 10 January 2022

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.007>

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

Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in Delta-variant breakthrough COVID-19



Dear Editor,

We recently commented on the study by Teyssou and colleagues¹ showing substantial differences across SARS-CoV-2 variants of concern RNA loads in the upper respiratory tract (URT). Regarding the Delta variant, we reported a trend towards higher viral loads in non-vaccinated individuals with COVID-19 compared to those vaccinated with a variety of COVID-19 vaccines.² A number of studies concur on that although SARS-CoV-2 RNA loads in the upper respiratory tract of individuals with Delta variant breakthrough infection are comparable to those found in unvaccinated infected individuals, viral RNA clearance seemingly proceeds at a faster rate in the former subjects.^{3–6} Nevertheless, analyzes in

these studies were not stratified by either time elapsed since full COVID-19 vaccination^{3–5} or clinical status (asymptomatic vs. symptomatic) at the time of RT-PCR diagnosis.^{3–6} Here, we add nuances to the aforementioned assumption by showing that among patients with breakthrough COVID-19, both the magnitude and dynamics of Delta variant RNA load in URT are markedly affected by time elapsed since full COVID-19 vaccination.

The current observational study included a convenience sample of 107 individuals (57 female; median age, 62 years; range, 50–94) who developed breakthrough COVID-19 at a median of 65 days (range, 17–199) after completion of the vaccination schedule with Comirnaty® ($n = 73$), Spikevax® ($n = 13$), Vaxzevria® ($n = 12$) or Janssen COVID-19 vaccine ($n = 9$). Diagnosis of SARS-CoV-2 infection was achieved by RT-PCR (TaqPath COVID-19 Combo Kit; Thermo Fisher Scientific, MS, USA)² in nasopharyngeal specimens collected within the first 4 days after symptoms onset. SARS-CoV-2 RNA loads were estimated using the AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Vircell SA, Granada, Spain), and are reported as copies/ml throughout the study. Delta variant involvement was identified by whole-genome sequencing.

None of the participants in our sample had an immunosuppressive condition or was under immunosuppressive therapy at the time of symptoms onset. Most patients presented with mild disease ($n = 105$), whereas 16 had to be hospitalized (one in the intensive care unit). We arbitrarily stratified participants according to time elapsed between full vaccination and symptoms onset into three groups, which were balanced regarding participant numbers: Group 1: 15–45 days, Group 2: 46–90 days and Group 3: 91–200 days (Supplementary Table 1). Participants differed significantly across groups in age and hospitalization rate (older age and more hospital admissions in Group 3) and vaccine used, but were comparable regarding time interval between symptoms onset and RT-PCR diagnosis (median, 2 days) and sex. Taking the cohort as a whole, we noticed an increase in initial SARS-CoV-2 RNA loads in NP, positively associated with time since vaccination, irrespective of the vaccine used (Fig. 1A), although a clear trend towards lower initial SARS-CoV-2 RNA load was observed in participants in Group 1 compared to the other two groups. By analyzing SARS-CoV-2 RNA load trajectory over time since symptom onset (Fig. 1B) we observed a seemingly faster viral RNA load decay in patients in Group 1. To rule out bias related to vaccine used, we next performed a similar analysis restricted to subjects vaccinated with Comirnaty®, the vaccine used in the majority of participants in the current cohort (Supplementary Table 2). As depicted in Figure 2C, initial SARS-CoV-2 RNA loads gradually increased with time elapsed since vaccination, with significant differences in viral loads between participants in Groups 1 and 3 ($P = 0.03$). Again, viral load decrease appeared faster in patients in Group 1 than in the other two study groups (Fig. 1D).

Beyond the relatively modest sample size, our study has several further limitations. First, Delta variant peak RNA loads may have been reached before symptoms appeared, and not uniformly across participants in the study groups. Second, patients in Group 3 were much older than those in the remaining groups; it is possible that elderly individuals may exhibit different kinetics of SARS-CoV-2 Delta variant RNA load in URT, post-vaccination waning of immune responses, or both, compared to patients in the remaining study groups. Third, sequential NP specimens from participants were not available for analyzes.

Our data highlight the impact of time elapsed since full vaccination on the magnitude and decay kinetics of SARS-CoV-2 RNA loads in URT in COVID-19 patients during Delta variant breakthrough infections, and are in line with results published in a recent study⁶. How dissimilarities in viral loads translate into differences in infectiousness needs to be assessed. Disappearance of vaccine-elicited immune responses over time likely account for our

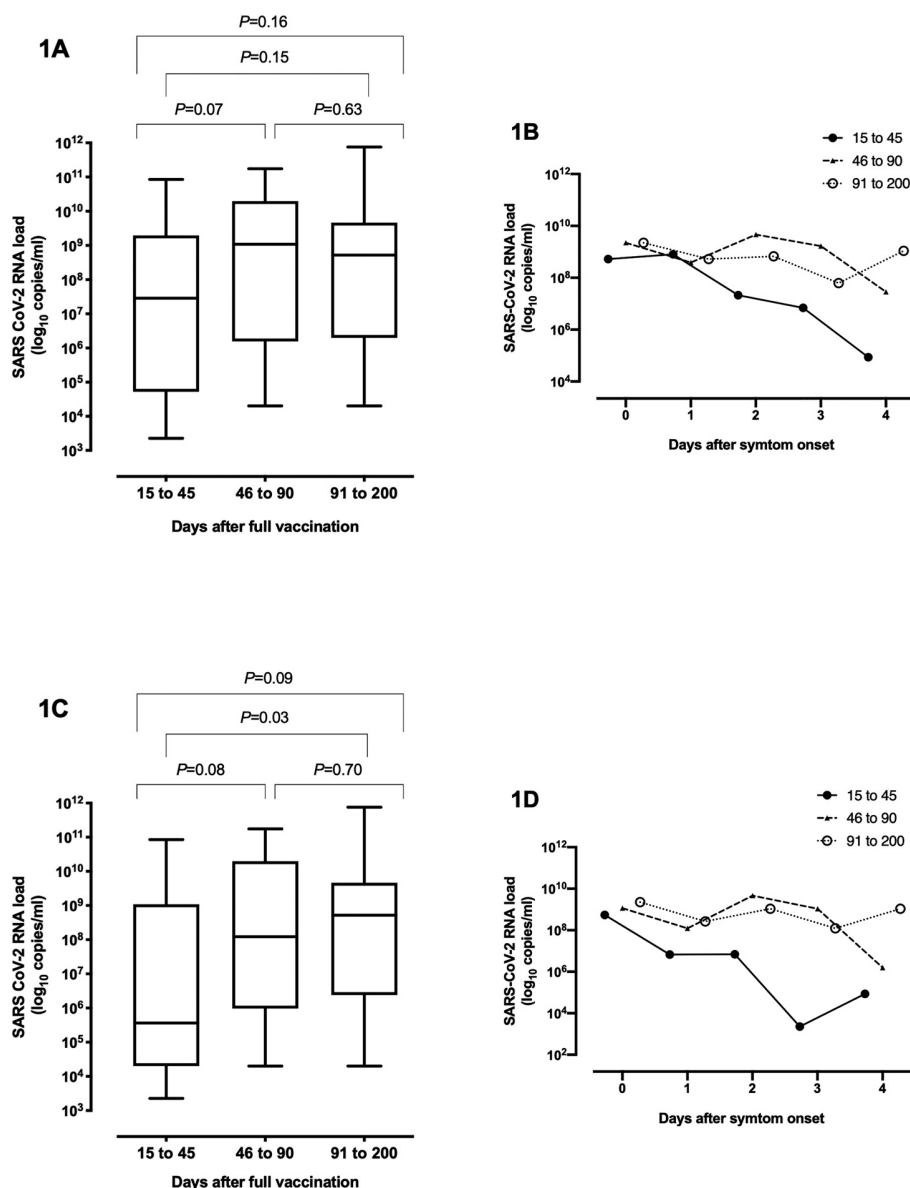


Fig. 1. SARS-CoV-2 Delta variant RNA load in the upper respiratory tract of individuals with breakthrough COVID-19 according to time elapsed since full vaccination. (A) Box-Whisker plot depicting initial SARS-CoV-2 RNA loads in all participants; (B) Kinetics of SARS-CoV-2 RNA load over the first 4 days after symptoms in all participants; (C) Box-Whisker plot depicting initial SARS-CoV-2 RNA loads in participants vaccinated with the Comirnaty® vaccine; (D) Kinetics of SARS-CoV-2 RNA load over the first 4 days after symptoms in participants vaccinated with the Comirnaty® vaccine. *P* values are shown for comparisons (Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test, as appropriate).

findings, which should be verified in larger studies due to their potential public health implications.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Ignacio Torres (Río Hortega Contract; CM20/00090) and Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) hold contracts funded by the Health Institute Carlos III (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER).

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.2022.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.006).

References

1. 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 Oc1.
2. Costa R, Olea B, Bracho M.A., Albert E, de Michelena P, Martínez-Costa C, et al. 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* 2021;**S0163-4453**(21) 00641-1.
3. Chia P.Y., Xiang Ong S.W., Chiew C.J., Ang L.W., Chavatte J.M., Mak T.M., et al. Virological and serological kinetics of SARS-CoV-2 Delta variant vaccine-breakthrough infections: a multi-center cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2021;**S1198-743X**(21) 00638-8.

4. Singanayagam A., Hakki S., Dunning J., Madon K.J., Crone M.A., Koycheva A., et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021;**S1473-3099**(21) 00648–4.
5. Siedner M.J., Boucau J., Gilbert R.F., Uddin R., Luu J., Haneuse S., et al. Duration of viral shedding and culture positivity with post-vaccination SARS-CoV-2 delta variant infections. *JCI Insight* 2021:e155483. doi:10.1172/jci.insight.155483.
6. Levine-Tiefenbrun M., Yelin I., Alapi H., Katz R., Herzel E., Kuint J., et al. Viral loads of Delta-variant SARS-CoV-2 breakthrough infections after vaccination and booster with BNT162b2. *Nat Med* 2021 Nov 2. doi:10.1038/s41591-021-01575-4.

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

Alma Bracho, 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*
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 4 January 2022
Available online 10 January 2022

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.006>

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

Regular and booster vaccination with inactivated vaccines enhance the neutralizing activity against Omicron variant both in the breakthrough infections and vaccinees



Dear Editor,

Recent articles in this Journal have reported the cross-neutralization of SARS-CoV-2 variants in individuals of vaccinees and convalescents, and compared the clinical features of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) by SARS-CoV-2 Gamma variant based on a prospective cohort study of vaccinated and unvaccinated healthcare workers^{1,2}. The emergence of SARS-CoV-2 variants with higher transmission ability and immune evasion against monoclonal antibodies, sera from natural infection and vaccine receipts, posing a serious threat to public health. On 26 November 2021, the World Health Organization named the new SARS-CoV-2 variant B.1.1.529 as Omicron, and defined it as a Variant of Concern (VOC). As the fifth VOCs currently, Omicron contains much more mutations in the Spike protein, including some mutations shown to reduce neutralizing efficiencies of COVID-19 vaccines in previous studies³. As the pandemic of COVID-19 has lasted for nearly two years, there are more and more convalescents either previously infected with wild-type SARS-CoV-2 or recently

emerged variants. Meanwhile, booster vaccination of SARS-CoV-2 is now rapidly rolling out in China and other countries. Accordingly, neutralizing efficiency of convalescents and vaccinees with booster vaccination against the newly emerged Omicron variant needs further elucidation. Here we evaluated the neutralizing activity of plasma from the COVID-19 convalescents with wild type SARS-CoV-2 and different VOCs, and vaccinees with both regular vaccination and homologous booster of inactivated vaccine.

A total of 92 participants were included in this study, including 24 vaccinees with homologous booster vaccination (Vaccinee group), 26 individuals previously infected with wild type (WT) SARS-CoV-2 (WT group), 16 patients infected with Alpha variant (Alpha group), 12 patients received vaccination before infection), 6 patients infected with Beta variant (Beta group), and 20 patients infected with Delta variant (Delta group, 4 patients received vaccination before infection). All the individuals with breakthrough infection received at least one-dose inactivated vaccines (CoronaVac or BBIBP-CorV before laboratory confirmation of infection, and individuals in the vaccinee group received inactivated vaccines (BBIBP-CorV) and homologous booster vaccination. The detailed information was shown in **Table S1**. All the plasma samples in the WT group were collected over 386 days post illness onset/laboratory confirmation (median: 431.5; range: 386–471), and most samples (40/42, 95.23%) in the Alpha, Beta, Delta groups were collected over 7 days after laboratory confirmation (median: 18; range: 1–36). Samples from the vaccinee group were collected after the two dose of vaccination with median days of 85 (range: 28–103), and 95 days after booster vaccination.

For the WT group, about 46.15% (12/26) of the samples showed inhibition rates over 50% against Omicron variant at the first dilution (1:20). The geometric mean neutralizing titers (GMTs) against wild type SARS-CoV-2 (WT) and Omicron variant were 154.07 (54.64 to 1018.82), 22.96 (10 to 145.38), respectively, and the reduction fold was 6.71 for Omicron (**Fig. 1A**). This reduction is comparable with Mu variant while higher than Alpha, Beta, Gamma, Delta, Lambda variants⁴. For the Alpha group, all the samples from breakthrough infections showed detectable 50% inhibitory dose (ID₅₀) against Omicron variant, while 50% (2/4) were below the lower limit of quantitation in the naive infections. The overall GMTs against Alpha and Omicron variants were 7198.43 and 285 respectively, with 25.26-fold reduction for the Omicron variant (**Fig. 1B**). Comparison between breakthrough and naive infection showed significantly higher ID₅₀ against both Alpha (9.33-fold) and Omicron variants (5.61-fold) in the breakthrough infection (**Fig. 1B**). Similar results were found in the Delta group, with all the samples from breakthrough infection showed detectable ID₅₀ against Omicron variant, while 1 out of 16 was below the lower limit of quantitation in the naive infection. The overall GMTs against Delta and Omicron variants were 10,898.97 and 558.44, respectively, with 19.52-fold reduction for the Omicron variant (**Fig. 1D**). Significantly higher ID₅₀ against both Delta (3.25-fold) and Omicron variants (1.77-fold) were also found in the breakthrough infections (**Fig. 1D**). For the Beta group, we only got the naive infections, and reduced neutralizing activities were also found with 18.38-fold reduction against the Omicron variant (**Fig. 1C**).

In the Vaccinee group, 91.66 (22/24) showed detectable ID₅₀ against wild type SARS-CoV-2 at 95 days post booster vaccination with GMT of 299, and 1.67-fold, 14.52-fold, 3.72-fold and 6.73-fold reduction against Alpha, Beta, Gamma and Delta variants were found, respectively (**Fig. 2A**). Notably, only 25% (6/24) of the samples showed detectable ID₅₀ against Omicron, with 16.07-fold reduction when compared with wild type SARS-CoV-2. We further compared the neutralization activity before and after booster vaccination against different VOCs. After booster vaccination, GMTs against wild type, Alpha, Beta, Gamma, Delta increased 13.47-fold,



Letter to the Editor

Real-life performance of a COVID-19 rapid antigen detection test targeting the SARS-CoV-2 nucleoprotein for diagnosis of COVID-19 due to the Omicron variant


To the Editor,

Rapid antigen detection tests (RADT) targeting the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) displaying a sensitivity over 80% have been proven useful for early diagnosis of SARS-CoV-2 infection in symptomatic individuals.¹ These RADT were optimized for detection of the ancestral Wuhan-Hu-1 variant, and the emergence of SARS-CoV-2 variants which incorporate non-synonymous mutations within the amino acid sequence of NP may impact on the diagnostic efficiency of RADT; thus, as pointed out by Kontogianni and colleagues in an study recently published in the Journal of Infection,² RADT assays should be evaluated for their performance in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection due to variants of concern. In this context, two studies^{3,4} showed that the Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Abbott Diagnostic GmbH, Jena, Germany) had decreased sensitivity for detection of SARS-CoV-2 Alpha (B.1.1.7) variant compared to non-alpha lineages. As in many other countries, the SARS-CoV-2 Omicron variant has overtaken the Delta variant and currently dominates in Spain. It has been suggested that RADT may be less sensitive for detecting the Omicron variant,⁵ but this assumption lacks support by real-life RADT performance studies. Here, we conducted a prospective study in primary health centers to evaluate the clinical performance of the Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device in nasopharyngeal specimens (NP) carried out at the point of care for diagnosis of Omicron variant COVID-19.

In the current observational prospective study, 244 consecutive patients (median age, 40 years; range 2–96; 141 female) with clinical suspicion of COVID-19, 232 of whom were adults (median age, 41 years; range, 17–96) and 12 children (median age, 15 years; range, 2–16), attending three randomly selected primary care centers affiliated to the Clínico-Malvarrosa Health Department in Valencia (Spain) were recruited between January 10 and January 21. Only patients with symptoms developing within the previous 5 days were enrolled. Of interest, 228 patients had been fully vaccinated (two doses) with licensed COVID-19 vaccines prior to recruitment and 222 had no historical records of previous SARS-CoV-2 infection at the time of enrollment. The study was approved by the Hospital Clínico de Valencia (HCU) INCLIVA Research Ethics Committee. Since the testing strategy was considered as regular clinical practice according to local health authorities, written informed consent was waived by this committee. Two NPs were collected per patient, one of which (provided by the manufacturer) was used for RADT while the other was placed in 3 mL of universal transport medium (DeltaSwab Virus, Deltalab, Barcelona, Spain) and delivered to the HCU Microbiology Service for RT-PCR testing. RADT was performed immediately after sampling following

the manufacturer's instructions. RT-PCRs were carried out within 24 h of specimen collection with the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) which targets SARS-CoV-2 ORF1ab, N and S genes. RNA was extracted using the Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kits coupled with Thermo Scientific™ KingFisher Flex automated instrument.⁶ The AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 Control (Viracell SA, Granada, Spain) was used as the reference material for SARS-CoV-2 RNA load quantification.⁶ The S-gene dropout RT-PCR profile was uniformly associated with the Omicron variant within the study period, as confirmed by whole-genome sequencing (not shown).

In all, 126 patients (51.6%) tested positive by both RT-PCR and RADT and 90 patients (36.8%) returned negative results by both assays. In turn, 28 patients (11.4%) yielded discordant results (RT-PCR+/RADT-). Concordance between the results provided by the two assays was good (Cohen's κ statistics: κ , 0.78; 95% CI, 0.69–0.85). Importantly, time to specimen collection was comparable ($P = 0.69$) between RT-PCR+/RADT+ and RT-PCR+/RADT- patients (median 2 days; range, 0–5).

Median viral RNA load was significantly higher ($P < 0.0001$; Mann-Whitney U test) in RT-PCR+/RADT+ specimens than in those returning RT-PCR+/RADT- results (Fig. 1). Overall specificity and sensitivity of RADT was 100% (95% CI, 95.9–100%) and 81.8% (95% CI, 75–87.1%), respectively. As shown in Table 1, RADT assay sensitivity increased in parallel with SARS-CoV-2 RNA load, reaching 95.6% in specimens with viral loads ≥ 7.5 log₁₀ copies/ml ($C_T \leq 20$). Interestingly, the sensitivity of the assay increased from 79.6% (95% CI, 66.4–88.5) when considering specimens collected at days 0–1 after symptoms onset, to 86.4% (95% CI, 66.7–95.3) when grouping the specimens obtained on days 4–5 (Supplementary Table 1). Overall, RADT negative predictive value for an estimated prevalence of 30% and 35% (representative of our Health Department during the study period) was 92.8% (95% CI, 85.8–96.5) and 91.1% (95% CI, 82.8–95.6), respectively.

The SARS-CoV-2 Omicron variant carries one or more mutations in the NP gene (P13L, Del31–33, R203 K and G203 K)⁷ that may impact on the sensitivity of RADT.⁶ The Panbio™ COVID-19 assay was found to perform worse for diagnosis of COVID-19 due to vaccine-breakthrough Omicron infection (sensitivity of 36.1%) compared to Delta (sensitivity of 67.7%).⁸ Nevertheless, in that study,⁸ NP were diluted in viral transport medium and cryopreserved prior to RADT testing. When using live virus isolated from clinical specimens, the Panbio™ COVID-19 assay displayed comparable analytical sensitivity for detection of Omicron and Delta in one study,⁹ but lower for Omicron in another.¹⁰ To our knowledge, no published studies have evaluated the performance of RADT conducted at point of care for diagnosis of the Omicron variant of COVID-19. In a series comprising mostly vaccinated adult individuals with no history of SARS-CoV-2 infection prior to enrollment

Table 1

Overall sensitivity of the Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device according to the SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens.

RT-PCR cycle threshold value	SARS-CoV-2 RNA load (log ₁₀ copies/ml)	Sensitivity (95% CI)
≤ 20	≥ 7.5	95.6 (89.2–98.3)
≤ 25	≥ 5.8	92.6 (86.6–96.1)
≤ 30	≥ 4.3	87.2 (80.7–91.8)
≤ 35	≥ 2.7	81.8 (75–87.1)

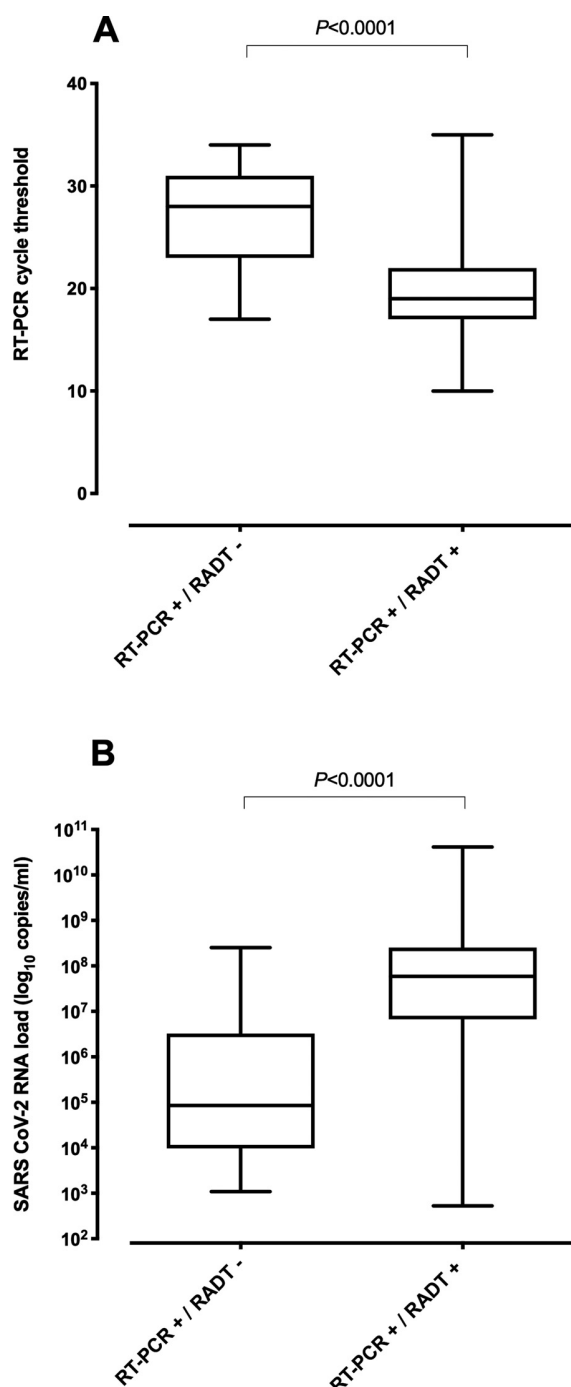


Fig. 1. Box-whisker plots depicting RT-PCR cycle threshold values (C_T) (A) and viral RNA loads (B) in nasopharyngeal specimens collected from COVID-19 patients infected with the Omicron variant testing either positive or negative by the Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device (abbott diagnostic GmbH, Jena, Germany). P values for comparisons are shown.

and tested within 5 days after symptoms onset, we showed the Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device to display exquisite specificity and acceptable overall sensitivity (81.8%) for Omicron diagnosis, both figures exceeding regulatory agency requirements for temporary approval (at least 98% and 80%, respectively).¹ In our experience, the clinical performance of the Panbio™ COVID-19 assay for Omicron variant was comparable to previous reports for the Wuhan-Hu-1 G614 variant (100% specificity and sensitivity of 81.4% in non-vaccinated adult patients with a clinical course of <5 days).⁶ Interestingly, the sensitivity of the RADT assay also appeared to increase with time elapsed after symptoms onset, suggesting that vaccine-breakthrough Omicron variant infection may be symptomatic even in the presence of RNA loads below the threshold for viral detection by RADT. Although speculative, this phenomenon may be related to the reduced capability of the Omicron variant to antagonize the host cell interferon response.¹¹

The limitations of the current study are as follows. First, Omicron subvariant B.1.529.2 (BA.2), which lacks the 69–70 deletion, may be incorrectly categorized as such based on the SGTF result; nonetheless, this subvariant could not be identified in sequenced specimens within the study period in our health department. Second, side-by-side clinical performance comparison of the RADT for diagnosis of COVID-19 due to Omicron and other variants of concern was not possible due to the absolute dominance of the former at the time of study. Third, the small number of children, SARS-CoV-2-experienced and unvaccinated individuals enrolled precluded conducting robust subanalyses for these population groups.

In summary, we found the Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device to perform well as a point-of-care test for early diagnosis of COVID-19 due to the Omicron variant in primary healthcare centers. Further studies are warranted to evaluate the performance of this and other RADT for detection of Omicron variant infection in asymptomatic, pediatric and unvaccinated individuals.

Financial support

This research received no public or private financial support.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

CRediT authorship contribution statement

Paula de Michelena: Methodology, Validation. **Ignacio Torres:** Methodology, Validation. **Sandrine Poujois:** Methodology, Validation. **Dixie Huntley:** Methodology, Validation. **Eliseo Albert:** Methodology, Validation. **David Navarro:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – original draft.

Acknowledgments

We are grateful to residents and staff at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario and medical and nursing staff at primary health centers (Benimaclet, Serrera and Salvador Pau)

recruiting patients for the current study. Ignacio Torres (Río Hortega Contract; CM20/00090) and Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) hold contracts funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.jinf.2022.02.022](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.02.022).

References

1. Drain PK. Rapid diagnostic testing for SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2022 Jan 7. doi:[10.1056/NEJMcp2117115](https://doi.org/10.1056/NEJMcp2117115).
2. Kontogianni K, Cubas-Atienzar AI, Wooding D, Buist K, Thompson CR, Williams CT, et al. Lateral flow antigen tests can sensitively detect live cultured virus of the SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage. *J Infect* 2021;**83**:e1–4.
3. Jian MJ, Chung HY, Chang CK, Lin JC, Yeh KM, Chen CW, et al. SARS-CoV-2 variants with T135I nucleocapsid mutations may affect antigen test performance. *Int J Infect Dis* 2022;**114**:112–14.
4. van Ogtrop ML, van de Laar TJW, Eggink D, Vanhommerig JW, van der Reijden WA. Comparison of the performance of the panbio COVID-19 antigen test in SARS-CoV-2 B.1.1.7 (alpha) variants versus non-B.1.1.7 variants. *Microbiol Spectr* 2021;**9**:e0088421.
5. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>. 2022.
6. 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.
7. <https://covdb.stanford.edu/page/mutation-viewer/#omicron>. 2022.
8. Adamson B, Sikka R, Wyllie AL, Premisrur P. Discordant SARS-CoV-2 PCR and rapid antigen test results when infectious: a December 2021 occupational case series. *medRxiv* 2022 01.04.22268770. doi:[10.1101/2022.01.04.22268770](https://doi.org/10.1101/2022.01.04.22268770).
9. Deerrain J, Druce J, Tran T, Batty M, Yoga Y, Fennell M, et al. Assessment of the analytical sensitivity of ten lateral flow devices against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Clin Microbiol* 2021 Dec 22:jcm0247921.
10. Bekliz M, Perez-Rodriguez F, Puhach O, Adea Kenneth, Marques Melancia S, Bagio S, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests for Omicron variant. *medRxiv* 2021 12.18.21268018. doi:[10.1101/2021.12.18.21268018](https://doi.org/10.1101/2021.12.18.21268018).
11. Bojkova D, Wiedera M, Ciesek S, Wass MN, Michaelis M, Cinatl jr J. Reduced interferon antagonism but similar drug sensitivity in Omicron variant compared to Delta variant SARS-CoV-2 isolates. *BioRxiv* 2022. doi:[10.1101/2022.01.03.474773](https://doi.org/10.1101/2022.01.03.474773).

Paula de Michelena¹, Ignacio Torres¹
Microbiology Service, INCLIVA Health Research Institute, Instituto de Investigación INCLIVA, Clinic University Hospital, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain

Ángela Ramos-García
Visualization
Health Department Clínico-Malvarrosa, Health Care Center Benimaclet, Valencia, Spain

Victoria Gozalbes
Visualization
Health Department Clínico-Malvarrosa, Health Care Center Salvador Pau, Valencia, Spain

Nidia Ruiz
Visualization
Health Department Clínico-Malvarrosa, Health Care Center Serrería, Valencia, Spain

Ana Sanmartín, Pilar Botija
Visualization
Health Department Clínico-Malvarrosa, Primary Health Directorate, Valencia, Spain

Sandrine Poujois, Dixie Huntley, Eliseo Albert
Microbiology Service, INCLIVA Health Research Institute, Instituto de Investigación INCLIVA, Clinic University Hospital, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain

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

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

¹ These authors contributed equally to this work.

RESEARCH ARTICLE

SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens from outpatients with breakthrough COVID-19 due to Omicron BA.1 and BA.2

Paula de Michelena¹ | Beatriz Olea¹ | Ignacio Torres¹ |
Fernando González-Candelas² | David Navarro^{1,3} 

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

²Joint Research Unit Infection and Public Health FISABIO-University of Valencia, Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio, UV-CSIC) and CIBER in Epidemiology and Public Health, Valencia, Spain

³Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA. Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.
Email: david.navarro@uv.es

Abstract

This retrospective observational study compared severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA load in nasopharyngeal specimens (NPs) from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the Omicron BA.1 or BA.2 sublineages. The convenience sample was composed of 277 outpatients (176 female/112 male; median age, 48 years; range, 12–97) with breakthrough COVID-19 ($n = 130$ due to BA.1 and $n = 147$ due to BA.2). All participants had completed a full vaccination schedule and 56% had received a booster vaccine dose at the time of COVID-19 breakthrough microbiological diagnosis. NPs were collected within 7 days (median 2 days) after symptom onset. The TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to estimate viral loads in NPs. Overall, viral RNA loads in NPs were comparable ($p = 0.31$) for BA.1 (median, 7.1 $\log_{10}$ copies/ml; range, 2.7–10.6) and BA.2 (median, 7.5 $\log_{10}$ copies/ml; range, 2.7–10.6), yet peak viral load appeared to be reached sooner for BA.2 than for BA.1 (Day 1 vs. Days 3–5; $p = 0.002$). Time elapsed since last vaccine dose had no significant impact on SARS-CoV-2 RNA loads in the upper respiratory tract (URT) for either BA.1 or BA.2. The data presented do not support that the transmissibility advantage of BA.2 over BA.1 is related to generation of higher viral loads in the URT early after infection.

KEYWORDS

BA.1, BA.2, COVID-19, Omicron variant, SARS-CoV-2, vaccine, viral load

1 | INTRODUCTION

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Omicron variant currently comprises five sublineages known as BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, and BA.5.¹ February 2022 saw a rapid surge of

Omicron BA.2 in Spain. Since then, this subvariant has outcompeted the original Omicron BA.1 to become overtly dominant by May 2022.² Global surveillance data strongly suggest an enhanced transmissibility of BA.2 compared with BA.1,^{3,4} yet the reasons for current BA.2 dominance remain to be firmly established. Data have

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

shown that all Omicron sublineages including BA.2 are comparably neutralized by Omicron patient sera,⁵ and that similar neutralizing antibody titers against BA.2 and BA.1 are elicited in messenger RNA (mRNA) vaccine-boosted individuals.⁶ This supports the notion that rapid spread of BA.2 is related to increased transmissibility rather than enhanced immunologic escape, which fits to a susceptible infectious and recovered-type model.⁷ Increased viral load in the upper respiratory tract (URT) upon BA.2 breakthrough infection may partly explain its increased transmissibility compared with BA.1; nevertheless, the few studies addressing this issue have returned conflicting results.^{8–11} Here we compared SARS-CoV-2 RNA load in the URT in fully vaccinated patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by either Omicron BA.1 or BA.2.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients

In this retrospective observational study, we recruited a convenience sample of 277 outpatients (176 female/112 male) with breakthrough COVID-19 ($n = 130$ due to BA.1 and $n = 147$ due to BA.2), with a median age of 48 years (range, 12–97) and attended at the Clínico-Malvarrosa Health Department between February 1 and March 23, 2022. The study was approved by the INCLIVA Research Ethics Committee and informed consent was waived due to its retrospective nature.

2.2 | Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

SARS-CoV-2 RNA loads in nasopharyngeal specimens (NPs) were estimated using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher

Scientific) calibrated to the AMPLIRUN[®] TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Vircell SA) as previously reported.¹² The Omicron subvariants were identified based on TaqPath S gene target failure (SGTF) and non-SGTF detection profiles for BA.1 and BA.2, respectively. This discriminative criterion proved 100% accurate by whole-genome sequencing (not shown) in 149 specimens (BA.1, $n = 101$; BA.2, $n = 48$).

2.3 | Statistical analysis

Medians of continuous variables were compared by Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. Frequency comparison across groups was performed using Fisher's exact test. Two-sided exact *p* were reported. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS).

3 | RESULTS

A total of 277 COVID-19 patients were included. Most presented with paucisymptomatic disease and only 28 eventually required hospitalization (24 due to BA.1 and 4 to BA.2; $p = 0.007$). All patients had completed a COVID-19 vaccination schedule (in most cases mRNA-based vaccines) and around 60% had been boosted with heterologous or homologous vaccines. As shown in Table 1, patients with COVID-19 due to BA.1 ($n = 130$) and BA.2 ($n = 147$) were matched for age, sex, SARS-CoV-2 vaccination status, time since receipt of the last vaccine dose (median, 109 days vs. 104 days), and time of RT-PCR testing after symptom onset (median 2 days, range, 0–7 days). It is noteworthy that cellularity in NP specimens from BA.1- and BA.2-infected individuals was comparable, as shown by human β -glucuronidase gene-RT-PCR-based assay¹³ (not shown).

TABLE 1 Relevant features of patients with breakthrough COVID-19 either due to SARS-CoV-2 Omicron BA.1 or BA.2 lineages

Parameter	SARS-CoV-2 Omicron variant lineage causing breakthrough COVID-19		<i>p</i>
	BA.1 ($n = 130$)	BA.2 ($n = 147$)	
Age in years (median/range)	48/12–97	49/13–97	0.48
Sex (female/male)	84/50	92/64	0.58
RT-PCR testing after symptoms onset in days (median/range)	2/0–7	2/0–7	0.47
No. of patients who completed a regular vaccination schedule (type)	59 (Comirnaty [®] , $n = 48$; Spikevax [®] , $n = 10$; Vaxzevria [®] , $n = 1$)	62 (Comirnaty [®] , $n = 50$; Spikevax [®] , $n = 9$; Vaxzevria [®] , $n = 3$)	0.59
No. of patients who received a booster vaccine dose (type)	71 (Homologous, $n = 38$; Heterologous, $n = 33$)	85 (Homologous, $n = 38$; Heterologous, $n = 47$)	0.61
Day since receipt of the last vaccine dose (median/range)	109/20–434	104/19–326	0.66
No. of patients with a record of SARS-CoV-2 infection previous to vaccination	7	17	0.08

Abbreviations: RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

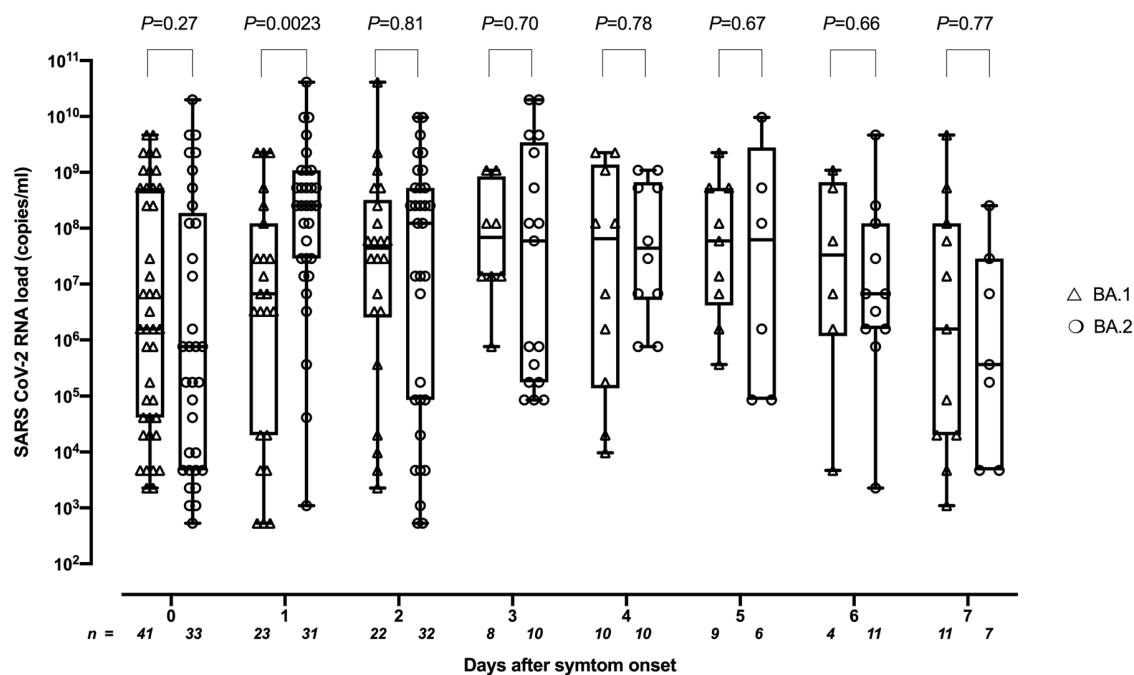


FIGURE 1 Box-whisker plots depicting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens (NPs) from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by either the Omicron BA.1 or BA.2 sublineages according to time elapsed since symptom onset. *p* values for comparisons are shown.

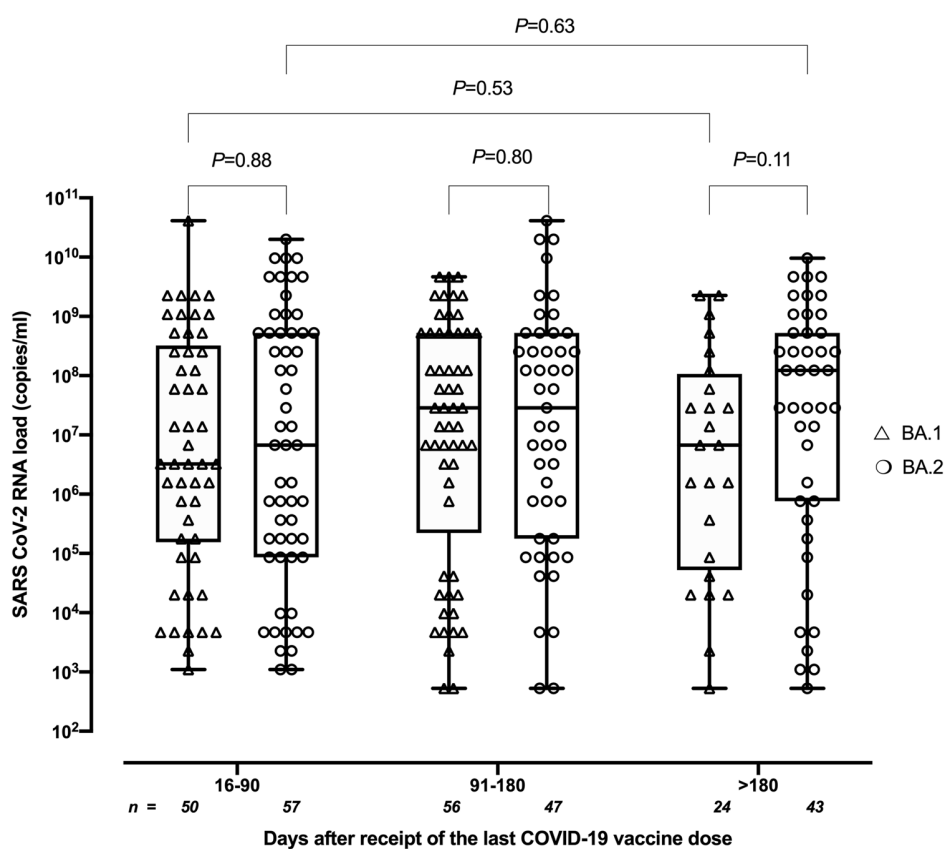


FIGURE 2 Box-whisker plots depicting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA loads in nasopharyngeal specimens (NPs) from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by either the Omicron BA.1 or BA.2 sublineages according to time elapsed since receipt of last vaccine dose. *p* values for comparisons are shown.

Overall, viral RNA loads in NPs were comparable ($p = 0.31$) for BA.1 (median, 7.1 log₁₀ copies/ml; range, 2.7–10.6) and BA.2 (median, 7.5 log₁₀ copies/ml; range, 2.7–10.6). When SARS-CoV-2 RNA loads from participants were plotted against time elapsed since symptoms onset (Figure 1), peak viral load appeared to be reached sooner for BA.2 than for BA.1 (Day 1 vs. Day 3–5; $p = 0.002$). However, remarkable individual variability was noted in both comparison groups. As time elapsed since vaccination appears to exert a major impact on the magnitude of SARS-CoV-2 RNA load in NP collected from COVID-19 patients with Delta variant COVID-19,¹³ we assessed whether this could be extended to Omicron BA.1 and BA.2. In line with the above-mentioned study,¹³ we arbitrarily set three time frames for comparisons (Days 16–90, 91–180, and >180). As shown in Figure 2, time elapsed since receipt of last vaccine dose had no significant impact on SARS-CoV-2 RNA loads in the URT for either BA.1 or BA.2, although a clear trend towards higher viral loads with time since vaccination was evident for BA.2 but not for BA.1. Moreover, SARS-CoV-2 RNA load did not differ in magnitude across BA.1 and BA.2 at any given period.

4 | DISCUSSION

The data presented herein suggested that overall SARS-CoV-2 Omicron RNA loads in NPs do not differ significantly across BA.1 and BA.2 in patients with breakthrough COVID-19 sampled within 7 days (median, 2 days) since symptom onset. Participants in the current study had all been fully vaccinated, and more than half had received a booster vaccine dose; moreover, few of them ($n = 24$) seemingly exhibited hybrid immunity at the time of testing. This is important given that hybrid immunity, resulting from natural infection and vaccination, may confer increased protection against SARS-CoV-2 infection and severe COVID-19 from different variants of concern including Omicron.^{14–16} Whether our observations can be extrapolated to other populations substantially differing in baseline immune response parameters at the time of breakthrough Omicron infection is uncertain. In agreement with our results, Marking et al.⁸ investigated breakthrough infections in triple-vaccinated healthcare workers with and without prior SARS-CoV-2 infection, reporting comparable viral RNA loads in URT for BA.1 and BA.2. In contrast, Qassim et al.¹⁰ found significantly higher viral RNA loads in BA.2 infections compared with those due to BA.1 (3.5 fewer RT-PCR C_T). Nevertheless, age distribution, participant vaccination status, and percentage of individuals with prior SARS-CoV-2 infection differed between their study and ours. Likewise, data from a large Swedish study seemingly indicated that Omicron BA.2 infection is associated with ~100-fold higher viral RNA levels in the URT than BA.1, early in the course of infection.⁹ These differences were not however significant ($p = 0.06$). The lack of information on participant characteristics in their study, in particular regarding their vaccination status and clinical presentation of SARS-CoV-2 infection at the time of testing, precludes direct comparison with our study. In our

experience, viral RNA load COVID-19 cases appeared to reach a peak earlier in BA.2 than in BA.1, although this observation should be taken with caution due to the population approach of our analysis. Data from a recent study¹¹ suggesting comparable replication kinetics of BA.1 and BA.2 sublineages in cell culture and after SARS-CoV-2 Omicron natural infection do not support our findings, yet another study¹⁷ found Omicron BA.2 to be more fusogenic than BA.1, which may conceivably have an impact on virus replication dynamics in the URT. We speculate that differences in the features of innate immune responses mediated by interferons or by functional antibodies and T cells elicited by BA.2 and BA.1 may account for our findings.

We previously reported in SARS-CoV-2-naïve individuals with breakthrough COVID-19 that SARS-CoV-2 Delta RNA loads in NP increased in parallel to the time elapsed since last vaccine dose. This may also be the case for the Omicron variant according to a recent study.¹⁰ Here we found a trend for a direct relationship between time elapsed since last vaccine dose and magnitude of SARS-CoV-2 load in NP for BA.2 but not BA.1. This observation is compatible with a less efficient, more rapidly waning cross-protective antibody response elicited by Wuhan-Hu-1-based vaccines against BA.2 compared with BA.1, or both.¹⁷

The current study has several limitations. First, no sequential specimens were available from participants, which impeded precise characterization of SARS-CoV-2 RNA load kinetics on the URT at the individual level. Second, no viral cultures were performed to evaluate the content of viable viral particles in NP from patients in the two groups. Third, no data on virus-specific antibody or T-cell immunity was available from participants. Fourth, it remains to be determined whether our observations can be extrapolated to hospitalized patients, which were under-represented in the current series.

In conclusion, the theory that the Omicron BA.2 subvariant is better adapted for replication in the URT tract than BA.1, thus generating higher viral loads in the setting of breakthrough COVID-19 developing in a highly vaccine-boosted population, is not supported by the data herein.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Paula de Michelena, Ignacio Torres, Beatriz Olea, Ignacio Torres, Fernando González-Candelas: methodology and data validation. **David Navarro:** conceptualization, data analysis, and manuscript writing.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to residents and staff at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario and medical and nursing staff at primary health centers of the Health Department Clínico-Malvarrosa. Ignacio Torres holds a Río Hortega Contract (CM20/00090) funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). This study received no private or public funds.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

ORCID

David Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

REFERENCES

1. Tegally H, Moir M, Everatt J, et al. Continued emergence and evolution of Omicron in South Africa: new BA.4 and BA.5 lineages. *medRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.05.01.22274406
2. La actualización de casos de COVID se realiza 2 veces a la semana. Los datos están actualizados a 19-08-2022. 2022. Accessed May 23, 2022. <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacionActual.htm>
3. World Health Organization. Statement on Omicron Sublineage BA.2, 2022. <https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage-ba.2>
4. Lyngse FP, Kirkeby CT, Denwood M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Omicron VOC subvariants BA.1 and BA.2: evidence from Danish households. *medRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.01.28.22270044
5. Evans JP, Zeng C, Qu P, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sub-lineages BA.1, BA.1.1, and BA.2. *Cell Host Microbe*. 2022;S1931-3128(22):00220-00227.
6. Yu J, Collier AY, Rowe M, et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 variants. *N Engl J Med*. 2022;386:1579-1580. doi:10.1056/NEJMc2201849.
7. Dimeglio C, Loubes JM, Miguères M, et al. Influence of vaccination and prior immunity on the dynamics of Omicron BA.1 and BA.2 sub-variants. *J Infect*. 2022;84:834-872.
8. Marking U, Havervall S, Norin NG, et al. High rate of BA.1, BA.1.1 and BA.2 infection in triple vaccinated. *medRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.04.02.22273333
9. Lentini A, Pereira A, Winqvist O, Reinius B. Monitoring of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1/BA.2 variant transition in the Swedish population reveals higher viral quantity in BA.2 cases. *medRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.03.26.22272984
10. Qassim SH, Chemaitelly H, Ayoub HH, et al. Effects of BA.1/BA.2 subvariant, vaccination, and prior infection on infectiousness of SARS-CoV-2 omicron infections. *J Travel Med*. 2022;taac068. Published online May 27, 2022. doi:10.1093/jtm/taac068
11. Singh J, Panwar A, Anantharaj A, et al. BA.1 and BA.2 sub-lineages of Omicron variant have comparable replication kinetics and susceptibility to neutralization by antibodies. *medRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.01.28.22269990.
12. de Michelena P, Torres I, Albert E, Bracho A, González-Candelas F, Navarro DI. Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in delta-variant breakthrough COVID-19. *J Infect*. 2022;84(5):e64-e66.
13. Albert E, Ferrer B, Torres I, 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.
14. Krammer F, Srivastava K, Alshammary H, et al. Antibody responses in seropositive persons after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384:1372-1374.
15. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2021;27:981-984.
16. Stamatatos L, Czartoski J, Wan YH, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*. 2021;372(6549):1413-1418.
17. Yamasoba D, Kimura I, Nasser H, et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. *Cell*. 2022;185:2103-2115.

How to cite this article: de Michelena P, Olea B, Torres I, González-Candelas F, Navarro D. SARS-CoV-2 RNA load in nasopharyngeal specimens from outpatients with breakthrough COVID-19 due to Omicron BA.1 and BA.2. *J Med Virol*. 2022;1-5. doi:10.1002/jmv.28079



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Research note

RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with breakthrough coronavirus disease 2019 caused by the Delta and Omicron variants

Paula de Michelena¹, Ignacio Torres¹, Enric-Cuevas Ferrando², Beatriz Olea¹, Fernando González-Candelas³, Gloria Sánchez², David Navarro^{1,4,*}¹ Microbiology Service, Clinic University Hospital, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico Valencia Health Research Institute, Valencia, Spain² Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos-Centro Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain³ Joint Research Unit Infection and Public Health Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana-University of Valencia, Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio, Universitat de Valencia-Centro Superior de Investigaciones Científicas) and Centro de Investigación Biomédica en Red in Epidemiology and Public Health, Valencia, Spain⁴ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2022

Received in revised form

31 August 2022

Accepted 7 September 2022

Available online 15 September 2022

Editor: M. Cevik

Keywords:

COVID-19

Delta variant

Infectious viral load

Omicron variant

SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 RNA load

Viability RT-PCR assay

ABSTRACT

Objectives: To compare the RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in nasopharyngeal specimens collected from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the Delta variant with those in specimens collected from patients with breakthrough COVID-19 caused by the Omicron variant.

Methods: A retrospective, observational study was conducted, including 240 consecutive adult outpatients, of whom 121 (74 females; median age, 40 years) had COVID-19 due to the Omicron variant and 119 (65 females; median age, 48 years) had COVID-19 caused by the Delta variant. The viral RNA load was quantitated using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The viability platinum chloride reverse transcription-PCR assay was used to discriminate between potentially infectious viral particles and free (encapsidated) viral RNA.

Results: Overall, the viral RNA loads were significantly higher ($p = 0.003$) for the Omicron variant (median, $8.1 \log_{10}$ copies/mL; range, 4.0 – $10.9 \log_{10}$ copies/mL) than for the Delta variant (median, $7.5 \log_{10}$ copies/mL; range, 3.0 – $11.6 \log_{10}$ copies/mL). A trend towards higher viral loads was noticed for Omicron compared with that for Delta across the following time frames since vaccination: 16–90 days (median, 6.83 vs. $5.88 \log_{10}$ copies/mL, respectively; range, 3.91 – 10.68 vs. 3.67 – $9.66 \log_{10}$ copies/mL, respectively; $p = 0.10$), 91–180 days (median, 8.09 vs. $7.46 \log_{10}$ copies/mL, respectively; range, 4.30 – 10.92 vs. 3.03 – $11.56 \log_{10}$ copies/mL, respectively; $p = 0.003$) and 181–330 days (median, 8.56 vs. $8.10 \log_{10}$ copies/mL, respectively; range, 6.51 – 10.29 vs. 3.03 – $10.61 \log_{10}$ copies/mL, respectively; $p = 0.11$). The platinum chloride treated or untreated reverse transcription-PCR cycle threshold ratio for the nucleocapsid gene as the target was slightly higher for Omicron than for Delta (median, 0.62 vs. 0.57 , respectively; range, 0.57 – 0.98 vs. 0.61 – 0.87 , respectively), although statistical significance was not reached ($p = 0.10$).

Conclusion: The time elapsed since vaccination has a major impact on the RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in nasopharyngeal specimens, particularly for the Omicron variant. The Omicron variant may be better adapted for replication in the upper respiratory tract than the Delta variant, in which this is unlikely given its more efficient generation of viral particles. **Paula de Michelena, Clin Microbiol Infect 2023;29:256.e1–256.e4**

© 2022 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.09.003>

1198-743X/© 2022 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The new variant of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Omicron (BA.1.1.529) was first reported in South Africa in November 2021 [1] and has spread rapidly since then because of its seemingly increased transmissibility [2,3] to become dominant in many countries. Evasion from spike (S)-binding neutralizing antibodies elicited during natural infections or after vaccination may account for the transmission advantage of the Omicron variant over the Delta variant [4–8]. Omicron has seven amino acid deletions across the N-terminal domain of S and approximately 30 substitutions within the S-receptor-binding domain, some of which are critically involved in neutralizing antibody binding [9] (Table S1). Nevertheless, increased replication efficiency in the upper respiratory tract, which could translate into higher viral loads, may also contribute to increased transmissibility; in fact, the Omicron variant is characterized by a total of ten amino acid substitutions located within the receptor-binding motif, which may affect the affinity of SARS-CoV-2 for the angiotensin-converting enzyme 2 receptor [9–11]. We have previously shown that the time elapsed since vaccination exerts a major impact on the magnitude of the RNA loads of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens collected from patients with the Delta variant [12]. A similar observation was made for the Omicron variant [13]. Here, we compared both the whole RNA loads of SARS-CoV-2 and potentially infectious virus in nasopharyngeal specimens collected from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the Delta variant and those in specimens collected from patients with breakthrough COVID-19 caused by the Omicron variant; the latter was detected using the viability reverse transcription (RT)-PCR assay, which can discriminate between potentially infectious viral particles and free (encapsidated) viral RNA [14].

Methods

Patients

We conducted a retrospective, observational study, including 240 consecutive adult out-patients (age ≥ 16 years) who visited the Health Department of Clínico-Malvarrosa (Valencia, Spain) between September 2021 and February 2022, of whom 121 (74 females; median age, 40 years; range, 16–101 years) and 119 (65 females; median age, 48; range, 16–89 years) developed breakthrough symptomatic SARS-CoV-2 infection due to the Omicron and Delta variants, respectively. Breakthrough symptomatic infection was defined as that developing at least 15 days after the receipt of the last vaccination dose. Data regarding signs or symptoms potentially associated with COVID-19, such as fever, cough, rhinorrhoea, odynophagia, cephalgia, myalgia, dyspnoea, ageusia and anosmia, obtained from the patients' medical records were used to establish the time since the onset of the symptoms (any of the above). The study was approved by the Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico de Valencia Research Ethics Committee (2021/165), and informed consent was waived because of its retrospective nature.

RT-PCR assays

The RNA loads of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens were estimated using the TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which was calibrated to the AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 RNA Control (Vircell SA, Granada, Spain) [12]. The involvement of the Delta variant was documented

using either whole-genome sequencing or variant-specific RT-PCR (SARS-CoV-2 PCR variant, Ascires, Sistemas Genómicos, Valencia, Spain) [12]. The Omicron variant was identified either using whole-genome sequencing or inferred based on S-gene target failure in RT-PCR using the Thermo Fisher kit. The viability RT-PCR assay was performed as previously described [14]. Briefly, 300 μ L of nasopharyngeal specimens was pre-treated or mock treated with 2.5 mM platinum chloride, which precludes the amplification of naked viral RNA, in DNA in LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 30 minutes at room temperature in an orbital shaker (150 rpm). Viral RNA was extracted using the KingFisher™ Flex platform (Thermo Fisher Scientific) and detected using quantitative RT-PCR, which targeted the nucleocapsid (N) gene sequence. Each quantitative RT-PCR assay was performed in duplicate and included nuclease-free water as a negative control. The data are reported as the ratio of RT-PCR cycle thresholds (C_T s) for the N amplicon returned by the pre-treated or untreated specimens.

Statistical analysis

The medians of continuous variables were compared using the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. Frequency comparison between the groups was performed using the Fisher exact test. Two-sided exact p values were reported. A p value of <0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using SPSS, version 20.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

A unique nasopharyngeal specimen was collected from 240 individuals with symptomatic SARS-CoV-2 infection due to either the Delta or Omicron variant at the time the patients sought medical assistance (a median of 2 days after the onset of the symptoms; range, 0–7 days in both the study groups). Overall, the viral RNA loads were significantly higher ($p 0.003$) for the Omicron variant (median, 8.1 $\log_{10}$ copies/mL; range, 4.0–10.9 $\log_{10}$ copies/mL) than for the Delta variant (median, 7.5 $\log_{10}$ copies/mL; range, 3.0–11.6 $\log_{10}$ copies/mL). As shown in Table 1, patients in the two groups were comparable for the vaccination schedule employed, the median time elapsed since the receipt of the last vaccination dose (134 days [range, 16–324 days] for Omicron and 158 days [range, 20–318 days] for Delta; $p 0.13$) and SARS-CoV-2 infection prior to vaccination.

To assess the impact of the time elapsed since the completion of vaccination on the RNA loads of SARS-CoV-2 Omicron and Delta in the nasopharyngeal specimens, we arbitrarily defined the following time frames: 16–90, 91–180 and >180 days. The specimens were collected at comparable times from the time of the onset of the symptoms across these time windows for both cases of the Omicron and Delta variants. As shown in Fig. 1, higher viral RNA loads were observed to be associated with the time from vaccination for both the variants, most notably for Omicron. Higher viral RNA loads were noticed for Omicron than for Delta across all the periods: 16–90 days (median, 6.83 vs. 5.88 $\log_{10}$ copies/mL; range, 3.91–10.68 vs. 3.67–9.66 $\log_{10}$ copies/mL; $p 0.10$), 91–180 days (median, 8.09 vs. 7.46 $\log_{10}$ copies/mL; range, 4.30–10.92 vs. 3.03–11.56 $\log_{10}$ copies/mL; $p 0.003$) and 181–330 days (median, 8.56 vs. 8.10 $\log_{10}$ copies/mL; range, 6.51–10.29 vs. 3.03–10.61 $\log_{10}$ copies/mL; $p 0.11$).

To assess the relative proportion of free viral RNA in the nasopharyngeal specimens, a total of 17 and 15 samples from patients with breakthrough COVID-19 caused by the Omicron and Delta variants, respectively, were subjected to the viability RT-PCR assay (Table S2). The platinum chloride treated or untreated RT-PCR C_T

Table 1

Characteristics of patients with breakthrough symptomatic severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection caused by either the Omicron or Delta variant

Parameter	No. of participants with COVID-19 due to the Omicron variant (n = 121)	No. of participants with COVID-19 due to the Delta variant (n = 119)	p value
Age, median (range)	40 (16–101)	48 (16–89)	0.001
Sex (female/male)	74/47	65/54	0.30
Day of nasopharyngeal specimen after the onset of symptoms, median (range)	2 (0–7)	2 (0–7)	0.98
Vaccine schedule			0.1
Two doses of Comirnaty®	72	71	
Two doses of Spikevax®	15	17	
Two doses of Vaxzevria®	9	16	
One dose of COVID-19 Janssen	5	4	
Three doses of Comirnaty®	10	9	
Three doses of Spikevax®	0	2	
Two doses of Comirnaty®; third dose of Spikevax®	9	0	
Two doses of Vaxzevria®; third dose of Spikevax®	1	0	
SARS-CoV-2 infection prior to vaccination, n (%)	8 (6.6)	3 (2.5)	0.12
Time elapsed since the last vaccination dose and collection of nasopharyngeal specimen (d), n (range)	134 (16–324)	158 (20–318)	0.13

COVID-19, coronavirus disease 2019.

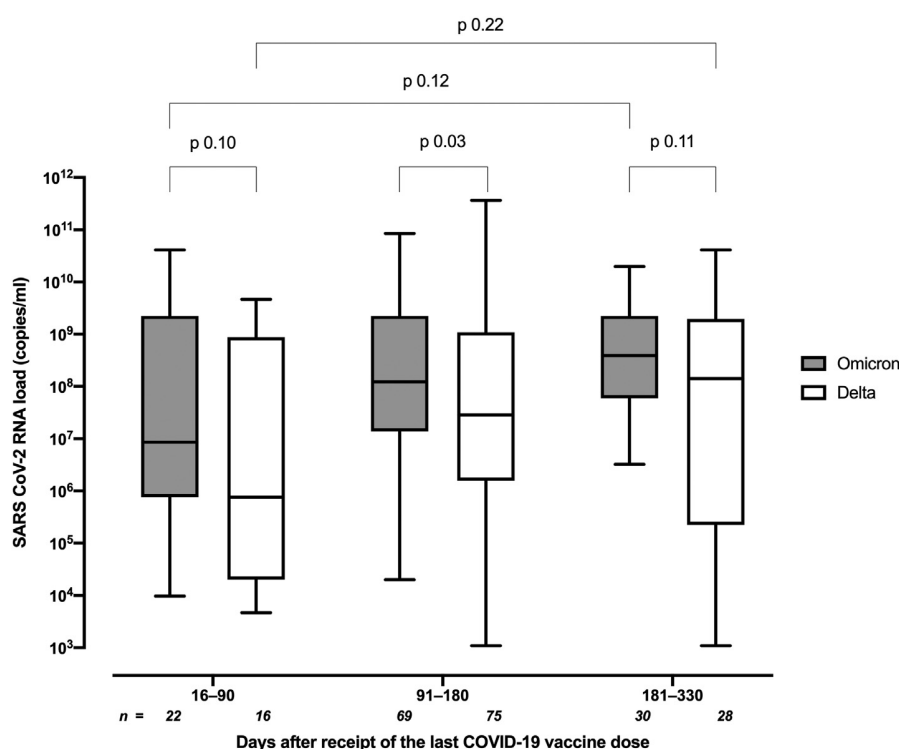


Fig. 1. Box-Whisker-plots depicting the RNA loads of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in nasopharyngeal specimens from patients with breakthrough coronavirus disease 2019 caused by either the Omicron or the Delta variant stratified by the time elapsed since the last vaccination dose (within days 15–90, 91–180 and 181–330). The specimens were collected at comparable times from the time of onset of symptoms across these time windows for both cases of the Omicron and Delta variants. The p values for comparisons are shown. COVID-19, coronavirus disease 2019; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

ratio for the N target was higher for Omicron than for Delta in two different experiments (mean, 0.62 vs. 0.57, respectively; range, 0.57–0.98 vs. 0.61–0.87, respectively), although statistical significance was not reached (p 0.10).

Discussion

Several key observations were made in the present study. First, the RNA loads of SARS-CoV-2 Omicron and Delta in the nasopharyngeal specimens were found to increase in individuals with breakthrough COVID-19 with time elapsed since the receipt

of the last vaccination dose. This supports the notion that waning vaccine-elicited immunity has a major impact on the RNA loads of SARS-CoV-2 in the upper respiratory tract, which is in agreement with previously published data on the Delta variant [12,13]. The size of the effect was more marked for the Omicron variant, likely reflecting its advantage over the Delta variant in evasion from vaccine-induced immune responses [4–8]. Second, the RNA loads of SARS-CoV-2 Omicron tended to be higher than those of Delta regardless of the time elapsed since vaccination, although a statistically significant difference was only seen between days 91 and 180; we speculated that the former variant may outperform

the latter in terms of replicative efficiency in the upper respiratory tract, which is in concordance with previous assumptions [15]. Nevertheless, our observation must be interpreted with caution because peak viral load may occur earlier in Delta infections than in Omicron infections [16]. In contrast to our results, Miguères et al. [7] reported higher RNA loads for Delta than for Omicron in vaccinated participants, although they did not disclose whether the comparison groups were matched for the time passed since vaccination. In turn, Puhach et al. [8] found comparable viral RNA loads (E-gene C_T values) for both the variants in individuals who experienced SARS-CoV-2 infection a mean of approximately 5 months after vaccination, in line with our observations. Third, the viability RT-PCR assay revealed no evidence of a higher infectious RNA load in the nasopharyngeal specimens collected from patients infected with the Omicron or Delta variant, which concur with data from a previous study that used a virus-induced, focus-forming assay [8].

The current study has several limitations. First, we could not rule out differences in quality (cellularity) across the specimens from the patients in the comparison groups, which may have impacted the measured viral RNA loads. Second, no viral cultures were performed to evaluate the content of viable viral particles in the nasopharyngeal specimens collected from the patients in the two groups. Third, no data on patient comorbidities, which could also have impacted the magnitude of viral RNA loads in the upper respiratory tract [17], were available.

In conclusion, we provide evidence highlighting the impact of time elapsed since vaccination on the RNA loads of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens, particularly when the Omicron variant is involved. Moreover, the data indirectly suggested that the Omicron variant is better adapted for replication in the upper respiratory tract than the Delta variant, thereby generating higher viral loads.

Author contributions

PdM, IT, EC-F and FG-C: methodology and data validation. GS and DN: study design and logistics; DN: conceptualization, data analysis and manuscript writing.

Transparency declaration

IT holds a Río Hortega Contract (CM20/00090) funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDFERDF/FEDER). EC-F holds a pre-doctoral contract from MICINN (2018).

Acknowledgements

We are grateful to the residents and staff at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario and the medical and nursing staff at the primary health centres of the Health Department of Clínico-Malvarrosa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.09.003>.

References

- [1] World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 variant of concern. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
- [2] Espenhain L, Funk T, Overvad M, Edslev SM, Fonager J, Ingham AC, et al. Epidemiological characterisation of the first 785 SARS-CoV-2 Omicron variant cases in Denmark, December 2021. *Euro Surveill* 2021;26:2101146. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.50.2101146>.
- [3] Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant. *N Engl J Med* 2022;386:1532–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>.
- [4] Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell* 2022;185:447–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.032>.
- [5] Cele S, Jackson L, Khoury DS, Khan K, Mojoy-Gwete T, Tegally H, et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* 2022;602:654–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04387-1>.
- [6] Grabowski F, Kochanicz M, Lipniacki T. The spread of SARS-CoV-2 variant Omicron with a doubling time of 2.0–3.3 days can be explained by immune evasion. *Viruses* 2022;14:294. <https://doi.org/10.3390/v14020294>.
- [7] Miguères M, Dimeglio C, Trémeaux P, Abravanel F, Raymond S, Lhomme S, et al. Influence of immune escape and nasopharyngeal virus load on the spread of SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Infect* 2022;84:834–72. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.036>.
- [8] Puhach O, Adea K, Hulo N, Sattoune P, Genecand C, Iten A, et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated patients infected with SARS-CoV-2 WT, Delta and Omicron. *Nat Med* 2022;28:1491–500. <https://doi.org/10.1101/2022.01.10.22269010>.
- [9] Jung C, Kniec D, Koepke L, Zech F, Jacob T, Sparrer KM, et al. Omicron: what makes the latest SARS-CoV-2 variant of concern so concerning? *J Virol* 2022;96:e0207721. <https://doi.org/10.1128/jvi.02077-21>.
- [10] Rath SL, Padhi AK, Mandal N. Scanning the RBD-ACE2 molecular interactions in Omicron variant. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;592:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.006>.
- [11] Wu L, Zhou L, Mo M, Liu T, Wu C, Gong C, et al. SARS-CoV-2 Omicron RBD shows weaker binding affinity than the currently dominant Delta variant to human ACE2. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:8. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00863-2>.
- [12] de Michelena P, Torres I, Albert E, Bracho A, González-Candelas F, Navarro D. Impact of time elapsed since full vaccination on SARS-CoV-2 RNA load in Delta-variant breakthrough COVID-19. *J Infect* 2022;84:579–613. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.01.006>.
- [13] Levine-Tiefenbrun M, Yelin I, Alapi H, Herzel E, Kuint J, Chodick G, et al. Waning of SARS-CoV-2 booster viral-load reduction effectiveness. *Nat Commun* 2022;13:1237. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28936-y>.
- [14] Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Pérez-Cataluña A, Falcó I, Navarro D, Martín-Latil S, et al. Platinum chloride-based viability RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection in complex samples. *Sci Rep* 2021;11:18120. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97700-x>.
- [15] Peacock TP, Brown JC, Zhou J, Thakur N, Newman J, Kugathasan R, et al. The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry. 2022. *bioRxiv*.
- [16] Singanayagam A, Hakki S, Dunning J, Madon KJ, Crone MA, Koycheva A, et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis* 2022;22:183–95. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00648-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00648-4).
- [17] Maltezou HC, Raftopoulos V, Vorou R, Papadima K, Mellou K, Spanakis N, et al. Association between upper respiratory tract viral load, comorbidities, disease severity, and outcome of patients with SARS-CoV-2 infection. *J Infect Dis* 2021;223:1132–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa804>.

