

## **Trabajo de Fin de Master de Teresa Sendino Miguel**

### **CARACTERIZACIÓN Y SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES QUE REQUIRIERON INGRESO HOSPITALARIO DURANTE LA ‘TERCERA OLA’ DE COVID-19: ESTUDIO DE LAS CEPAS CIRCULANTES.**

**Dirigido por Marta Fernández González y Mar Masiá Canuto**

#### **- Resumen**

Antecedentes: El síndrome respiratorio agudo severo desencadenado por el virus SARS-CoV-2 ha constituido una crisis sanitaria sin precedentes. Uno de los principales problemas asociados al virus es la aparición de mutaciones en su genoma. La cepa original (D614G) fue dominante a nivel mundial en 2020. Posteriormente surgieron mutaciones que dieron lugar a las denominadas Variantes de atención (VOC): alfa, beta, gamma y delta.

Métodos: Estudio transversal para la caracterización de las variantes mediante RT-PCR multiplex. Estudio prospectivo longitudinal para la evaluación de los síntomas y biomarcadores analíticos de los pacientes ingresados con COVID-19 durante un año.

Resultados: Se incluyeron 296 pacientes ingresados en enero de 2021, 165 con la cepa original, 60 con la variante alfa y 8 con la variante beta (56 resultados no concluyentes). Se comparó la cepa original con la variante alfa, percibiendo a medio plazo mayor pérdida de pelo ( $p=0.053$ ) y anosmia ( $p=0.067$ ) y a largo plazo peor estado general ( $p=0.038$ ) y más cansancio ( $p=0.054$ ) en el grupo con la cepa original.

Interpretación: Se confirmó la convivencia de al menos tres variantes del virus SARS-CoV-2 durante la ‘tercera ola’ de la pandemia. Los síntomas persistentes a medio y largo plazo fueron más frecuentes en el grupo con la cepa original.

#### **- Palabras clave**

COVID-19, persistencia de los síntomas, biomarcadores, evolución a largo plazo

## **- Abstract**

**Background:** The severe acute respiratory syndrome triggered by the SARS-CoV-2 virus has become into an unprecedented health crisis. One of the main problems associated with the virus is the appearance of mutations in its genome. The original strain (D614G) was extended worldwide in 2019. Later mutations emerged that gave rise to the so-called Variants of Concern (VOC): alpha, beta, gamma and delta.

**Methods:** Cross-sectional study for the characterization of variants by multiplex RT-PCR. Longitudinal prospective study for the evaluation of symptoms and analytical biomarkers of patients admitted with COVID-19 for one year.

**Findings:** A total of 296 patients admitted in January 2021 were included, 165 with the original strain, 60 with the alpha variant, and 8 with the beta variant (56 inconclusive results). The original strain was compared with the alpha variant, perceiving in the medium-term greater hair loss ( $p=0.053$ ) and anosmia ( $p=0.067$ ) and in the long-term worse general condition ( $p=0.038$ ) and more fatigue ( $p=0.054$ ) in the group with the original strain.

**Interpretation:** The coexistence of at least three variants of the SARS-CoV-2 virus was confirmed during the 'third wave' of the pandemic. Medium-term and long-term persistent symptoms were more frequent in the group with the original strain.

## **- Keywords**

COVID-19, persistence of symptoms, biomarkers, long-term evolution

## - Índice

1. Introducción y justificación del interés científico del tema elegido objeto del trabajo	pag. 4
2. Preguntas de investigación	pag. 5
3. Hipótesis planteada	pag. 6
4. Objetivos a cumplir	pag. 6
5. Metodología para el alcance de los objetivos definidos	pag. 6
• Diseño (tipo de estudio)	pag. 6
• Sujetos (criterios de inclusión, exclusión, número y muestreo)	pag. 7
• Variables a estudio	pag. 8
• Recogida de variables	pag. 10
• Análisis de datos	pag. 10
• Dificultades y limitaciones	pag. 11
6. Plan de trabajo	pag. 12
7. Aspectos éticos a tener en cuenta	pag. 14
8. Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados obtenidos o previsibles	pag. 14
9. Presupuesto	pag. 14
10. Análisis e interpretación de los resultados	pag. 14
11. Consideraciones finales y conclusiones	pag. 22
12. Recomendaciones para futuras investigaciones	pag. 22
13. Bibliografía	pag. 24
14. Anexos	pag. 26

## **- Introducción y justificación del interés científico del tema elegido objeto del trabajo**

Desde la aparición de la enfermedad causada por el coronavirus de 2019 (COVID-19) son ya 5,4 millones las muertes registradas en todo el mundo. El síndrome respiratorio agudo severo desencadenado por la presencia del virus SARS-CoV-2 en el organismo del ser humano ha constituido la mayor crisis sanitaria conocida desde la pandemia producida por el virus de influenza en 1918. Estos eventos han provocado que los esfuerzos por parte de la comunidad científica por conocer todos los aspectos relacionados con la genética del virus y su patogenia hayan sido espectaculares desde el inicio.

Una de las principales problemáticas presentadas por el SARS-CoV-2 es la aparición de múltiples mutaciones en el genoma viral, comportamiento ampliamente conocido en otros virus ARN consecuencia de su intento por adaptarse al huésped, dando como resultado las distintas variantes que se han ido descubriendo a lo largo de estos dos años de pandemia.

La cepa original con aparición en la ciudad de Wuhan (China) se denominó D614G, y durante la fase inicial de la pandemia constituyó la cepa dominante a nivel mundial, sin grandes modificaciones genéticas, lo que permitió comenzar con el diseño de las vacunas que se están usando para generar inmunidad en personas que no han estado en contacto con el virus. Desde entonces, y dada la expansión del virus por el globo terráqueo, han sido muchas las variantes detectadas, que además, han mostrado mayor virulencia o transmisibilidad, y finalmente han acabado sorteando la neutralización por parte de los anticuerpos que se habían generado a través de las vacunas, diseñadas a partir de la cepa original, o de la propia exposición al virus. Estas variantes han sido denominadas como Variants of Concern o Variantes de atención (VOC)<sup>1</sup> y han recibido una nomenclatura basada en el alfabeto griego por parte de la OMS.

- Alpha (B.1.1.7): primera variante preocupante descrita en el Reino Unido a finales de diciembre de 2020, convirtiéndose en pocos meses en la cepa dominante en casi todo el mundo. La mayoría de mutaciones que presenta aparecen en el gen S, siendo especialmente relevantes las mutaciones N501Y y P618H, que le confieren una mayor transmisibilidad. No parecen influir en un mayor riesgo de enfermedad grave que la variante original ni capacidad de escapar particularmente a la respuesta inmune. Hay que tener en cuenta que esta variante presenta una delección en las posiciones 69-70 del gen S (HV 69-70), lo que genera algunos falsos

positivos en su detección con ciertos kits comerciales de RT-PCR basados en el gen S. Esta peculiaridad puede utilizarse como marcador de la prevalencia de esta variante sobre otras en un área geográfica determinada, sin tener que realizar una secuenciación completa del genoma, a pesar de no ser una delección exclusiva de esta variante<sup>1,2,3</sup>.

- Beta (B.1.351): reportada por primera vez en Sudáfrica en diciembre de 2020. Comparte la mutación N501Y con la variante Alfa y su potencial aumento de virulencia. Presenta una mutación en la espícula, E484K, que se ha relacionado con una reducción in vitro de la capacidad neutralizante de los anticuerpos de personas que ya habían pasado la infección y personas vacunadas, aunque no parece haberse traducido en una disminución de la eficacia poblacional de la respuesta inmune a la vacuna<sup>1,2,3</sup>.
- Gamma (P.1): reportada por primera vez en Brasil a principios de enero de 2021. Contiene varias mutaciones en la espícula y en su zona RBD (N501Y, E484K y K417T), lo que centra la atención en su mayor capacidad de transmisión y su potencial para escapar a la respuesta inmune<sup>1,2,3</sup>.
- Delta (B.1.617.2): reportada por primera vez en India en diciembre de 2020. Al igual que las cepas anteriores, esta mutación es más transmisible<sup>1,2,3</sup>.

Estas sutiles diferencias entre las variantes<sup>1</sup>, tanto a nivel genético como en su potencial infectivo y su resistencia a la inmunidad generada, son el fundamento para el diseño de este proyecto. Se pretende identificar la cepa o cepas infectivas predominantes en los individuos que requirieron ingreso hospitalario en el Hospital General Universitario de Elche durante el mes de enero de 2021, que constituye el momento de convivencia de mayor cantidad de variantes del COVID-19 a nivel mundial. Tras el ingreso, los pacientes reciben atención en las consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas durante un año. A inicios de 2022, se realizó el último seguimiento, clínico y sintomatológico al año de su hospitalización. Las características de su estado y síntomas actuales podrían verse definidos por la variante que presentó durante la primoinfección que requirió el ingreso.

### **- Preguntas de investigación**

¿Cuál fue la frecuencia de cada una de las variantes en la población española durante la ‘tercera ola’ de la pandemia (enero de 2021)? ¿Existe una relación entre los síntomas y secuelas manifestados por los pacientes durante el año de seguimiento tras su ingreso por

COVID-19 y la variante presentada durante la primoinfección que permita establecer unos criterios diferenciales para definir cada una de las variantes del virus SARS-CoV2?

### **- Hipótesis planteada**

Los pacientes con COVID-19 confirmada por PCR nasofaríngea, que tienen infección por alguna de las variantes posteriores a la original, y que requirieron ingreso hospitalario presentan a largo plazo una frecuencia diferente de secuelas y síntomas clínicos que aquellos pacientes con primoinfección por la cepa original.

### **- Objetivos a cumplir**

- Objetivo general: Caracterizar las variantes de COVID-19 en una muestra de frotis nasofaríngeo de pacientes ingresados durante la ‘tercera ola’ de la pandemia y analizar si existen diferencias que permitan establecer una asociación entre la variante del virus detectada y la gravedad de los síntomas y secuelas manifestadas en el seguimiento de los pacientes durante un año.

- Objetivos específicos:

- Estudiar la distribución de la cepa original y las variantes posteriores COVID-19 en la ‘tercera ola’ de la pandemia mediante la detección las mutaciones características de las variantes en los pacientes con PCR nasofaríngea positiva que ingresaron durante el mes de enero de 2021.
- Evaluar la sintomatología y los datos de laboratorio de los pacientes durante el ingreso por COVID-19 y en la visitas de seguimiento al mes, a los 6 meses y al año de la infección mediante el uso de cuestionarios estandarizados.
- Comparar la sintomatología y biomarcadores analíticos de los pacientes durante su seguimiento en función de la variante COVID-19 encontrada.

### **- Metodología para el alcance de los objetivos definidos**

- **Diseño (tipo de estudio)**

Para la caracterización de las variantes de COVID-19 se ha realizado un estudio transversal. La evaluación de los síntomas y los biomarcadores analíticos de los pacientes desde el ingreso y durante el seguimiento anual se ha realizado con un estudio prospectivo longitudinal de la cohorte.

- **Sujetos (criterios de inclusión, exclusión, número y muestreo)**

Se examinó una población bien definida. El criterio inicial de selección de los pacientes de la cohorte a estudio fue la presencia de enfermedad COVID-19, confirmada mediante una PCR positiva, que requirió ingreso hospitalario durante la ‘tercera ola’ de la pandemia, específicamente durante el periodo comprendido entre diciembre de 2020 y mes de febrero de 2021 en el Hospital General Universitario de Elche. El criterio de inclusión definido permitió una extensa recogida de muestras de frotis nasofaríngeos.

Los individuos fueron invitados a realizar un estrecho seguimiento clínico durante un año tras su ingreso hospitalario, concretamente a los meses 1, 6 y 12 tras el alta hospitalaria. La respuesta a dicho seguimiento fue variada, habiendo sujetos que acudieron a ninguna, 1, 2 o 3 de las visitas recomendadas. Con el fin de evitar sesgo de selección, se decidió estudiar aquella cohorte de pacientes que cumplieron correctamente, al menos, con dos de las citas de los meses 1 y 6, y 12.

El desconocimiento que ha caracterizado al COVID-19 durante la pandemia, no solo para la población general, sino también para toda la comunidad científica, ha influido en la población de nuestro estudio, y ha facilitado la realización de un seguimiento adecuado de 555 pacientes de los 1079 sujetos que ingresaron. Han acudido puntualmente a las citas con su médico, al mes y/o a los 6 meses o al año de la primoinfección. Los pacientes respondieron unos cuestionarios elaborados de forma estandarizada y uniforme, eliminando el sesgo del observador (Anexo 1: Cuestionario).

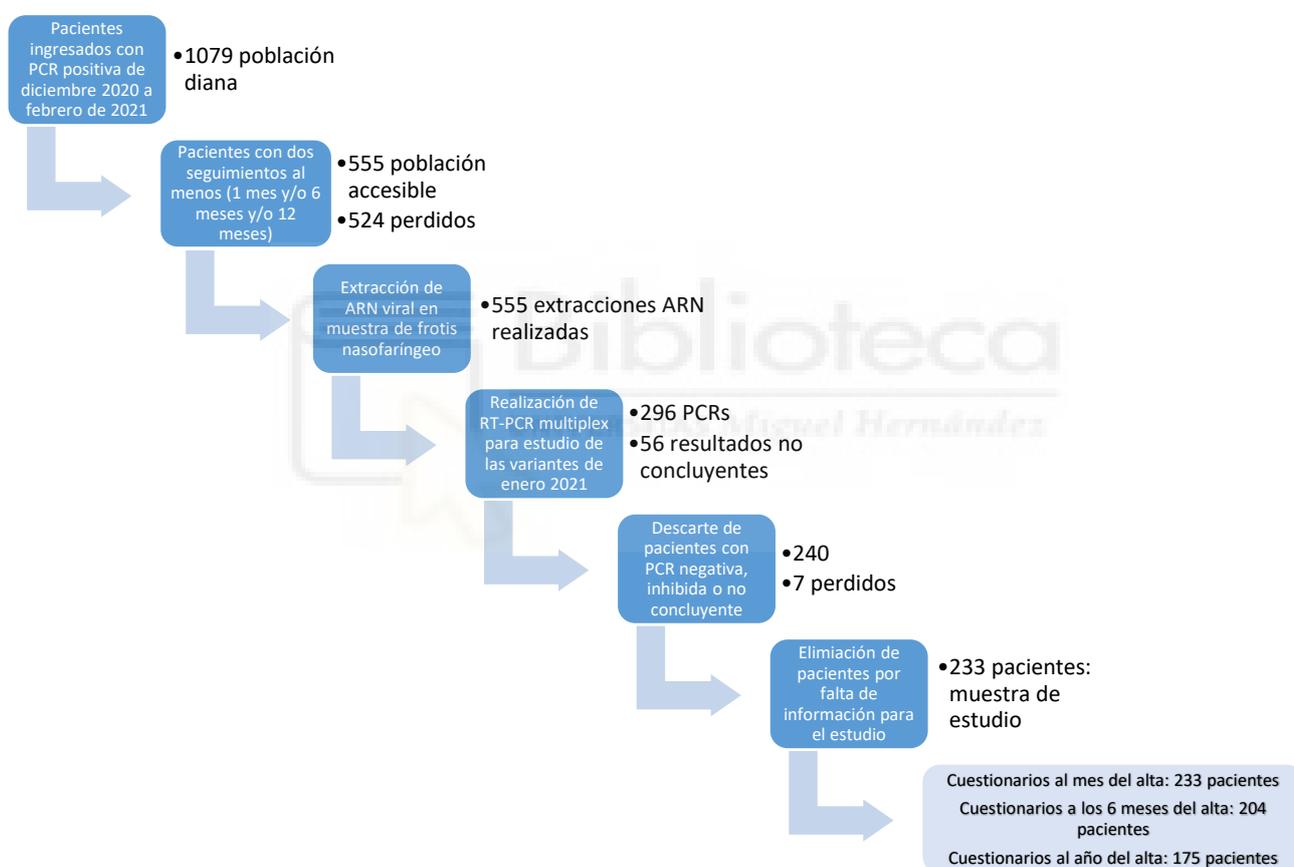
A principios de este año se realizó la extracción del material genético viral de los frotis nasofaríngeos, obteniendo 555 muestras con ARN purificado, de las cuales se analizaron por RT-PCR multiplex las 296 muestras correspondientes al mes de enero de 2021 para este estudio, debido a la limitación de tiempo para la realización del proyecto.

Es importante recalcar que éste es un proyecto exploratorio y descriptivo que sirve como estudio piloto para evaluar los resultados de forma inicial para estudios posteriores en los que se pretende ampliar el tamaño muestral, incluyendo a todos los pacientes con muestra de frotis nasofaríngeo y extracción del ARN completada (259 pacientes más hasta alcanzar las 555 muestras disponibles). La selección de los 296 pacientes analizados se realizó por muestreo no probabilístico consecutivo desde la primera muestra recogida en enero.

De las 296 RT-PCR multiplex examinadas, 56 muestras no mostraron resultados definitivos sobre la variante infectante. Las 56 muestras perdidas se dividieron en 10 que resultaron no concluyentes, 44 que fueron negativas y 2 en las que el proceso de la PCR

quedó inhibido por la presencia de interferentes en la muestra. La razón de esta pérdida se asoció con una toma inadecuada de la muestra de frotis nasofaríngeo, lo que produjo un falso negativo, o con la presencia de alguna variante de COVID-19 no incluida en el panel de RT-PCR multiplex del kit utilizado, interpretándose el resultado como no concluyente.

Finalmente, y tras la revisión de los resultados almacenados en la base de datos, se comprobó que el registro de 7 pacientes no estaba adecuadamente cumplimentado, por lo que para el estudio estadístico de los datos se tendrán en cuenta definitivamente 233 pacientes.



**Figura 1. Diagrama de flujo de la población diana, accesible y muestra final del estudio.**

- **Variables a estudio**

Variables independientes o predictoras:

- Variante de SARS-CoV-2 original, alfa (y beta): se trató cada una de las variantes como una muestra independiente para poder compararlas.
- Edad, sexo, IMC: Variables antropométricas que definieron a los pacientes de la cohorte.

- Comorbilidades o patologías crónicas de los sujetos: diabetes, HTA, enfermedades cardiovasculares, renales y respiratorias, ictus y cáncer. Todas ellas se encuentran relacionadas por la variable definida como índice de Charlson<sup>4</sup>.
- Tratamiento dirigido contra el COVID-19: remdesivir, tocilizumab, corticoides.
- Vacunación tras el ingreso y a lo largo del proceso de seguimiento.

Variables dependientes o de respuesta:

- Síntomas clínicos característicos del COVID-19: Fiebre, tos, dificultad respiratoria, dolor muscular, cansancio, sudoración, congestión nasal, anosmia, sudoración, síntomas digestivos, dolor de cabeza, etc<sup>1</sup>.
- Complicaciones durante la estancia hospitalaria: Muerte, traslado a la unidad de cuidados intensivos (UCI), uso de gafas de oxígeno de alto flujo y otros métodos de ventilación o respiración artificial (BiPAP, VMK-reservorio, VMI), medidas de soporte, coinfección, hemorragia y episodios de trombosis.
- Desarrollo de neumonía: con infiltrado pulmonar unilateral o bilateral.
- Biomarcadores bioquímicos en plasma y sangre total al ingreso, alta y al mes del alta:
  - Función renal: Creatinina.
  - Función hepática: Aspartato aminotransferasa (GOT/AST), alanina aminotransferasa (GPT/ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH).
  - Hemograma: Hemoglobina, plaquetas, leucocitos, neutrófilos y linfocitos.
  - Marcadores de infección bacteriana: Procalcitonina.
  - Marcadores de inflamación o fase aguda: Proteína C reactiva, ferritina, IL-6, cociente neutrófilos/linfocitos. Estos biomarcadores han sido ampliamente utilizados como criterio de seguimiento y se han asociado con el grado de gravedad de la enfermedad en los pacientes con SARS-CoV-2.
  - Coagulación: Fibrinógeno y dímero D
  - PCR Ct (umbral de ciclos)
- Persistencia de los síntomas a corto, medio y largo plazo (al mes, a los seis meses y al año de recibir el alta): percepción del estado de salud tras padecer la enfermedad, secuelas directamente relacionadas con el SARS-CoV-2 como tos, cansancio, dolor muscular y otros de nueva aparición como la pérdida de cabello o el insomnio.

- **Recogida de variables**

La recogida de las variables comenzó en diciembre 2020 con la llegada de la ‘tercera ola’ y la aparición de nuevas variantes del virus SARS-CoV-2 no esperadas. Desde la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche se consideró que podría ser relevante evaluar la salud de los pacientes tras padecer la enfermedad. Se elaboró un protocolo incluyendo la recogida de muestras de frotis nasofaríngeo para confirmar la positividad del virus y posteriormente caracterizar el ARN viral. Además se diseñaron unos cuestionarios para recoger de forma estandarizada los síntomas y secuelas de los pacientes que acudieron a su seguimiento clínico y analítico. Los cuestionarios recogidos en la primera visita del mes, se ampliaron a los 6 meses para añadir sintomatología declarada por los pacientes como la pérdida de pelo o el insomnio que no habían sido planteados por desconocerse en el diseño original. Los cuestionarios cuantificaban del 0 al 10 el grado de percepción de distintas manifestaciones del COVID-19 por parte de los sujetos. El 0 se correspondía con la puntuación más baja (no tenían este síntoma) mientras que el 10 fue la puntuación máxima (padecían mucho este síntoma).

- **Análisis de datos**

En este trabajo se realizó el análisis estadístico de la relación entre la variante y las características clínicas y la evolución de cada individuo desde su ingreso hospitalario. De esta forma, se clasificó a los pacientes según la cepa infectante y las características clínicas y bioquímicas asociadas al ingreso y se compararon con los datos recogidos durante el seguimiento anual. Cada variante se consideró como una entidad clínica o enfermedad diferente, y se trató a nivel estadístico como muestras independientes.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 28.0. Las variables continuas se expresan como mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75 (Q1, Q3) y las variables categóricas como recuento o frecuencia y porcentaje correspondiente. Se realizó un estudio de normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, clasificando nuestras variables como no paramétricas, a excepción de la edad y el índice de masa corporal (IMC) que siguen una distribución normal para nuestra cohorte.

Para el estudio de las variables cualitativas o categóricas, se realizó una comparación de las proporciones mediante la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher. En el caso de las variables cuantitativas se utilizó el test de Mann-Whitney-Wilcoxon, diseñado para comparar las medianas si nos encontramos con una variable no paramétrica. Si la variable

analizada seguía una distribución normal, se aplicó la prueba de la t de Student para comparación de medias.

Finalmente se hizo un estudio de frecuencias para comparar los resultados de los cuestionarios con el registro de los síntomas al ingreso, y su persistencia al mes, a los seis meses y a los 12 meses desde el alta hospitalaria. Para este estudio de frecuencias se agruparon las variables que describen los síntomas del COVID-19 por puntuación mayor o igual a 4 en una escala de 10, manteniendo la división entre la cepa o variante infectante del virus. Los resultados se describen como recuento y porcentaje de los sujetos con puntuación alta ( $\geq 4$  sobre 10) para las manifestaciones y secuelas de la enfermedad, y el valor p para la prueba de chi-cuadrado.

- **Dificultades y limitaciones**

De la cohorte inicial de 1079 pacientes la muestra poblacional final se situó en 555 pacientes, que sí disponían de muestra nasofaríngea y dos registros de seguimiento. Se realizó la purificación y extracción de ARN exclusivamente en las muestras de dichos pacientes, sorteando de esta forma el sesgo de selección a causa de la pérdida de seguimiento. Este cribado inicial para la selección de nuestra población influye indirectamente a reducir el sesgo de información, ya que limita la muestra a aquella parte de los pacientes de los que se obtuvieron los datos de evolución durante el periodo de tiempo definido (un año).

Se realizaron 296 RT-PCR multiplex, pero finalmente el tamaño muestral quedó reducido a 233 pacientes por la falta de resultados concluyentes para algunas muestras (56 muestras) y por cuestionarios incompletos en el caso de algunos pacientes (7 sujetos). Sin embargo, el número de muestras se consideró adecuado y representativo para llevar a cabo un estudio piloto con el objetivo definido.

Basándonos en los resultados obtenidos al realizar la RT-PCR multiplex, se decidió descartar a 8 sujetos que estaban infectados con la variante beta por presentarse únicamente en este reducido grupo de pacientes. La escasa prevalencia de esta variante en las muestras seleccionadas con respecto a la cepa original, de la que contamos con 165 sujetos, y la variante alfa, de la disponemos de 60 pacientes para este estudio piloto, reduce la reproducibilidad y representatividad de los resultados obtenidos en la comparación de variantes a causa de la amplia diferencia existente entre los tamaños muestrales de las variantes.

Probablemente durante el desarrollo del estudio, aún incipiente, irán surgiendo otros problemas que provoquen la aparición de sesgo de análisis, siendo necesario desarrollar estrategias para su manejo o cuantificación.

### **- Plan de trabajo**

Para llevar a cabo este estudio se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de diciembre de 2020 y febrero de 2021 la recogida de los frotis nasofaríngeos de 1079 pacientes con PCR positiva para COVID-19 y que fueron ingresados en el Hospital Universitario General de Elche. Todos los frotis se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su adecuada conservación y procesamiento posterior.

En una base de datos online creada en REDCap se registraron las características antropométricas de los pacientes y toda la información referente a la sintomatología padecida por los pacientes durante su ingreso y su evolución. Posteriormente se hizo un seguimiento de estos pacientes desde el servicio de Enfermedades Infecciosas de dicho hospital a los 6 meses y a los 12 meses desde que cursaron la infección analizando las repercusiones y secuelas que percibían y relacionaban con el virus. El registro informatizado permitió obviar la pérdida de la información, que se encontraba clasificada, volcada y anonimizada facilitando el procesamiento, análisis y comprensión de los datos por parte de todos los investigadores del proyecto.

Los datos bioquímicos de los pacientes se obtuvieron directamente del Sistema Informático del Laboratorio GestLab.

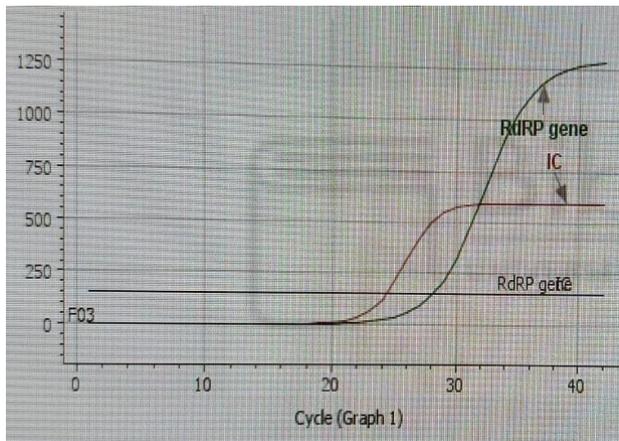
A partir de los frotis nasofaríngeos recogidos, se realizó la extracción y purificación del material genético del virus (ARN) haciendo uso del kit comercial Code 202 Mag Core® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Low PCR Inhibition) y el extractor Mag Core® HF16 Plus (RBC Bioscience Corp., Taiwan)<sup>5</sup>. Este procedimiento está basado en el uso de partículas magnéticas que retienen el material genético correspondiente, quedando finalmente disponible para un estudio posterior mediante PCR. Se utilizó una muestra de 400  $\mu\text{L}$  del medio conservante del frotis para realizar la extracción y se obtuvo el eluido de ARN purificado y concentrado (40  $\mu\text{L}$ ) que se congeló y almacenó inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El estudio del material genético del virus (ARN) se realizó mediante el uso de una RT-PCR multiplex (Allplex™ SARS-CoV-2 Variants I (Seegene Inc., South Korea))<sup>6</sup> que lleva a cabo la detección de las mutaciones más significativas de las VOC del COVID-

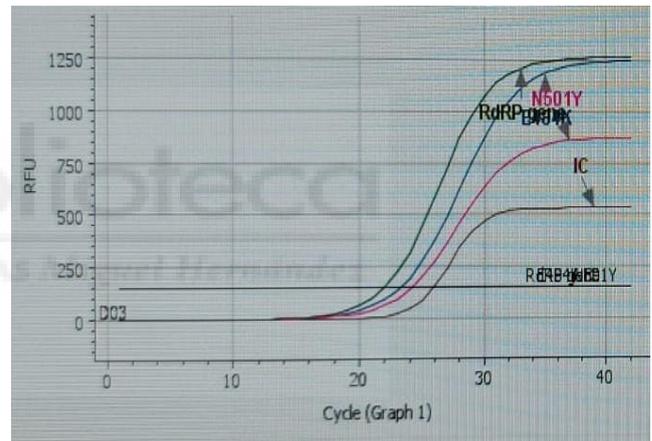
19. El kit detecta una región altamente conservada en el gen RdRP, y diferencia 3 mutaciones en el gen S (delección HV 69-70, E484K y N501Y). Además es capaz de proporcionar el valor de Ct individual correspondiente a cada gen. Se tomó la Ct del gen RdRP para el análisis estadístico.

Con la PCR podremos identificar tres variantes:

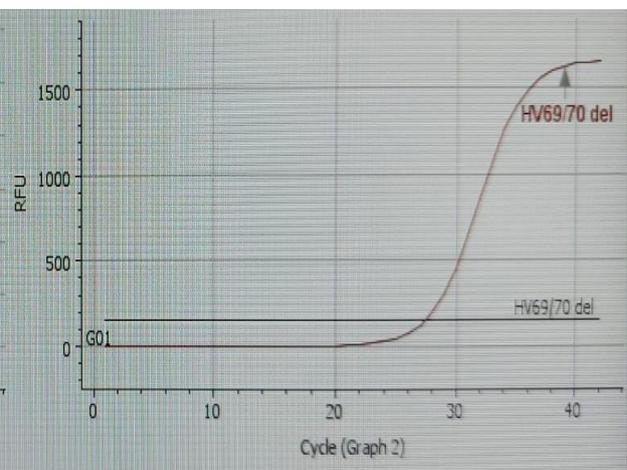
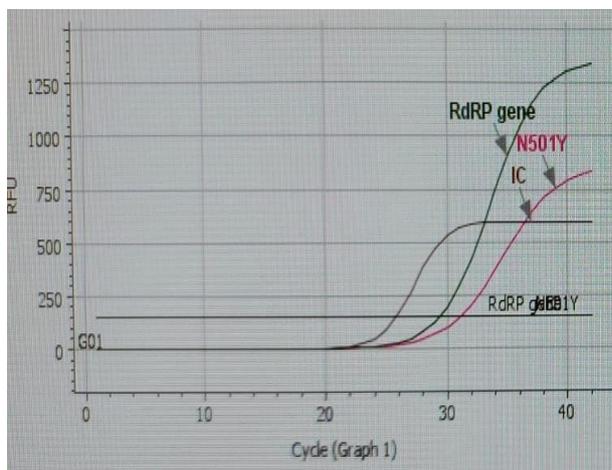
- Cepa original: en el resultado vemos reflejada la presencia de la región altamente conservada en el gen RdRP.
- Variante alfa: manifiesta tanto la región altamente conservada en el gen RdRP como la delección HV 69-70 y la mutación N501Y.
- Variante beta: presenta la región altamente conservada en el gen RdRP, la mutación N501Y en común con la alfa, como se ha comentado previamente, y además la mutación E484K.



**Figura 2. RT-PCR multiplex cepa primitiva**



**Figura 3. RT-PCR multiplex variante beta**



**Figura 4. RT-PCR multiplex variante alfa**

### **- Aspectos éticos a tener en cuenta**

El protocolo con número de registro (PI 46/2020) fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Universitario de Elche para estudios que involucren humanos como participantes. El consentimiento informado escrito no se requirió para este estudio en concordancia con la legislación nacional y los requerimientos institucionales.

### **- Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados obtenidos o previsibles**

Al tratarse de un estudio exploratorio piloto, este proyecto tiene utilidad práctica para los investigadores que van a desarrollar su ampliación, permitiendo detectar errores de recogida de los datos en los cuestionarios y múltiples puntos de mejora como la inclusión de datos analíticos a los 6 meses y al año de seguimiento, información que no estaba disponible para esta aproximación inicial.

### **- Presupuesto**

Para el desarrollo de este proyecto se dispone de todos los recursos necesarios.

### **- Análisis e interpretación de los resultados**

El resultado de la RT-PCR multiplex clasificó las 233 muestras finales de estudio según la variante infectiva de la siguiente forma:

- 165 muestras con la cepa original (92 hombres, 73 mujeres).
- 60 muestras con la variante alfa (33 hombres, 26 mujeres).
- 8 muestras con la variante beta (6 hombres, 2 mujeres).

Debido a la inesperada poca representación de la variante beta, todo el estudio se desarrolló en base a la variante original y la variante alfa, y la comparación entre ambas. Los 8 pacientes con la variante beta se correspondían con sujetos ingresados a partir del 15 de enero de 2021, por lo que es probable que en próximos estudios al incluir las muestras recogidas en febrero de 2021, este grupo aumente debido a la aparición de esta

variante posteriormente<sup>1</sup> a lo esperado cuando se decidió la selección de los pacientes incluidos en este proyecto.

En la tabla 1 se encuentran descritos los sujetos de la cohorte en base a su sexo, edad, IMC y enfermedades crónicas o comorbilidades inherentes a estos pacientes al ingreso, dividido por la variante infectante. En ambos grupos el porcentaje de hombres fue ligeramente mayor que el de las mujeres (55,8% y 55% en la cepa original y la variante alfa respectivamente) pero no se encontraron diferencias significativas entre ellos. También la edad en los dos grupos fue similar, con una mediana de 65,9 años en el grupo con la cepa original, ligeramente superior a los 64,2 años de los pacientes con la variante alfa. El dato del IMC clasificó a nuestros pacientes como sujetos con sobrepeso u obesidad grado 1, lo que ha sido considerado un factor de riesgo que favorece las complicaciones durante el desarrollo de la enfermedad causada por el COVID-19<sup>7</sup>.

Si examinamos las comorbilidades de la cohorte, la enfermedad crónica más frecuente en la población fue la hipertensión arterial, seguida de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, todas ellas probablemente relacionadas con la presencia de obesidad en nuestra población. Finalmente y con una frecuencia menor encontramos las enfermedades respiratorias. Las proporciones en ambos grupos fueron similares, por lo que la mediana para el Índice de Charlson no fue diferente, y clasificó a nuestra población en un rango de riesgo intermedio por la presencia de comorbilidades<sup>4</sup>, sin mostrar diferencias significativas entre los dos grupos.

En base a esta descripción, podría decirse que la cohorte de pacientes fue homogénea respecto a las características demográficas y antropométricas y, por lo tanto, ni la edad, el sexo, el IMC o las comorbilidades actuaron como elementos confusores a la hora de analizar los resultados sobre la evolución a corto, medio y largo plazo.

Asimismo en la tabla 1 se detallan los días desde que los pacientes declararon que iniciaron los síntomas asociados al SARS-CoV-2 y lo días de duración del ingreso hospitalario. Si nos fijamos en los cuartiles vemos que el periodo de aparición de los síntomas fue más breve en el caso de la variante alfa, y fue esta misma la que implica mayor tiempo de estancia hospitalaria, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Uno de los criterios definitorios de la enfermedad grave por COVID-19 fue la aparición de neumonía con infiltrado pulmonar bilateral en la radiografía. Se observó una tendencia por parte de los pacientes con la variante alfa a la aparición más frecuente de neumonía

con este tipo de patrón, a pesar de que no llegaron a apreciarse diferencias significativas con la el conjunto de la cepa original.

En la parte central de la tabla se hace referencia a las complicaciones presentadas por los pacientes durante su estancia hospitalaria, objetivándose similitud entre ambos grupos en el uso de diferentes dispositivos de oxigenoterapia y ventilación mecánica. Fue semejante a su vez el porcentaje de pacientes que requirieron traslado a UCI.

Sin embargo, la aparición de coinfección con otros microorganismos (bacterias, hongos, etc.) si podría ser diferente entre las dos variantes contrastadas.

Finalmente se registran los pacientes que no superaron la enfermedad y fallecieron durante el ingreso.

Otros datos que encontramos en esta tabla son los referentes a los tratamientos que recibieron estos pacientes durante el ingreso. Cuando se realizó este estudio, la pandemia mundial causada por el COVID-19 llevaba aproximadamente un año desde su inicio, por lo que los clínicos de todo el mundo habían intercambiado el conocimiento adquirido durante estos meses para evitar las complicaciones de la enfermedad. La experiencia demostraba la utilidad de algunos tratamientos disponibles en el mercado con indicación para otras patologías, que habían resultado eficaces frente al virus<sup>8</sup>, como es el caso de los corticoides, que fueron administrados a cerca de la totalidad de nuestra cohorte. Del mismo modo, se encuentran recogidos los datos sobre el tratamiento con remdesivir y tocilizumab<sup>8</sup>, un antiviral y un antagonista del receptor de IL-6 respectivamente, ampliamente utilizados para el manejo de los pacientes complicados y que se usaron de forma similar en los dos grupos.

Cuando se inició este estudio, las vacunas frente al SARS-CoV-2 se encontraban en las últimas fases de evaluación<sup>3</sup>, por lo que los pacientes de nuestra cohorte no están vacunados al comienzo del proyecto, pero llegada la finalización del seguimiento, cerca del 95% ya había recibido al menos una dosis de la vacuna.

<b>VARIABLES al INGRESO</b>	<b>Cepa original N=165</b>	<b>Variante alfa N=60</b>	<b>p</b>
Sexo, masculino	92 (55,8)	33 (55)	0,846
Edad, años	65,9 (63,9-67,9)	64,2 (60,7-67,8)	0,697
IMC	30,4 (29,3-31,5)	30,5 (28,7-32,4)	0,609
<b>Comorbilidades</b>			
Diabetes	39 (23,6)	11 (18,3)	0,506
Hipertensión arterial (HTA)	75 (45,5)	27 (45)	0,928
Enfermedades cardiovasculares	52 (31,5)	13 (21,7)	0,202
Ictus	8 (4,8)	1 (1,7)	0,489
Enfermedades respiratorias (asma, EPOC)	26 (15,8)	11 (18,3)	0,797

Enfermedad renal	9 (5,5)	3 (5)	0,840
Cáncer	11 (6,7)	5 (8,3)	0,891
Índice de comorbilidad de Charlson	2 (1-4)	2 (1-4)	0,369
<b>Estado clínico</b>			
Días desde inicio de síntomas al ingreso	6 (3-9)	5 (3-7)	0,760
Días de estancia hospitalaria	4 (3-7)	5 (3-7)	0,212
Neumonía	144 (87,3)	57 (95)	0,098
Infiltrado bilateral en la radiografía	82 (71,9)	46 (82,1)	0,148
Evolución de la radiografía			
- No se modifica	53 (80,3)	20 (69)	0,346
- Mejora	5 (7,6)	3 (10,3)	
- Empeora	8 (12,1)	6 (20,7)	
<b>Complicaciones durante el ingreso</b>			
Muerte	3 (8,1)	0 (0)	0,923
Ingreso en UCI	7 (18,9)	2 (14,3)	0,823
Requiere Ventilación Mecánica (VMI)	3 (8,1)	2 (14,3)	0,916
Gafas de oxígeno de alto flujo (ONAF)	16 (43,2)	5 (35,7)	0,808
VMK-reservorio	12 (32,4)	5 (35,7)	0,863
BiPAP	3 (8,1)	0 (0)	0,652
Medidas de soporte	3 (8,1)	2 (14,3)	0,916
Trombosis (incluido tromboembolismo pulmonar (TEP))	7 (18,9)	1 (7,1)	0,525
Coinfección	3 (8,1)	5 (35,7)	0,052
Hemorragia	2 (5,4)	0 (0)	0,923
<b>Tratamiento antiviral o inmunomodulador</b>			
Remdesivir	111 (67,3)	46 (76,7)	0,233
Corticosteroids <sup>&amp;</sup>	163 (98,8)	60 (100)	1,000
Tocilizumab	121 (73,3)	49 (81,7)	0,267
<b>Vacunación posterior</b>	156 (94,5)	57 (95)	0,840
<b>Valores de los biomarcadores analíticos</b>			
<b>Valores de los biomarcadores al ingreso</b>			
<b>RT-PCR multiplex, umbral de ciclos (Ct)</b>	24,86 (23,92-25,87)	25,06 (23,83-26,75)	0,393
Creatinina, mg/dL	0,8 (0,6-1)	0,8 (0,6-1)	0,323
Dimero D, µg/mL	0,54 (0,34-0,84)	0,56 (0,33-0,91)	0,675
Fibrinógeno, mg/dL	699 (568-908)	674 (549-831)	0,299
Hemoglobina, g/dL	13,9 (13-14,9)	14,1 (12,8-15,1)	0,991
Plaquetas, x103/µL	187 (143-223)	171 (151-231)	0,542
Leucocitos, x103/µL	6,23 (4,73-8,53)	4,91 (4,11-6,38)	<0,001*
Linfocitos, x103/µL	0,92 (0,68-1,34)	0,97 (0,58-1,16)	0,269
Neutrófilos, x103/µL	4,48 (3,36-6,49)	3,67 (2,63-4,79)	<0,001*
Cociente Neutrófilos/Linfocitos	4,5 (3,1-7,2)	3,7 (2,7-5,6)	0,054
Interleukina 6 (IL-6), pg/mL	11,6 (5,9-49,4)	23 (11-122,5)	0,141
Proteína C reactiva, mg/L	46 (24,9-104)	47,8 (27,8-99,7)	0,873
Ferritina, ng/mL	323,5 (176-723)	413 (311-767)	0,188
Procalcitonina, ng/ml	0,13 (0,09-0,4)	0,12 (0,09-0,17)	0,246
GOT/AST, IU/L	45 (35-56)	48 (37-67)	0,202
GPT/ALT, IU/L	30 (21-48)	34,5 (20-55)	0,393
LDH, IU/L	263 (216-312)	307 (246-391)	0,004*
pCO <sub>2</sub> , mmHg	36,8 (33,3-40,3)	36,2 (34,1-39,2)	0,851
pO <sub>2</sub> , mmHg	75,8 (65,5-89)	71,7 (66,8-90)	0,732
<b>Síntomas característicos de COVID-19 ≥4 durante el ingreso hospitalario</b>			
Tos al ingreso	104 (63)	36 (60)	0,678
Dificultad respiratoria al ingreso	93 (56,4)	29 (48,3)	0,285
Dolor muscular al ingreso	49 (29,7)	16 (26,7)	0,657
Cansancio al ingreso	64 (38,8)	12 (20)	0,008*
Dolor de cabeza al ingreso	22 (13,3)	13 (21,7)	0,127
Congestión nasal al ingreso	13 (7,9)	6 (10)	0,613

Anosmia al ingreso	13 (7,9)	1 (1,7)	0,088
Sudoración al ingreso	1 (0,6)	1 (1,7)	0,454
Síntomas digestivos al ingreso	35 (21,2)	9 (15)	0,299

**Tabla 1. Características de las personas con COVID-19 ingresadas en el hospital en función de la variante infectiva al ingreso.**

Las variables categóricas se expresan como recuento y porcentaje. Las variables continuas se presentan como mediana (Q1-Q3) para variables no paramétricas o como media (IC) para variables paramétricas. Se incluye el valor p para todas las variables obtenido con la prueba chi-cuadrado para las variables categóricas y el test U de Mann Whitney en las variables continuas.

&Corticoides por vía oral o intravenosa: dexametasona o metilprednisolona 0,5-1 mg/kg/día divididos en dos dosis intravenosas durante tres días.

En los resultados de la tabla 1 se encuentran expuestos los ciclos o ‘cycle threshold’ de la RT-PCR multiplex realizada, que se correlacionaron con la carga viral o copias del ARN viral en las muestras de frotis nasofaríngeo al ingreso. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados (24,86 (23,92-25,87) frente a 25,06 (23,83-26,75),  $p=0,393$ ).

Las diferencias más significativas entre los sujetos del estudio se observaron principalmente al ingreso hospitalario, momento más agudo de la infección. Así lo demostraron los valores de la analítica que se realizó a los pacientes a su ingreso. Se encontraron diferencias significativas entre las cepas infectantes para los resultados de leucocitos absolutos y neutrófilos absolutos, observándose mayor respuesta del sistema inmune frente a la infección viral en los sujetos con la cepa original, lo que afectó directamente en un resultado mayor para el cociente de neutrófilos/linfocitos. Algunos autores han definido este índice como marcador de inflamación subclínica con valor pronóstico en pacientes con COVID-19<sup>9</sup>, y aunque no está del todo claro, muchos establecen como punto de corte un cociente de neutrófilos/linfocitos con valor  $\geq 3$  para asociarlo al desarrollo de un cuadro grave por la enfermedad<sup>10</sup>. En nuestro caso observamos una clara tendencia que indicaría que el cociente de neutrófilos/linfocitos fue significativamente mayor en el grupo infectado por la cepa original al ingreso, siendo su valor  $\geq 3$  en ambos grupos (4,5 (3,1-7,2) en la cepa original y 3,7 (2,7-5,6) en la variante alfa), confirmando la enfermedad grave en este grupo de pacientes, lo que desencadenó definitivamente su ingreso hospitalario.

Otro resultado que reflejó significación estadística fue el obtenido para la LDH, mostrando un incremento mayor en el grupo con la variante alfa. Una elevación de la LDH se relaciona con un daño orgánico. Algunos autores han asociado la elevación de LDH durante la infección por COVID-19 con un incremento en las posibilidades de padecer un cuadro grave de la enfermedad o incluso de fallecer<sup>11</sup>. Sin embargo, su

significado clínico es inespecífico, ya que se trata de una enzima implicada en múltiples procesos y órganos (hematíes, corazón, hígado, músculo, etc.).

En cuanto a la sintomatología relacionada con el COVID-19 conviene destacar la diferencia significativa que se detectó para el cansancio de los pacientes al ingreso, visiblemente mayor en el caso de la cepa original (38,8% de los pacientes frente al 20% que declararon cansancio en el conjunto de la variante alfa). También se observó mayor presencia de anosmia en el grupo con la cepa original que en el grupo con la variante alfa (7,9% frente al 1,7% respectivamente) con un valor p cercano a la significación estadística. Este síntoma fue uno de los que se definió como identificativos de la presencia de COVID-19 durante la ‘primera ola’ de la pandemia en 2019<sup>12</sup>, y permitía diferenciar la infección por SARS-CoV-2 de un síndrome catarral común en este periodo de tiempo en el que no existían pruebas diagnósticas disponibles de forma generalizada.

Valores de los biomarcadores analíticos	Cepa original N=165	Variante alfa N=60	p
<b>Valores de los biomarcadores al alta</b>			
Creatinina, mg/dL	0,70 (0,60-0,90)	0,72 (0,60-0,90)	0,898
Dimero D, µg/mL	0,47 (0,29-0,84)	0,44 (0,28-0,74)	0,465
Fibrinógeno, mg/dL	472 (336-624)	394 (307-525)	0,043*
Hemoglobina, g/dL	13,7 (12,5-14,6)	14 (13,3-14,9)	0,075
Plaquetas, x103/µL	249 (181-314)	228 (192-338)	0,968
Leucocitos, x103/µL	6,67 (4,87-9,5)	5,84 (4,28-7,8)	0,054
Linfocitos, x103/µL	1,23 (0,9-1,78)	1,22 (0,93-1,55)	0,780
Neutrófilos, x103/µL	4,85 (2,9-7,57)	3,98 (2,55-5,73)	0,059
Cociente Neutrófilos/Linfocitos	4 (2,1-6)	3,4 (1,8-5,2)	0,167
Interleukina 6 (IL-6), pg/mL	43,3 (18,3-84,6)	53 (19-135,1)	0,216
Proteína C reactiva, mg/L	10,1 (1,5-25,8)	5,6 (0,5-18,4)	0,112
Ferritina, ng/mL	350 (165-631)	399 (246-639)	0,370
Procalcitonina, ng/ml	0,06 (0,05-0,08)	0,06 (0,05-0,14)	0,684
GOT/AST, IU/L	39 (28-50)	44 (36-63)	0,010*
GPT/ALT, IU/L	42 (27-75)	58 (28-85)	0,131
LDH, IU/L	237 (206-277)	260 (231-312)	0,005*
pCO <sub>2</sub> , mmHg	41,1 (38-45,1)	40,4 (33,9-50,1)	0,951
pO <sub>2</sub> , mmHg	78,6 (52,8-116)	86,75 (70,1-90,1)	0,770
<b>Valores de los biomarcadores al mes</b>			
Creatinina, mg/dL	0,75 (0,65-0,89)	0,72 (0,65-0,90)	0,728
Dimero D, µg/mL	0,35 (0,21-0,57)	0,35 (0,19-0,69)	0,887
Fibrinógeno, mg/dL	358 (293-478)	338 (295-418)	0,290
Hemoglobina, g/dL	13,7 (12,8-14,7)	14 (13,1-15,1)	0,396
Plaquetas, x103/µL	236 (199-289)	245 (193-271)	0,981
Leucocitos, x103/µL	6,32 (5,04-7,4)	6 (5,22-7,38)	0,984
Linfocitos, x103/µL	1,64 (1,39-2,14)	1,67 (1,35-2,14)	0,807
Neutrófilos, x103/µL	3,67 (2,89-4,62)	3,57 (3,01-4,21)	0,636
Cociente Neutrófilos/Linfocitos	2,06 (1,5-2,76)	2,02 (1,49-2,48)	0,826
Interleukina 6 (IL-6), pg/mL	2,7 (1,5-6,7)	3,1 (1,5-6,8)	0,668
Proteína C reactiva, mg/L	0,5 (0,2-3)	0,4 (0,2-1,3)	0,263
Ferritina, ng/mL	93,4 (45,9-174)	82,3 (49,1-142)	0,565
Procalcitonina, ng/ml	0,05 (0,04-0,07)	0,05 (0,04-0,07)	0,294

GOT/AST, IU/L	29 (25-36)	32 (26-39)	0,222
GPT/ALT, IU/L	27 (18-41)	27 (18-43)	0,650
LDH, IU/L	210 (186-232)	209 (194-233)	0,391

**Tabla 2. Valores de los biomarcadores analíticos al alta y al mes.**

Las variables continuas se presentan como mediana (Q1-Q3). Se incluye el valor p para todas las variables obtenido con el test U de Mann Whitney.

En la tabla 2 vemos reflejados los valores de los biomarcadores plasmáticos obtenidos en las analíticas que se realizaron el día que los pacientes recibieron el alta hospitalaria y al mes de ésta. Se siguió observando mayor cantidad de leucocitos y neutrófilos en el grupo con la cepa original al alta a pesar de haberse perdido la significación estadística que hallábamos al ingreso. Las cifras del cociente de neutrófilos/linfocitos sufrieron una ligera disminución hacia la normalización, aunque seguían considerándose de riesgo para la forma grave de la enfermedad, debido a la mejora de la linfopenia registrada al ingreso hospitalario. Finalmente vemos como este cociente cayó por debajo del riesgo al mes de seguimiento (2,06 (1,5-2,76) en el grupo con la cepa original y 2,02 (1,49-2,48) en la variante alfa), igualándose en ambos grupos.

La elevación de la LDH para el grupo con la variante alfa siguió siendo estadísticamente significativa al alta, aunque vemos como se normalizó al mes de seguimiento de los pacientes.

En la analítica realizada cuando los pacientes fueron dados de alta observamos la aparición de significación estadística para el valor del fibrinógeno, resultando este significativamente mayor en los pacientes con la cepa original.

Ocurre lo contrario en el caso de la GOT, siendo la elevación de esta enzima marcadora de daño hepático significativamente mayor en el grupo con la variante alfa.

Sintomas durante el seguimiento ( $\geq 4$ puntos)	Variante original	Variante alfa	p
Tos al mes	6 (4)	1 (1,9)	0.48
Tos al sexto mes	9 (6,2)	3 (5,8)	0.918
Tos al año	15 (11,8)	4 (9,1)	0.621
Dificultad respiratoria al mes	16 (10,7)	8 (15,4)	0.365
Dificultad respiratoria al sexto mes	27 (18,5)	7 (13,5)	0.409
Dificultad respiratoria al año	30 (23,6)	7 (15,9)	0.284
Estado general al mes	25 (16,7)	7 (13,5)	0.585
Estado general al sexto mes	35 (24)	10 (19,2)	0.484
Estado general al año	26 (20,5)	3 (6,8)	0.038*
Dolor muscular al mes	20 (13,3)	6 (11,5)	0.739
Dolor muscular al sexto mes	41 (28,1)	11 (21,2)	0.330
Dolor muscular al año	36 (28,3)	9 (20,5)	0.306

Cansancio al mes	47 (31,3)	14 (26,9)	0.551
Cansancio al sexto mes	56 (38,4)	18 (34,6)	0.632
Cansancio al año	46 (36,2)	9 (20,5)	0.054
Dolor de cabeza al mes	7 (4,7)	4 (7,7)	0.407
Dolor de cabeza al sexto mes	16 (11)	8 (15,4)	0.401
Dolor de cabeza al año	17 (13,4)	4 (9,1)	0.454
Congestión nasal al mes	8 (5,3)	1 (1,9)	0.304
Congestión nasal al sexto mes	18 (12,3)	4 (7,7)	0.361
Congestión nasal al año	22 (17,3)	4 (9,1)	0.190
Anosmia al mes	9 (6)	3 (5,8)	0.952
Anosmia al sexto mes	9 (6,2)	0 (0)	0.067
Anosmia al año	5 (3,9)	3 (6,8)	0.435
Sudoración al mes	1 (0,7)	1 (1,9)	0.430
Sudoración al sexto mes	20 (13,7)	6 (11,5)	0.692
Sudoración al año	12 (9,4)	2 (4,5)	0.307
Síntomas digestivos al mes	5 (3,3)	3 (5,8)	0.438
Síntomas digestivos al sexto mes	10 (6,8)	5 (9,6)	0.517
Síntomas digestivos al año	15 (11,8)	2 (4,5)	0.165
<b>Síntomas de nueva aparición durante el estudio (<math>\geq 4</math> puntos)</b>	<b>Variante original</b>	<b>Variante alfa</b>	<b>p</b>
Palpitaciones al sexto mes	6 (4,1)	6 (5,8)	0.622
Palpitaciones al año	17 (13,4)	2 (4,5)	0.108
Pérdida de pelo al sexto mes	24 (16,4)	15 (28,8)	0.053
Pérdida de pelo al año	18 (14,2)	8 (18,2)	0.523
Falta de concentración al sexto mes	32 (21,9)	8 (15,4)	0.314
Falta de concentración al año	35 (27,6)	9 (20,5)	0.353
Insomnio al sexto mes	32 (21,9)	6 (11,5)	0.103
Insomnio al año	28 (22)	10 (22,7)	0.926
Ansiedad al sexto mes	29 (19,9)	6 (11,5)	0.177
Ansiedad al año	29 (22,8)	9 (20,5)	0.743

**Tabla 3. Síntomas persistentes y secuelas de la infección por COVID-19 a corto, medio y largo plazo (al mes, los 6 meses y año del alta hospitalaria).**

Las variables categóricas se expresan como recuento y porcentaje. Se incluye el valor p para todas las variables obtenido con la prueba chi-cuadrado.

Para concluir el estudio, se incluyó una última tabla (tabla 3) que recoge la evolución de los síntomas persistentes más característicos de la infección por SARS-CoV-2 a corto, medio y largo plazo (1 mes, 6 meses y 12 meses) desde el momento en el que se produjo el alta hospitalaria de la cohorte. Es importante destacar en primer lugar las secuelas o síntomas persistentes para los que se obtuvo significación estadística entre las variantes. Como se ha visto en el desarrollo del trabajo, se confirmó que a largo plazo (al año de recibir el alta hospitalaria) el estado de salud general de los pacientes es significativamente peor para aquellos pacientes con primoinfección por la cepa original aparecida en Wuhan inicialmente (20,5% frente a 6,8% de los pacientes de cada grupo respectivamente).

Se encontró también, al igual que en el momento del ingreso, que el cansancio percibido por los pacientes a largo plazo (al año del alta) fue mayor en aquellos infectados con la cepa original, a pesar de no obtener significación estadística en este punto.

Otro dato que resultó de interés aunque no mostró valores estadísticamente significativos es la persistencia de anosmia a los seis meses del alta en los pacientes del grupo con la cepa original (6,2% frente a 0%) como ya percibíamos al ingreso.

Durante la ejecución del estudio, y ante el desconocimiento de las manifestaciones clínicas del virus en ese momento, se agregaron a los cuestionarios algunos síntomas de nueva aparición que se consideraba necesario medir a lo largo del tiempo por la frecuencia con la que los pacientes los informaban, viéndose una tendencia a la significación en el caso de la pérdida de pelo a medio plazo (al sexto mes desde el alta), resultando ésta más llamativa en el grupo con la variante alfa.

Para terminar, si nos centramos en la persistencia de los síntomas relacionados con el COVID-19 en el seguimiento a corto plazo, no se observaron diferencias entre los dos grupos estudiados.

#### **- Consideraciones finales y conclusiones**

1. A través del análisis de las variantes se confirmó la convivencia de al menos tres variantes del virus SARS-CoV-2 durante la 'tercera ola' de la pandemia.
2. No hubo diferencias significativas en la presentación clínica entre las dos variantes analizadas (original y alfa). Las diferencias encontradas a nivel analítico fueron poco relevantes desde el punto de vista clínico.
3. Las secuelas o síntomas generales persistentes de la infección por SARS-CoV-2 a medio y largo plazo fueron mayores en el grupo que tiene como cepa infectante la original.

#### **- Recomendaciones para futuras investigaciones**

El aumento del tamaño muestral en posteriores investigaciones es necesario para mejorar previsiblemente la significación estadística de las pruebas aplicadas y ratificar las conclusiones extraídas de este estudio piloto. La inclusión de más muestras, por otro lado, aumentará la N de la variante beta, permitiendo establecer comparaciones con otra

variante más que tal vez difiera de forma más marcada de las variables anteriores, desarrolladas en este proyecto.



## - Bibliografía

1. Funk T, Pharris A, Spiteri G, Bundle N, Melidou A, Carr M, et al.; COVID study groups. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill.* 2021 Apr;26(16):2100348. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.16.2100348. PMID: 33890566; PMCID: PMC8063589.
2. Aleem A, Akbar Samad AB, Slenker AK. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). 2022 Feb 6. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 34033342.
3. Khan A, Khan T, Ali S, Aftab S, Wang Y, Qiankun W, Khan M, Suleman M, Ali S, Heng W, Ali SS, Wei DQ, Mohammad A. SARS-CoV-2 nuevas variantes: Características e impacto en la eficacia de las diferentes vacunas. *Farmacéutico biomédico.* 2021 noviembre; 143: 112176. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112176. Epub 11 de septiembre de 2021. PMID: 34562770; PMCID: PMC8433040.
4. Tuty Kuswardhani RA, Henrina J, Pranata R, Anthonius Lim M, Lawrensia S, Suastika K. Charlson comorbidity index and a composite of poor outcomes in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 Nov-Dec;14(6):2103-2109. doi: 10.1016/j.dsx.2020.10.022. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33161221; PMCID: PMC7598371.
5. RCBioscience for Automated Extraction of Viral DNA/RNA from Plasma, Serum and Body Fluids. <https://www.rcbioscienceusa.com/product/magcore-viral-nucleic-acid-extraction-kit/>
6. Novaplex™ SARS-CoV-2 Variants Assays\*. <https://seegenetech.com/novaplex-sars-cov-2-variants-ii-assay/>
7. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev.* 2021 Feb;37(2):e3377. doi: 10.1002/dmrr.3377. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32588943; PMCID: PMC7361201.
8. Nhean S, Varela ME, Nguyen YN, Juarez A, Huynh T, Udeh D, Tseng AL. COVID-19: A Review of Potential Treatments (Corticosteroids, Remdesivir, Tocilizumab, Bamlanivimab/Etesevimab, and Casirivimab/Imdevimab) and

- Pharmacological Considerations. *J Pharm Pract.* 2021 Oct 1:8971900211048139. doi: 10.1177/08971900211048139. Epub ahead of print. PMID: 34597525.
9. Carpio-Orantes LD, García-Méndez S, Hernández-Hernández SN. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and systemic immune-inflammation index in patients with COVID-19-associated pneumonia. *Gac Med Mex.* 2020;156(6):527-531. English. doi: 10.24875/GMM.M21000480. PMID: 33877106.
  10. Basbus L, Lapidus MI, Martingano I, Puga MC, Pollán J. índice neutrófilo-linfocito como factor pronóstico de COVID-19 [Neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker in COVID-19]. *Medicina (B Aires).* 2020;80 Suppl 3:31-36. Spanish. PMID: 32658845
  11. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, Lippi G. Los niveles de lactato deshidrogenasa predicen la gravedad y la mortalidad de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): un análisis combinado. *Soy J Emerg Med.* 2020 de septiembre; 38 (9): 1722-1726. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.073. Epub 2020 27 de mayo. PMID: 32738466; IDPM: PMC7251362.
  12. Najafloo R, Majidi J, Asghari A, Aleemardani M, Kamrava SK, Simorgh S, Seifalian A, Bagher Z, Seifalian AM. Mechanism of Anosmia Caused by Symptoms of COVID-19 and Emerging Treatments. *ACS Chem Neurosci.* 2021 Oct 20;12(20):3795-3805. doi: 10.1021/acchemneuro.1c00477. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34609841; PMCID: PMC8507153.



- Dolor de cabeza:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Sudoración:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Congestión nasal:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Dolor de garganta:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Síntomas digestivos:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Pérdida de olfato o gusto:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Palpitaciones:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Pérdida de pelo:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Falta de concentración:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Insomnio:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- Ansiedad o angustia:
 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
  
- ¿Ha padecido fiebre en las últimas 24 h? En caso afirmativo, especifique:
 

NO                       SI: \_\_\_\_\_°C
  
- Si padece cualquier otro síntoma, especifíquelo a continuación:



.....  
.....  
.....

- ¿Ha recibido alguna dosis de la vacuna contra la Covid-19?

NO     SI    En caso afirmativo, indique:

Fecha:

1º dosis:.....2º dosis:.....3º dosis:.....

Tipo de vacuna:

- Pfizer             Janssen  
 Moderna        AstraZeneca

Otro:.....  
.....

