



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

**EVOLUCIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA E
INMUNOLÓGICA A LARGO PLAZO DE LOS
PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR
SARS-COV-2: FACTORES PREDICTORES DE
COVID PERSISTENTE**

Javier García Abellán

Director de la tesis:

Dr. D. Félix Gutiérrez Rodero

Codirectora de la tesis:

Dra. Dña. Mar Masiá Canuto

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2022 -

La tesis doctoral de D. Javier García Abellán titulada “**EVOLUCIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA A LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2: FACTORES PREDICTORES DE COVID PERSISTENTE**” se presenta en modalidad de tesis por compendio de artículos publicados y como resultado de la investigación se han obtenido los siguientes indicios de calidad:

Publicaciones en revistas indexadas

- García-Abellán J, Padilla S, Fernández-González M, García JA, Agulló V, Andreo M, Ruiz S, Galiana A, Gutiérrez F, Masiá M. Antibody Response to SARS-CoV-2 is Associated with Long-term Clinical Outcome in Patients with COVID-19: a Longitudinal Study. *J Clin Immunol.* 2021 Oct;41(7):1490-1501. doi: 10.1007/s10875-021-01083-7. Epub 2021 Jul 17. PMID: 34273064; PMCID: PMC8285689.



El Dr. D. Félix Gutiérrez Rodero, director, y la La Dra. Dña. Mar Masiá Canuto, codirectora de la tesis doctoral titulada **“EVOLUCIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA A LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2: FACTORES PREDICTORES DE COVID PERSISTENTE”**.

INFORMAN:

Que D. Javier García Abellán ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“EVOLUCIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA A LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2: FACTORES PREDICTORES DE COVID PERSISTENTE”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d’Alacant a 24 de febrero de 2022.

Director de la tesis
Dr. D. Félix Gutiérrez Rodero

Codirectora de la tesis
Dra. Dña. Mar Masiá Canuto



El Dr. D. Vicente F. Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

INFORMA:

Que D. Javier García Abellán ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“EVOLUCIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA A LARGO PLAZO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2: FACTORES PREDICTORES DE COVID PERSISTENTE”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Sant Joan d’Alacant a 24 de febrero de 2022

Prof. Dr. D. Vicente F. Gil Guillén
Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y
Quirúrgicas

FINANCIACIÓN

Los fondos empleados para el desarrollo de la investigación provienen de las siguientes fuentes de financiación:

- RD16/0025/0038/Instituto de Salud Carlos III
- PI16/01740/Instituto de Salud Carlos III
- PI18/01861/Instituto de Salud Carlos III
- CM19/00160/Instituto de Salud Carlos III
- CM20/00066/Instituto de Salud Carlos III
- COV20/00005/Instituto de Salud Carlos III
- COV20/00156/Instituto de Salud Carlos III

AGRADECIMIENTOS:

A Félix, maestro y mentor, por creer y confiar en mí desde el primer momento, por guiarme y aconsejarme en el camino, por transmitirme tu entusiasmo por la medicina, los pacientes y la investigación, y por enseñarme tanto a nivel personal y profesional.

Trabajar y aprender a tu lado cada día es un auténtico privilegio y que hayas dirigido esta tesis, un orgullo y un regalo de valor incalculable. Sin duda, que te cruzaras en mi camino, marcó mi carrera profesional y he de confesar que me siento un verdadero afortunado por ello. Espero poder seguir a tu lado muchos años más. Siempre tendrás mi respeto y admiración y siempre te estaré agradecido.

A Mar, por ser un ejemplo de profesionalidad a seguir, por transmitirme tantas enseñanzas, consejos y ayudas y por darme la oportunidad de trabajar día a día a tu lado en la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Por mantener cada día la motivación y por tu ayuda en la confección de los artículos que conforman esta tesis. Sin tu esfuerzo y disponibilidad para guiar y codirigir este trabajo, no habríamos obtenido los frutos actuales.

A Marta, por compartir y vivir conmigo tantos momentos y experiencias, por escucharme en los buenos y malos momentos, por tu ayuda incondicional y por tu amabilidad y cariño en el aspecto personal. Haberte conocido a ti y a tu familia es un auténtico regalo en todos los sentidos, y trabajar contigo, un placer, que espero que se mantenga durante muchos años.

A Sergio, por compartir conmigo el trabajo diario, por convertirte en un hermano profesional, y por tu ejemplo constante de esfuerzo y humildad. A José López Escudero, por tu amabilidad desde el primer día y por enseñarme la importancia de las pequeñas grandes cosas de la vida, como el valor de la amistad, el compañerismo y la felicidad.

A Vanesa por compartir conmigo con entusiasmo esta experiencia vital hacia el Doctorado y a José Alberto, por tu paciencia y eterno sentido del humor para la resolución de las dudas en los análisis estadísticos de nuestro trabajo.

A toda la familia de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, Ángela, Paula, Telenti, Lucía, Fernando Montolio, Mar Carvajal, Rafa, Laura, María, Lorena, Yolanda, Fina, Vanesa, Jérica, Nuria, Sacra, Susi, Amalia, Pilar, Gabriel, Araceli, Catalina, Jennifer y Alba; por compartir conmigo el día a día, enriquecerlo y por hacerme sentir en el trabajo como si estuviera en mi casa.

A mis compañeros de Medicina Interna y del Hospital General Universitario de Elche, en especial a mi amiga Laura Navarro y a mis compañeros de residencia, Fernando Lidón, Vladi y Alejandro De La Torre, por tantos inolvidables momentos vividos.

A todos los pacientes que han colaborado y participado voluntariamente en el estudio, mi máximo agradecimiento.

A José Manuel Morales, por transmitirme tu pasión por la medicina y la ecografía, por apadrinarme durante mi estancia en Ciudad Real, por formar parte de mi evolución personal y profesional y por compartir conmigo tus vivencias y enseñanzas con la infinita generosidad que te caracteriza. Un ejemplo como persona y profesional que dignifica la profesión de médico.

A mis amigos, los HdB y las Milanás, por haber compartido tantos momentos y haber vivido tantas experiencias juntos, por vuestro apoyo y por estar siempre cerca cuando os he necesitado. Por muchos años más juntos.

A mi tío Jesús Miguel, por estar siempre a mi lado, por disfrutar de los buenos momentos conmigo y enorgullecerse de mis logros como si fueran propios, por apoyarme en todo momento y darme siempre los mejores consejos. Por ser lo más parecido a un hermano gemelo y por ser un ejemplo de vida, a quien admirar como persona y médico. A mi tía Alicia, y mis primos Alejandro y Beatriz, por creer en mí, enseñarme y por compartir conmigo tantas experiencias desde la infancia. A mi tía Josi y mi tía Encarna por el afecto que me habéis entregado desde pequeño.

A Maribel, por tu generosidad y por el cariño que siempre nos has transmitido a mi madre y a mí.

A mi padre por tu cariño, protección y esfuerzo ejemplar que han permitido que hoy sea la persona que soy y por tener tu ayuda siempre que la he necesitado. A mi hermano, por cuidarme como hermano mayor y por abrir el camino en muchos aspectos, por tu buen corazón y tus sentimientos sinceros, y porque siempre te he admirado, aunque pocas veces te lo haya confesado.

A mi madre, por todo, porque sin ti, nada sería, por tu esfuerzo infinito y dedicación, por ser la persona que más ha creído en mí, por cuidarme, educarme y darme cariño. Por enseñarme tus valores, por combinar inteligencia, paciencia y humildad. Por ser una grandísima persona y la mejor madre del mundo. Por todo y porque estoy infinitamente orgulloso de ti, te mereces este reconocimiento más que nadie.

A Carolina y su familia, Mercedes, Juan Carlos y Paloma, por el cariño que me habéis demostrado desde el primer momento. Agradezco al destino, Carolina, que nuestros caminos se juntasen y que seas la compañera de mi vida y que juntos formemos un equipo. Gracias por entenderme y aconsejarme, por tu paciencia y por tu amor.

Y a los que por desgracia ya no están físicamente, pero sí en mi corazón, a mi abuelo Antonio y a mi abuela Pepa, por cada momento que disfruté a su lado, por su infinito cariño y amor que me demostraron, y ahora por la protección y cuidado que me ofrecen desde “arriba”. Seguro que algún día nos volveremos a reencontrar. Espero que allá donde estéis, podáis estar orgullosos de vuestro nieto, tanto como yo estoy de vosotros.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	15
ÍNDICE DE FIGURAS.....	17
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	21
SUMMARY.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1. Generalidades de la infección por SARS-CoV-2.....	27
1.2. Impacto de la COVID-19.....	28
1.3. Definición de la COVID persistente.....	29
1.4. Patogénesis de la COVID persistente.....	30
1.4.1. <u>Alteraciones en la regulación del sistema inmune</u>	31
1.4.2. <u>Estado inflamatorio persistente</u>	32
1.4.3. <u>Persistencia viral y reservorios</u>	33
1.4.4. <u>Papel de los autoanticuerpos reactivos</u>	34
1.4.5. <u>Alteración del sistema de coagulación</u>	35
1.4.6. <u>Influencia de otros factores</u>	36
1.5. Epidemiología de la COVID persistente.....	36
1.6. Principales manifestaciones clínicas de la COVID persistente.....	37
1.6.1. <u>Síntomas pulmonares</u>	38
1.6.2. <u>Síntomas generales</u>	39
1.6.3. <u>Síntomas musculoesqueléticos</u>	40
1.6.4. <u>Síntomas dermatológicos</u>	41
1.6.5. <u>Síntomas cardiovasculares</u>	41
1.6.6. <u>Síntomas digestivos</u>	42
1.6.7. <u>Síntomas otorrinolaringológicos y oftalmológicos</u>	42
1.6.8. <u>Síntomas neuropsiquiátricos</u>	43
1.6.9. <u>Síntomas endocrinológicos</u>	44
1.6.10. <u>Síntomas renales</u>	44
1.7. Factores de riesgo de la COVID persistente.....	44
1.8. Pronóstico y manejo de la COVID persistente.....	46

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	47
3. HIPÓTESIS.....	51
4. OBJETIVOS.....	55
<u>4.1. Objetivo general</u>	57
<u>4.2. Objetivos específicos</u>	57
5. METODOLOGÍA.....	59
<u>5.1. Diseño del estudio</u>	61
<u>5.2. Población del estudio</u>	61
<u>5.3. Registro de los datos</u>	62
<u>5.4. Variables predictoras</u>	63
<u>5.5. Análisis estadístico</u>	66
6. RESULTADOS.....	67
<u>6.1. Características basales de los pacientes</u>	69
<u>6.2. Resultados clínicos y biológicos</u>	70
<u>6.3. Resultados virológicos</u>	71
<u>6.4. Resultados serológicos</u>	71
<u>6.5. Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a 2 meses</u>	72
<u>6.6. Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a 6 meses</u>	74
<u>6.7. Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a 12 meses</u>	74
7. DISCUSIÓN.....	77
8. CONCLUSIONES.....	85
9. BIBLIOGRAFÍA.....	89
10. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	115
11. ANEXO II: TABLAS Y FIGURAS.....	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores de los 146 pacientes en seguimiento y principales eventos clínicos ocurridos durante los primeros seis meses de seguimiento.

Tabla 2. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores de acuerdo a la persistencia mantenida de síntomas durante los doce meses de seguimiento tras COVID-19.

Tabla 3. Causas de mortalidad intrahospitalaria y ambulatoria, reingresos hospitalarios y asistencias a Urgencias en los 166 pacientes con COVID-19 ingresados en el Hospital General Universitario de Elche entre el 1 de marzo y el 30 de junio de 2020.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con persistencia de síntomas de mayor intensidad al año del alta.

Tabla 5. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores según persistencia de síntomas a los dos y seis meses del ingreso hospitalario por COVID-19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de pacientes con COVID-19 ingresados en el Hospital General Universitario de Elche entre el 1 de marzo y el 30 de junio de 2020. Programa de visitas y procedimientos.

Figura 2a. Evolución temporal de los síntomas durante los primeros 6 meses de seguimiento. Se observan las puntuaciones de los síntomas generales, respiratorios y gastrointestinales recogidos en los cuestionarios de síntomas de COVID-19 al inicio, a los dos meses y a seis meses.

Figura 2b. Intensidad de los síntomas generales, respiratorios, gastrointestinales y neuropsiquiátricos a los 12 meses entre los pacientes en los que se analizó la persistencia de síntomas mantenida durante todo el año de seguimiento.

Figura 3a. Evolución temporal de los biomarcadores séricos durante los primeros 6 meses de seguimiento. Se muestran los cambios en los niveles séricos de proteína C reactiva (B), interleucina-6 (C), ferritina (D) y dímero D (E) desde el diagnóstico de COVID-19.

Figura 3b. Diferencias entre el grupo con síntomas de mayor severidad y el resto en la evolución temporal de los biomarcadores y anticuerpos antiSARS-CoV-2 IgG-S y N durante los primeros 6 meses de seguimiento.

Figura 4. Dinámica temporal virológica del SARS-CoV-2 en los pacientes con COVID-19 durante el seguimiento.

Figura 5. Dinámica temporal serológica en los pacientes con COVID-19 durante el seguimiento. Evolución de los niveles de IgG-S e IgG-N.

Figura 6. Curva ROC de los valores del pico de IgG-S anti-SARS-CoV-2 en el primer mes para la predicción de persistencia de síntomas a los dos meses.

Figura 7a y 7b. Predictores de persistencia de síntomas a los 2 y 6 meses de seguimiento mediante modelo logístico de regresión multivariante.

Figura 8a-d. Análisis de sensibilidad para predictores, en modelo logístico de regresión multivariante, utilizando la mediana de los síntomas o cualquier valor en algún síntoma, a los dos (paneles A y B, respectivamente) y seis (paneles C y D) meses de seguimiento.

Figura 9a y 9b. A. Diferencias entre el grupo de pacientes con persistente de síntomas de mayor intensidad a largo plazo y el resto, en la evolución temporal de IgG-S al ingreso, mes 1, mes 2, mes 6 y mes 12. B. Diferencias entre grupos en capacidad neutralizante a los 12 meses.

Figura 9c-f. Evolución temporal de los biomarcadores séricos durante todo el periodo de seguimiento. Se muestran los cambios en los niveles séricos de proteína C reactiva, dímero D, cociente neutrófilos/linfocitos y linfocitos desde el diagnóstico de COVID-19, separados por grupos de síntomas de mayor intensidad persistentes frente al resto de pacientes.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACE-2: enzima convertora de angiotensina II
ANA: anticuerpos antinucleares
BUN: cociente nitrógeno urea
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019
COVID: enfermedad por coronavirus
CSC: Cuestionario de síntomas relacionados con COVID-19
CT: ciclo umbral de la PCR o “cycle threshold”
Curva ROC: curva de características operativas del receptor
DNA: ácido desoxirribonucleico
HR: Hazard Ratio
IC: Intervalo de confianza
IFN: Interferón
IgG-S/IgG-N: Inmunoglobulina G frente a la proteína S o N del SARS-CoV-2
IGRA: ensayo de liberación de interferón- γ cuantitativo específico
IL: Interleucina
Índice SAFI : cociente de saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno
%IH: porcentaje de inhibición o índice de inhibición
MIP-1: Macrophage inflammatory protein-1
NICE: National Institute for Health and Care Excellence
NIH: National Institutes of Health
NK: Natural Killers
OMS: Organización Mundial de la Salud
OR: Odds ratio
PAI: inhibidor del activador del plasminógeno-1
PCR: Proteína C Reactiva
PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PET-TC: Tomografía por emisión de positrones y tomografía computarizada
Post-COVID-19: COVID persistente
SARS-CoV: coronavirus tipo 1 responsable del síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV-2: coronavirus tipo 2 responsable del síndrome respiratorio agudo severo
TC: tomografía computarizada
TNF: Factor de necrosis tumoral
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

RESUMEN

Objetivos: Existe escasa información acerca de la influencia de la respuesta inmunitaria y de la replicación viral en la evolución a largo plazo de los pacientes con COVID-19. Nuestro objetivo principal fue caracterizar la evolución clínica, virológica e inmunológica a medio y largo plazo tras la hospitalización por infección grave por SARS-CoV-2 e identificar factores predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad.

Métodos: Se realizó un estudio de seguimiento en consultas, longitudinal y prospectivo de 12 meses de duración que incluyó a todos los pacientes consecutivos dados de alta por infección grave por SARS-CoV-2 entre el 10 de Marzo y el 30 de Junio de 2020 en el Hospital General Universitario de Elche. Definimos infección grave como toda aquella infección confirmada por PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), que precisó ingreso hospitalario. Durante el seguimiento, se obtuvieron muestras seriadas de sangre al mes 1, 2, 6 y 12 para la determinación de anticuerpos IgG-S/IgG-N frente a SARS-CoV-2, incluyendo la medición a los 12 meses de su capacidad neutralizante y la respuesta inmune celular, medida mediante la liberación de interferón gamma específico. Además se obtuvieron muestras de exudado nasofaríngeo para la cuantificación de la carga viral a los 1, 2 y 6 meses tras el alta. Para evaluar la persistencia de síntomas, los pacientes cumplimentaron un cuestionario de síntomas relacionados con COVID-19 (CSC), y se definió persistencia de síntomas de mayor intensidad como aquellos con al menos un síntoma en alguna de las diferentes esferas del cuestionario (síntomas respiratorios, digestivos, neuropsiquiátricos o generales) por encima del tercer cuartil de las puntuaciones.

Resultados: Se incluyeron 146 pacientes en el seguimiento (60% varones, con una mediana de edad de 64 años), de los cuales un 20,6% requirieron reingreso hospitalario en los primeros 6 meses y el 7,5% fallecieron durante el periodo del estudio. A las visitas de los 2, 6 y 12 meses acudieron 127, 138 y 123 pacientes, cumplimentando el CSC 104, 116 y 123 pacientes, respectivamente. Se obtuvieron muestras de exudado nasofaríngeo en 146, 127 y 134 pacientes al mes 1, 2 y 6. En 134 pacientes se obtuvieron muestras de sangre seriadas separadas más de 6 meses, y de ellos, 123 también dispusieron de muestra a los 12 meses. A los 2, 6 y 12 meses, un 26%, un 24 % y un 19.4% de los pacientes persistían con síntomas de mayor intensidad, respectivamente, destacando los síntomas de la esfera respiratoria y generales a los dos y seis meses y los generales y

neuropsiquiátricos al año. La carga viral en exudado nasofaríngeo fue detectable en el 11,8% (mediana del ciclo umbral de la PCR o “cycle threshold” Ct=38) y 3% (mediana de Ct=36) a los 2 y 6 meses, respectivamente. Los títulos de anticuerpos disminuyeron gradualmente, ocurriendo la seroreversión a los 6 meses en 27 pacientes (27,6 %) para IgG-N y en 6 (6 %) para IgG-S, y a los 12 meses, excluyendo a los pacientes vacunados, en 62 pacientes (60.7%) para IgG-N y en 22 (21.6%) para IgG-S. Los predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad a los 2 meses (OR [95 % IC]) en el análisis ajustado fueron tener un pico de anticuerpos IgG-S más bajo (0,80 [0,66-0,94]) y una mayor severidad de la enfermedad según la escala de la OMS (2,57 [1,20-5,86]); Los predictores a los 6 meses fueron tener un pico más bajo de IgG-S (0,89 [0,79-0,99]) y el sexo femenino (2,41 [1,20-4,82]); no se encontró asociación con la persistencia viral prolongada. Los predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad durante todo el periodo de seguimiento (12 meses) (HR [95 % IC]) fueron tener unos títulos de anticuerpos IgG S1/S2 de SARS-CoV-2 (0.14 [0.03-0.65]) y de anticuerpos neutralizantes menores (0.984 [0.97-0.99]) y presentar una tendencia mayor a tener títulos de ANA \geq 1/160 (3.374 [0.84-13.5]). El sexo mantuvo la significación en el modelo ajustado (0.275 [0.11-0.70]).

Conclusiones: Una proporción apreciable de pacientes ingresados por COVID-19 presenta complicaciones tardías y síntomas persistentes a medio y largo plazo. Esta persistencia de síntomas de mayor intensidad se relaciona con el sexo femenino, con una mayor severidad inicial de la COVID-19, con menores títulos de anticuerpos IgG-S en diferentes momentos del seguimiento, con una menor probabilidad de presentar anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 y con una mayor frecuencia de anticuerpos antinucleares al año. No se ha observado asociación entre la persistencia viral y la permanencia de síntomas de mayor intensidad.

SUMMARY

Objectives:

The relationship of host immune response and viral replication with health outcomes in patients with COVID-19 remains to be defined. We aimed to characterize the medium and long-term clinical, virological, and immunological outcomes after hospitalization for COVID-19, and to identify predictors of long-COVID.

Methods:

A 12-month prospective, longitudinal study was conducted in patients discharged for severe COVID-19 between March 10 and June 30, 2020 from Hospital General Universitario de Elche, Spain. We defined severe COVID-19 as any infection confirmed with RT-PCR, which required hospital admission. Serial blood samples were obtained at 1, 2, 6 and 12 months for measuring IgG-S/IgG-N antibodies against SARS-CoV-2, including neutralizing antibodies and interferon- γ release assays at 12 months.

Nasopharyngeal samples were obtained for measuring SARS-CoV-2 RNA during hospital stay, and at 1, 2 and 6 months post-discharge. Patients filled out a COVID-19 symptom questionnaire (CSQ) at 2-month, 6-month and 12-month visits, and those with the highest scores, defined as the top quartile in any symptom, were characterized.

Results:

Of 146 patients (60% male, median age 64 years) followed-up, 20.6% required hospital readmission and 5.5% died. 127, 138 and 123 patients attended the 2, 6 and 12 months visits and 104, 116 and 123 filled out the CSQ, respectively. Nasopharyngeal swab samples were obtained in 146, 127, and 134 patients at months 1, 2, and 6. Serial blood samples over 6 months were obtained in 134 patients, and 123 of them also had a 12-month sample. At 2, 6 and 12 months, 26%, 24% and 19.4% patients, respectively, reported persistent symptoms, predominantly respiratory and general symptoms at two and six months and general and neuropsychiatric at 12 months.

SARS-CoV-2 RT-PCR was positive in NPS in 11.8% (median Ct = 38) and 3% (median Ct = 36) patients at 2 months and 6 months, respectively. Antibody titers gradually waned,

with seroreversion occurring at 6 months in 27 (27.6%) patients for N-IgG and in 6 (6%) for S-IgG and at 12 months, excluding vaccinated patients, in 62 patients (60.7%) for N-IgG and in 22 (21.6%) for S-IgG. Adjusted 2-month predictors of the highest CSQ scores (OR [95%CI]) were lower peak S-IgG (0.80 [0.66–0.94]) and higher WHO severity score (2.57 [1.20–5.86]); 6-month predictors were lower peak S-IgG (0.89 [0.79–0.99]) and female sex (2.41 [1.20–4.82]); no association was found with prolonged viral RNA shedding. Adjusted 12-month predictors of the highest CSQ scores (HR [95%CI]) were lower frequency of detectable neutralizing antibodies (aHR 0.98; [95% CI], 0.97-0.99), lower SARS-CoV-2-S1/S2 titers (aHR [95%CI] 0.14 [0.03–0.65]) and a greater tendency to have higher frequency of positive ANA titers (≥ 160) (3.374 [0.84-13.5]). Sex maintained significance in the adjusted model (0.275 [0.11-0.70]).

Conclusions:

Late clinical events and persistent symptoms in the medium and long term occur in a significant proportion of patients hospitalized for COVID-19.

The persistence of symptoms is associated with decreased levels of anti-SARS-CoV-2 anti-spike antibody response, lower frequency of detectable neutralizing antibodies, severity of illness, and female gender. No association has been observed between viral persistence and long-COVID.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la infección por SARS-CoV-2

El coronavirus tipo 2 responsable del síndrome respiratorio agudo severo (comúnmente conocido por su abreviatura SARS-CoV-2) es el causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). [1,2]. Inicialmente esta enfermedad se consideró una enfermedad respiratoria viral, dado que el pulmón era el órgano primario de afectación [3] y por la relevancia de sus manifestaciones clínicas respiratorias, sin embargo a día de hoy la COVID-19 es considerada una enfermedad sistémica con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, [4,5] tales como fiebre, tos, disnea, astenia, mialgias, cefalea, pérdida de olfato o gusto, dolor de garganta, congestión nasal, náuseas, vómitos y diarrea. [6,1].

Esto es debido a que el virus penetra en la célula mediante su unión con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2), el cual se encuentra presente, no solo en la mucosa del tracto respiratorio superior e inferior, sino también en múltiples órganos humanos, tales como corazón, estómago, intestinos, hígado, bazo, sistema nervioso central y células endoteliales de arterias y venas. [7,8]. Es la variada diversidad de órganos potencialmente afectados lo que justifica el amplio espectro clínico de la COVID-19. [4]

A su vez, la COVID-19 también presenta un amplio rango de gravedad entre sus formas clínicas, pudiendo ocurrir desde infecciones asintomáticas o leves, en la mayoría de los casos (80%), hasta formas graves de neumonía (15%) potencialmente fatales (5%) [9, 10], en las que los pacientes pueden presentar hipoxia secundaria a infiltrados pulmonares bilaterales múltiples, tromboembolismos, shock y fracaso multiorgánico. [11]

La utilidad de los tratamientos disponibles en la actualidad para el manejo de la COVID-19 viene determinada por el tiempo de evolución y severidad de la enfermedad, junto con los factores de riesgo del paciente, disponiendo en el momento actual de fármacos antivirales (como remdesivir, molnupiravir, nirmatrelvir/ritonavir), anticuerpos

neutralizantes (bamlanivimab/etesevimab; casirivimab/imdevimab y sotrovimab) y fármacos antiinflamatorios (corticoides como dexametasona) e inmunomoduladores (tocilizumab, baricitinib). [12]

1.2 Impacto de la COVID-19

La pandemia COVID-19 ha supuesto un impacto sanitario, económico y social sin precedentes recientes, no comparable a otras pandemias como las de la gripe [13,14], causando una elevada morbilidad en todo el mundo desde que en Diciembre de 2019 fueran identificados los primeros casos en Wuham, China. [2]. A inicios de 2022, más de 300 millones de casos confirmados y 5.5 millones de muertes han sido notificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [15]. La atención de los pacientes con enfermedad moderada-severa y la prevención de la transmisión de la infección han supuesto dos auténticos retos para la sanidad mundial, que se han tenido que afrontar de forma prioritaria durante estos primeros años. [16]

Sin embargo, existe evidencia creciente de que un importante porcentaje de pacientes que han superado la fase aguda de la COVID-19 persisten con síntomas pasados semanas y meses, lo que se conoce como COVID persistente. [17,18]. Dicha entidad fue reconocida y codificada por la OMS como “Post-COVID-19 condition” en la Clasificación Internacional de Enfermedades en Septiembre de 2020 [19] y redefinida posteriormente como “long-COVID” por el NIH (National Institute of Health) como aquellas secuelas que persisten más allá de cuatro semanas tras la infección inicial en un paciente con COVID-19 [20,21] y por el NICE (National Institute for Health and Care Excellence) como aquellos signos o síntomas desarrollados durante o tras una infección por SARS-CoV-2, que se mantienen más allá de las 12 semanas del inicio de infección y que no pueden ser explicados por un diagnóstico alternativo [22]. Como podemos observar, aún a día de hoy no existe consenso en cuanto a la nomenclatura y definición de dicho síndrome.

El impacto que puede suponer para el Sistema Sanitario la asistencia de los pacientes con COVID persistente es aún desconocido [23] y puede suponer un auténtico reto a la hora

de compatibilizar su atención con el resto de servicios especializados habituales [24, 25]. Las autoridades sanitarias deberían desarrollar sistemas de gestión ágil con grupos multidisciplinares que se encarguen de la atención de los mismos. [26] Ejemplo de ello, ha sido la inversión del NIH de Estado Unidos de 1,15 billones de dólares y la del Gobierno de Reino Unido de 18,5 millones de libras en la investigación de la COVID persistente y en la creación de clínicas multidisciplinares especializadas en dicha entidad. [27]

Otro problema a la vista será la atención de los posibles reingresos de estos pacientes estimándose cifras de reingreso en torno a 3,5-5% en los primeros 30 días tras el alta [28] y de más del 25% a los 6 meses [29].

1.3 Definición de la COVID persistente

El cuadro caracterizado por la persistencia de síntomas pasadas las 4 semanas de la fase aguda de la COVID-19 ha recibido multitud de términos y definiciones, tales como long-COVID, COVID persistente, COVID prolongado, COVID crónico, síndrome postCOVID, postCOVID crónico, long-haul COVID, late sequelae of COVID, prolonged COVID-19, post-acute COVID-19, long-term COVID effects. [30]

La estandarización de la nomenclatura de dicho cuadro y el desarrollo de una definición operativa se ha convertido en una prioridad, para garantizar registros de calidad y una asistencia sociosanitaria de las personas que lo presentan. [31]

Recientemente la OMS ha publicado una definición de caso de “Post-COVID-19 condition” [32] como “aquella que ocurre en individuos con una historia de infección por SARS-CoV-2 confirmada o probable, que presentan síntomas más allá de 3 meses desde el inicio de la infección, con una duración de al menos 2 meses de los mismos, que no pueden ser explicados por diagnósticos alternativos.

Los síntomas más comunes incluyen fatiga, dificultad respiratoria y deterioro cognitivo (junto con otros síntomas variados) que generalmente suponen un gran impacto a nivel funcional para los pacientes. Los síntomas pueden ser de nueva aparición tras la

recuperación de la fase aguda o persistir desde el inicio de la enfermedad. Además pueden fluctuar en calidad y cantidad de forma intermitente o recurrir en el tiempo, tras un periodo de mejora”.

Esta definición podría resultar poco operativa, existiendo otras como por ejemplo la que propone las guías NICE del National Institute for Health and Clinical Excellence, Scottish Intercollegiate Guidelines Network and Royal College of General, donde se diferencia “ongoing symptomatic COVID-19”, como la persistencia de síntomas o signos entre la semana 4 y 12, del “síndrome post-COVID-19”, donde la persistencia de síntomas continúa más allá de la semana 12.

Los síntomas típicos que aparecen en la COVID persistente son fatiga o astenia, dificultad respiratoria con tos residual, deterioro cognitivo o “brain fog”, cefalea, mareo, palpitations, depresión y ansiedad, artralgias, mialgias y pérdida persistente de olfato y gusto. [33]

Las secuelas debidas al daño irreversible tisular, implican diferente grado de disfunción de los órganos afectados y suelen presentarse en distintos escenarios como hospitalizaciones prolongadas en UCI, complicaciones trombo-hemorrágicas, secuelas de la fase hiperinflamatoria aguda y del síndrome inflamatorio multisistémico [34].

Recientemente The Multi-disciplinary COVID-19 Clinic of The United States University of Cincinnati Medical Center ha propuesto una clasificación de 5 subtipos de secuelas de COVID-19, atendiendo al inicio y duración de síntomas y a su tiempo de aparición [35].

1.4. Patogénesis de la COVID persistente

Dado que la COVID persistente se trata de una entidad de reciente aparición, son pocos los datos publicados sobre su patogenia, siendo aún desconocida de forma precisa. Múltiples hipótesis se han propuesto y probablemente existan diferentes mecanismos implicados, siendo su patogénesis multifactorial.

La persistencia del virus en reservorios tisulares, una respuesta inmunológica aberrante desencadenada por la interacción huésped-virus y el daño tisular desencadenado por la fase inflamatoria de la enfermedad junto con la hiperactivación de la coagulación y plaquetas, [18, 36] se han implicado con un posible desarrollo de la COVID persistente.

1.4.1 Alteraciones en la regulación del sistema inmune

Las alteraciones del sistema inmune secundarias a la infección por SARS-CoV-2 podrían contribuir a la persistencia de síntomas o COVID persistente. Esto se explicaría debido a que la disregulación del sistema inmune que ocurre, tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa debido a la infección [37, 38], se ha relacionado con una eliminación poco efectiva del virus y con la persistencia de un estado proinflamatorio prolongado. [39]

En pacientes con COVID persistente se han descrito cambios en las subpoblaciones linfocitarias T, tanto CD4 como CD8, déficits en linfocitos B e incrementos en los niveles de interferón gamma e interleucina 2 [40].

El descenso de linfocitos T CD4 junto con el incremento de linfocitos T CD8, células NK e INF gamma se han relacionado con un perfil proinflamatorio en estos pacientes [41]. Datos de autopsias revelan importantes depósitos de linfocitos T CD8 tanto a nivel pulmonar como en otros órganos [42].

La linfopenia existente en casos de COVID-19 se ha relacionado con la severidad de la enfermedad aguda [43-45] y con la presencia de un estado hiperinflamatorio residual [46] debido al importante papel que desempeñan los linfocitos en la resolución del proceso inflamatorio una vez finalizada la infección [47, 48]. Tanto las alteraciones en los niveles de linfocitos T, como la disfunción de los mismos, se han propuesto como posible mecanismo promotor del desarrollo de la COVID persistente [49] al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes.

Diferentes perfiles de citoquinas se han observado según la evolución de los pacientes tras la fase aguda de la enfermedad. Mientras que en los pacientes en los que persisten

secuelas post-COVID predominan las citocinas IL6 e IL10 [50], en los que se recuperan sin ellas, lo hace un perfil de citocinas diferente con IL17A, IL12p70, IL1 beta, MIP 1beta y factor de crecimiento endotelial vascular [51].

Existen en la literatura numerosos casos de enfermedades autoinflamatorias desencadenadas por la infección por SARS-CoV-2. Ejemplo de ello, podrían ser los casos de síndrome de Guillain-Barré publicados, tanto durante la fase aguda de la COVID-19, como posteriores a la infección, en los que una cascada inflamatoria desencadena el desarrollo de polineuropatía [52,53]. Otros ejemplos como la enfermedad de Kawasaki, donde se ven afectados vasos de pequeño y mediano calibre han sido notificados en niños y jóvenes con COVID-19 [54].

En estos pacientes con respuestas autoinflamatorias se han descrito un perfil de citocinas determinado por aumento de IFN gamma y de la secreción de IL2 y IL7 junto con la activación de granulocitos y la producción de factor de necrosis tumoral alfa [37, 55] que en última instancia condicionan inflamación intravascular y angiogénesis con coagulopatía.

1.4.2 Estado inflamatorio persistente

La respuesta inflamatoria es un mecanismo fisiológico encargado de la defensa ante una agresión tisular. Esta debe ocurrir con una intensidad y duración adecuadas que permitan la reparación completa del tejido. [56] Sin embargo, es bien conocido que cuando la respuesta inflamatoria se convierte en aberrante y prolongada, podría conducirnos a daño tisular de distintos órganos. [39] Es por ello que un estado inflamatorio persistente se ha relacionado con la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes crónicas, como la enfermedad inflamatoria intestinal o el lupus, entre otras [57].

En la enfermedad COVID-19, una vez finalizada la fase inicial, ocurre también una respuesta inflamatoria aberrante, conocida como “tormenta de citoquinas”, que se ha relacionado con la inmunopatogénesis de enfermedad severa. [58]. Esta fase hiperinflamatoria, inducida por el virus o restos del mismo, determina un estado de activación macrofágica mediado por la IL1 e IL6 y un elevado nivel de estrés oxidativo, que conduce a una situación de extrema gravedad que puede comprometer la vida de los

pacientes. [59,60]. El distress respiratorio agudo inducido por el SARS-CoV-2 se ha asociado con inflamación persistente y procoagulación [35], lo que puede contribuir a una recuperación clínica incompleta.

Existen biomarcadores que permiten monitorizar el curso clínico de esta respuesta hiperinflamatoria, como la ferritina y la proteína C reactiva, que sirven de guía en la elección de tratamientos en esta fase de la enfermedad. [61]

Pasadas 2-6 semanas del inicio de la infección, se ha descrito otra fase hiperinflamatoria, conocida como síndrome inflamatorio multisistémico, [62,63] donde también predominan los biomarcadores inflamatorios, tales como ferritina, proteína C reactiva, dímero D e IL6. Estudios con PET-TC en pacientes con COVID persistente más allá de las 4 semanas, han demostrado persistencia de inflamación tanto en vasos sanguíneos como en médula ósea [64].

Se han detectado marcadores elevados de inflamación y autoinmunidad en síndromes postinfecciosos relacionados con los virus Chikungunya o Epstein-Barr, o en la encefalomiелitis miálgica [65-67].

Por todo ello, el estado de hiperinflamación residual podría estar implicado en el desarrollo de la COVID persistente.

1.4.3 Persistencia viral y reservorios

Es bien conocido que la COVID-19 es una enfermedad sistémica y que el virus SARS-CoV-2 puede afectar a múltiples órganos como corazón, pulmón, mucosa oronasal, estómago, intestinos, hígado, bazo, cerebro y células endoteliales de arterias y venas. [7]. La hipótesis de que los pacientes con COVID persistente puedan no ser capaces de eliminar eficazmente el virus y que este permanezca de forma latente en reservorios tisulares, pudiendo reactivarse periódicamente, cobra cada día mayor fuerza. [68,41] Esta situación podría derivar en el desarrollo de una infección crónica con síntomas persistentes o recurrentes. Es conocido que, al igual que el SARS-CoV-2, existen virus que no se insertan en el DNA celular y que pueden llegar a cronificar como por ejemplo el virus de la hepatitis C, el virus de la polio y el del Ébola [69].

Niveles de linfocitos B y T reducidos se han correlacionado con persistencia de diseminación o “shedding” viral [70].

Se han notificado casos de pacientes con COVID-19 que pueden permanecer detectables en tracto respiratorio hasta 3-4 meses desde el inicio de la infección. [71-74] y en muestras de heces más allá de las 8 semanas [75,76].

Recientemente se han encontrado en pacientes asintomáticos, restos de ácidos nucleicos y proteínas de SARS-CoV-2 en células de intestino delgado a los 4 meses del inicio de la infección [41]. El tracto digestivo, donde existe sobreexpresión de receptores ACE 2, podría ser el escenario ideal donde se perpetúe una replicación viral mantenida, actuando como reservorio de la infección.

Esta persistencia del virus podría inducir cierto nivel de activación inmune y un estado proinflamatorio mantenido que podría contribuir al desarrollo de la COVID persistente.

1.4.4 Papel de los autoanticuerpos reactivos

Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B también podrían tener un papel importante en la patogenia de este síndrome, mediante la formación de autoanticuerpos reactivos que interfieran en el correcto funcionamiento del sistema inmune, al interactuar con distintos mediadores inflamatorios [77]. En pacientes con COVID moderada/severa se han observado la presencia en suero de autoanticuerpos contra IFN, tejido conectivo y antinucleares [78,30], mientras que en pacientes con enfermedad severa se han detectado elevadas concentraciones de anticuerpos antifosfolípidos, hasta un 52%, los cuales se relacionaron con mayor actividad neutrofílica y severidad de la enfermedad [79].

En un estudio publicado por Peker et al, 2021,[80] donde se medía mediante inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos autorreactivos en suero de pacientes con COVID-19, se detectaron anticuerpos antinucleares positivos en hasta 18% de los mismos, destacando el patrón de inmunofluorescencia antinucleolar (12%), al igual que en otros trabajos de la literatura [81, 82, 77]. Este patrón es frecuente en pacientes con esclerosis sistémica y su afectación pulmonar intersticial y restrictiva recuerda a la que presentan los pacientes con COVID-19.

La presencia de dichos autoanticuerpos podría dificultar el correcto control virológico pudiendo favorecer el aumento de gravedad y duración de los síntomas de la COVID-19, promoviendo así la aparición de la COVID persistente, al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes [83].

1.4.5 Alteración del sistema de coagulación

En la enfermedad COVID-19 con disfunción multiorgánica, pueden ocurrir múltiples fenómenos relacionados con disregulación del sistema de la coagulación, tales como hemorragias con trombocitopenia, estados de hipercoagulabilidad, microangiopatía y trombosis, tanto venosas como arteriales. [84-86] . Reflejo de esta situación, biomarcadores como el dímero D o el tiempo de protrombina muestran sus niveles incrementados, mientras que otros como el fibrinógeno pueden acabar reduciéndose en etapas avanzadas. [87]. La trombocitopenia inducida por SARS-CoV-2 se ha relacionado en casos de extrema gravedad con un estado de coagulación intravascular diseminada. [88]

El estado de hiperinflamación secundario a la infección por SARS-CoV-2 induce la pérdida de la homeostasis vascular y la alteración de la coagulación, mediante la producción de citocinas procoagulantes [89] que conducen a la coagulación intravascular diseminada y la formación de tromboembolismos de predominio pulmonar, cardiovascular y cerebrovascular. [90,91]. Los elevados niveles de alfa2 antiplasmina, descritos en pacientes con COVID-19, se han relacionado con una circulación mantenida de microtrombos resistentes a la fibrinólisis y con la perpetuación de un estado de hipercoagulabilidad y proinflamatorio mediante la inducción de citocinas como la IL1, IL6 y TNF alfa. [35]. Tanto la IL1 como la IL6 junto con el exceso de angiotensina II permiten un incremento de la permeabilidad endotelial que condiciona un estado protrombótico [92] que añadido a la producción de plasminogeno factor 1 (PAI), factor tisular y factor de von Willebrand conducen a la endotelitis mediada por SARS-CoV-2 [93,94].

El estado de hipercoagulabilidad, junto con la presencia de microtrombos circulantes resistentes a la fibrinólisis, con plaquetas hiperactivadas y la alteración del sistema fibrinolítico por los altos niveles de alfa 2 antitripsina, se han vinculado con la patogenia de la COVID persistente.

1.4.6 Influencia de otros factores

Otros factores se han postulado como posibles mecanismos implicados en el desarrollo de la COVID persistente.

La disfunción tiroidea inducida por SARS-CoV-2, se ha descrito hasta en un 15-20% de pacientes [95, 96]. Dicha disfunción se ha relacionado con mecanismos autoinmunitarios mediante la pérdida del sistema de tolerancia periférico y la formación de linfocitos T autorreactivos que escapan de la selección negativa del timo, que finalmente dañarían tejidos propios de forma similar a como ocurre en otras enfermedades autoinmunes. [95]

La disbiosis intestinal, previamente relacionada con otros procesos inflamatorios crónicos [97], también se ha descrito en pacientes con la COVID-19 [98, 99] y se ha relacionado con la severidad de la enfermedad y con la persistencia de shedding viral en muestras de heces más allá de 6 semanas. Su implicación en el eje cerebro-intestinal podría explicar la persistencia de síntomas neurocognitivos e intestinales en pacientes con COVID persistente. [97,100].

También existen otras hipótesis como el papel de los exosomas [101], la proteína spike [102], la dieta y ciertos déficits nutricionales y los mastocitos [103], en la persistencia de los síntomas relacionados con la COVID.

1.5. Epidemiología de la COVID persistente

La incidencia global de la COVID persistente es difícil de determinar actualmente. Existen diferentes factores que influyen, como son la variabilidad en la incidencia reportada de la COVID-19 según países, la falta de consenso en cuanto a una definición

clara y operativa de esta nueva entidad y la ausencia de un sistema de vigilancia con registros clínicos rigurosos de COVID persistente.

Atendiendo a los datos reportados por pacientes con COVID-19 a la Oficina Nacional de Estadística del Reino Unido en población general (entre 25 y 69 años), se estima que 1 de cada 5 personas que han pasado la COVID-19 continuarán con síntomas más allá de las 5 semanas y 1 de cada 10, más allá de 12 semanas. Según estas estimaciones, un 2% de la población británica (1,3 millones de personas) ha desarrollado COVID persistente y se mantienen sintomáticos en sus domicilios.

El rango de edad más afectado es de 35 a 69 años, destacando los grupos de pacientes de áreas desfavorecidas, los trabajadores sanitarios, sociales y del área educativa y aquellos con una condición de salud o discapacidad que limita su actividad diaria. Además se observó mayor incidencia de COVID persistente en el sexo femenino (23,6% vs 20,7%).
[104]

Revisando los resultados de estudios publicados, existe gran variabilidad en datos de incidencia y prevalencia, en función del perfil del paciente que incluyen, según la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 y de si precisaron ingreso hospitalario, pudiendo oscilar desde el 10% [105] hasta más del 70-80% [106-108].

1.6 Principales manifestaciones clínicas de la COVID persistente

Existe gran heterogeneidad tanto en la variedad de síntomas que pueden aparecer en pacientes con COVID persistente como en su prevalencia. La OMS, en su documento de consenso, consideró que los síntomas más comunes de este síndrome son la fatiga, la dificultad respiratoria y el deterioro cognitivo, que a su vez suponen un gran impacto en el funcionamiento diario de los pacientes y pueden ser recurrentes o fluctuantes. [32]

La pérdida de memoria, desorientación, dificultad para aprendizaje y concentración son especialmente frecuentes e importantes en pacientes con COVID persistente y suponen una gran limitación en su capacidad funcional diaria. Estos síntomas se han registrado en la mayoría de pacientes, combinados con un gran componente psicológico y emocional,

destacando la ansiedad, labilidad emocional, tristeza y el sentimiento de soledad, que dificultan el proceso de adaptación y aceptación de esta nueva situación.

La persistencia de síntomas puede ocurrir en cualquier persona, independientemente de la edad y sexo, sin embargo, es más prevalente en mujeres entre 35-49 años. La duración del síndrome también es variada pero en la mayoría de los casos suelen persistir entre 3 y 6 meses del inicio de la infección. [104]. A los 6 meses tras alta, Huang et al evaluaron 1733 pacientes tras hospitalización y observaron que la fatiga (63%) era el síntoma más frecuente, seguido de insomnio (26%), depresión/ansiedad (23%) y alopecia (22%). [109]

Otros estudios han encontrado síntomas similares en el seguimiento a corto plazo. Un estudio con 488 pacientes hospitalizados mostró persistencia de disnea, tos y pérdida de olfato y gusto en un 32% a los 60 días del alta [110], otro estudio con 110 pacientes y 90 días de seguimiento mostró que la fatiga y disnea fueron los síntomas más frecuentes (39%) seguidos de insomnio (24%), dolor torácico (12%) y tos (11%). [107]

1.6.1. Síntomas pulmonares

El pulmón es el órgano primario de afectación de la COVID-19 [111], por ello la mayoría de pacientes que desarrollan la COVID persistente experimentan síntomas respiratorios tales como disnea, tos y dolor torácico [112, 109], junto con limitaciones para el ejercicio físico, medidos por una reducción significativa de la distancia recorrida en el test de la marcha de 6 minutos en comparación con el estándar habitual. [109]

Diferentes estudios han demostrado que la disnea es el síntoma pulmonar predominante pudiendo afectar en torno a un 43%-50% de los pacientes a los 60-100 días del inicio de la infección. [112]. Registros del Reino Unido muestran que en torno a un 36% de pacientes con COVID persistente refieren esta sensación de disnea o dificultad respiratoria. [104]

La disnea no es exclusiva de los pacientes con secuelas pulmonares, dado que esta puede aparecer en pacientes sin signos de daño pulmonar permanente [107] y en pacientes que desarrollaron infección aguda leve por SARS-CoV-2 [113].

La reducción de la capacidad de difusión, los cambios fibróticos pulmonares y la dependencia de la oxigenoterapia domiciliaria son las principales secuelas a nivel pulmonar [114]. Alteraciones radiológicas pulmonares y deterioro de la función respiratoria se ha observado en 71% y 25% de pacientes supervivientes de la COVID-19 a los 3 meses [115] y en torno a 50% a los 6 meses [109].

Los mecanismos que pueden estar relacionados con estos síntomas son el daño directo producido por la presencia de microtrombos a nivel pulmonar [116], la replicación viral en las células endoteliales que condiciona una reacción inflamatorio intensa [117] y los elevados niveles de IL6 que pueden conducir al desarrollo de fibrosis a nivel pulmonar [118].

La fibrosis de los tejidos es secundaria al proceso de vasoconstricción determinado por la elevación de los niveles de angiotensina II, debido a la reducción del número de receptores ACE-2 por su unión al virus en las células endoteliales vasculares [91].

Los cambios fibróticos residuales pulmonares, previamente descritos en autopsias, se pudieron observar también mediante TC realizados en pacientes recuperado a los meses del inicio de la infección. Un estudio en China reveló la presencia de lesiones fibróticas pulmonares en hasta un 50% de 349 pacientes evaluados [109]. En otras cohortes de pacientes leves-moderados también se han encontrado restos fibróticos a los 3 meses en hasta un 25% de los casos. [115]

El papel de los fármacos antifibróticos e incluso del trasplante pulmonar, en pacientes con extensas lesiones fibróticas residuales por COVID-19 es poco conocido, existiendo un número limitado de pacientes en el mundo que lo han recibido [119].

1.6.2 Síntomas generales

La astenia, fatiga y dificultad para el ejercicio son los síntomas generales más frecuentes, pudiendo ocurrir entre el 50-80% de los casos.

Estos síntomas junto con la disautonomía y las alteraciones neuropsiquiátricas recuerdan a los síntomas de otras entidades como el síndrome de fatiga crónica o la encefalomiелitis miálgica [120,121].

Los mecanismos que pueden estar relacionados con estos síntomas generales son la disregulación de la respuesta inflamatoria, una combinación de factores que afectan al sistema nervioso central y periférico [122] y factores psicológicos. [123,124]

La fatiga o astenia que experimentan los pacientes con COVID persistente se manifiesta como un cansancio continuo que afecta a su motivación y energía. Síntomas similares ocurrieron durante años en pacientes que superaron la infección por el coronavirus tipo 1 o SARS-CoV. [125,126]. Los registros del Reino Unido muestran que más de la mitad de pacientes con la COVID persistente experimentan esta sensación de fatiga continua (51%). [104]

No obstante, atribuir a la COVID persistente dichos síntomas solo debe realizarse cuando se hayan descartado otras potenciales causas, como podrían ser síndrome constitucionales o linfoproliferativos, sobre todo en los pacientes en los que se acompañen otros síntomas como anorexia, pérdida de peso, sudoración o fiebre.

1.6.3 Síntomas musculoesqueléticos

Las manifestaciones musculoesqueléticas pueden aparecer tanto en la fase aguda de COVID-19 como en la COVID persistente.

En cohortes de pacientes infectados por SARS-CoV-2 que además presentaban otras enfermedades reumáticas, se han observado que precediendo a los síntomas respiratorios, estos pacientes exhibían debilidad, dolores musculares y articulares [127,128].

En la COVID persistente, los síntomas más frecuentes son las artralgiás (en torno a 10-50%) y las mialgias (20-30%), seguidos de calambres, contracturas musculares, atrofia y debilidad muscular [129]. Estos síntomas implican un deterioro funcional que afecta a su capacidad laboral y calidad de vida.

Otra de las posible complicaciones relacionadas con el tratamiento con corticoides en la COVID-19 es la necrosis avascular ósea [130,131].

Al igual que anteriormente, dado que la infección por SARS-CoV-2 puede actuar de desencadenante de enfermedades autoinmunes, será preciso realizar una anamnesis y exploración exhaustiva sobre las características del dolor, el número y localización de las articulaciones afectadas, valorando si presentan un patrón de afectación inflamatorio o mecánico.

El papel de la rehabilitación precoz y personalizada podría reducir las secuelas en este perfil de pacientes [132].

1.6.4 Síntomas dermatológicos

La aparición de lesiones cutáneas se han descrito tanto en la fase aguda de la COVID-19 como en la COVID persistente. [133]

En este último, erupciones papuloescamosas o eritema pernio, la alopecia transitoria en forma de efluvio telógeno y las aftas orales se han descrito en al menos un tercio de pacientes. [134]

1.6.5 Síntomas cardiovasculares

Se han propuesto diferentes mecanismos que podrían explicar una posible afectación del miocardio y del pericardio, como la citotoxicidad directa del virus debido a la sobreexpresión del receptor ACE-2 en tejido cardíaco [135], una respuesta inmune local intensa en los cardiomiocitos [136], la disregulación del sistema renina angiotensina aldosterona mediado por el receptor ACE-2 y la inflamación persistente debido a la disregulación del sistema inmune.

El daño cardíaco y la elevación de niveles de troponina que se puede ver en pacientes con la COVID-19, puede perpetuarse en los pacientes con la COVID persistente, como mostró una cohorte de 100 pacientes a los 71 días del inicio de la infección, en los que un 78% y un 60% presentó alteraciones cardíacas e inflamación miocárdica, respectivamente [137]. Un estudio con 143 pacientes mostró la persistencia de dolor torácico,

posiblemente relacionado con miocarditis, en un 21,7% a los dos meses del inicio de la infección [112].

El dolor torácico, la disnea, y las palpitaciones recurrentes son los síntomas cardiológicos más frecuentes en pacientes con la COVID persistente. También se han descrito casos de miocarditis residual en pacientes jóvenes tras COVID-19 de baja severidad [138] y casos de disfunción autonómica, responsables de cuadros como el síndrome de taquicardia ortostática postural [139].

1.6.6 Síntomas digestivos

El virus SARS-CoV-2 puede replicar eficientemente en el estómago e intestinos [140,141] debido a los altos niveles de expresión del receptor ACE-2 en dichos tejidos. Esto permite una liberación de virus en heces incrementada.

Los síntomas gastrointestinales, tales como la pérdida de apetito, náuseas, vómitos o diarreas pueden afectar en torno a 10-20% de pacientes con la COVID-19 [142,143] y en torno a un 30-35% de pacientes con COVID persistente [144]. La diarrea y las molestias abdominales intermitentes son los síntomas digestivos más frecuentes.

La persistencia de estos síntomas, en combinación con datos de alarma como la presencia en heces de sangre o moco, nos deben invitar a completar un estudio digestivo para descartar otras causas.

1.6.7 Síntomas otorrinolaringológicos y oftalmológicos

A nivel oftalmológico, los hallazgos más frecuentes asociados a la COVID-19 son las conjuntivitis, la hiperemia conjuntival y la quemosis. [145] Las alteraciones retinianas que afectan a la microvasculatura incluyen microhemorragias y manchas algodonosas, y pueden persistir tras seis meses de la infección aguda por SARS-CoV-2 [146]. Alteraciones en la visión leves o sensación de visión borrosa se puede ver en uno de cada 5 pacientes con COVID persistente.

El dolor de garganta también se ha descrito hasta en un 20% de estos pacientes. Alteraciones auditivas, tinnitus y vértigos episódicos han sido descritas en pacientes con la COVID persistente. [147]

1.6.8 Síntomas neuropsiquiátricos

Existe evidencia del neurotropismo y de la capacidad de replicación del virus SARS-CoV-2 a nivel cerebral, sobre todo en tronco-encéfalo por la sobreexpresión de receptores ACE-2 [148,149].

La neuropatología de la COVID persistente se podría explicar por la neurotoxicidad directa del virus, junto con la presencia de trombos en la microvasculatura y por la inflamación residual persistente [150].

La disfunción del tronco-encéfalo se ha propuesto como una posible teoría de persistencia de síntomas neurológicos y cardiovasculares en la COVID-19 [151].

La pérdida de gusto y olfato (11-45.1%) [152,153] y la cefalea de predominio frontoparietal se han descrito en pacientes recuperados de COVID-19. Estos síntomas y otros como pérdida de memoria y fatiga se han relacionado con alteraciones metabólicas y estructurales cerebrales en paciente con COVID persistente. También los síntomas de deterioro cognitivo como la pérdida de memoria, desorientación, dificultad para aprendizaje y concentración son especialmente frecuentes e importantes en estos pacientes. El insomnio se ha descrito hasta en un 40% de los mismos. [154]. El delirium puede aparecer en un 20-30% de pacientes hospitalizados por la COVID-19 y se ha relacionado como un predictor de síntomas neuropsiquiátricos especialmente en adultos de edad avanzada [155].

Los trastorno de la esfera psiquiátrica, como ansiedad, depresión, trastornos del ánimo y estrés postraumáticos son frecuentes en pacientes COVID persistente, a los 6 meses en una cohorte de 236.379 pacientes, un tercio presentaron alguno de estos diagnósticos. [156,157]. Biomarcadores inflamatorios como la IL6, IL1B, TNF alfa e INF se han identificado como mediadores implicados en la depresión asociada al COVID persistente. [158]

1.6.9 Síntomas endocrinológicos

Tiroiditis de Hashimoto, subagudas, enfermedad de Graves y crisis de tirotoxicosis [159] se han descrito en pacientes recuperados tras la fase aguda de la COVID-19, [160] debido a la potencial implicación del virus SARS-CoV-2 en el desarrollo de disfunciones tiroideas [161].

La pérdida de densidad mineral ósea y la osteoporosis se han relacionado con el uso de corticoides mantenidos, el déficit de vitamina D y la inmovilización de estos pacientes. [162]

1.6.10 Síntomas renales

No está clara la afectación a largo plazo a nivel renal por la COVID-19. Algunos estudios han reportado hasta un 35 % de pacientes COVID persistente a los 6 meses del alta que presentan descensos en su función renal, pero su relevancia clínica está aún por demostrar. [109]

1.7 Factores de riesgo de la COVID persistente

Mientras que algunos de los factores de riesgo de la fase aguda de la COVID-19 son bien conocidos, como la edad avanzada, el sexo masculino y la presencia de comorbilidad tipo obesidad, hipertensión, enfermedad cardiovascular y respiratoria, la enfermedad oncológica, los trasplantados y enfermos autoinmunes que reciben altas dosis de corticoides y rituximab [163-165], los factores de riesgo de la COVID persistente no están tan bien definidos.

En una revisión de 10 estudios longitudinales [166] donde evaluaban los principales factores de riesgos de desarrollo de la COVID persistente, observaron que tanto la edad, el peor estado mental pre-pandémico (trastornos psiquiátricos previos), una peor situación

de salud general y el asma eran factores de riesgo de desarrollarlo. No lo fueron sin embargo el sexo masculino, obesidad, diabetes y la enfermedad cardiovascular.

La edad mayor de 70 años, el número de síntomas, las comorbilidades y el sexo femenino sí se identificaron en una cohorte de 4000 pacientes [167].

La severidad de infección aguda se esperaba que predijese el desarrollo de COVID persistente, sin embargo a día de hoy, varios estudios no han encontrado relación [168] y existe evidencia de que muchos pacientes con COVID-19 asintomáticos o leves también presentan persistencia de síntomas. [169,170]. No obstante el número de síntomas iniciales (5 o más y 10 o más) sí se ha postulado como un predictor de persistencia de enfermedad [171].

En otros estudios, con pacientes que presentaron mayor severidad de la COVID-19, con estancias en UCI prolongadas y ventilación mecánica, sí se observó mayor riesgo de desarrollar síntomas persistentes en relación con daño tisular en órganos o secuelas [172,173] y mayor grado de afectación funcional, con peor calidad de vida [174].

También se han relacionado ciertos biomarcadores con el desarrollo de la COVID persistente, siendo los más frecuentes, niveles elevados de PCR y dímero D y la linfopenia, aunque en otros estudios no se han encontrados estas diferencias [175].

Niveles elevados del cociente nitrógeno urea (BUN) y del dímero D se han relacionado con mayor riesgo de disfunción pulmonar en pacientes COVID persistente a los 3 meses del alta [115]. Dímero D, IL 6 y PCR también se han relacionado con mayor riesgo de lesiones pulmonares a los dos meses [176,177].

Biomarcadores como la procalcitonina y el recuento de neutrófilos se asociaron a mayor riesgo de lesiones en corazón, riñón e hígado a los 2-3 meses del alta [173] y la linfopenia con mayor probabilidad de síntomas persistentes [106].

Los datos del registro de Reino Unido sin embargo no encuentra diferencias en cuanto a edad, puesto que el rango con mayor riesgo de COVID persistente es entre 35-49 años (26,8%) , seguido de 50-69 años (26.1%). [104] El sexo femenino sí se ha relacionado con mayor riesgo de persistencia de síntomas (23.6%) al igual que en otros estudios en los que se observó mayor riesgo de persistencia de síntomas a las 10 semanas del alta en mujeres y en personas con historia de ansiedad o depresión [123, 168] y a los meses en mujeres [172,178].

En series de casos, la vacunación se ha relacionado como factor protector de la COVID persistente pudiendo mejorar o incluso resolver los síntomas persistentes a largo plazo [107].

1.8 Pronóstico y manejo de la COVID persistente

Hasta la fecha no existe tratamiento específico de la misma, las opciones que disponemos son el tratamiento sintomático, la rehabilitación precoz y el soporte psicológico-psiquiátrico.[17]

En términos de pronóstico de la COVID persistente, más allá de los síntomas residuales y de su posible limitación funcional, se espera que la mayoría de los pacientes se recuperen de forma adecuada y paulatina, presentando un buen pronóstico global, sin aparición de complicaciones futuras potencialmente letales. No obstante, la falta de seguimiento e información publicada a largo plazo, nos impide sacar conclusiones robustas en el momento actual.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Dos años después de la descripción del primer brote de la COVID-19 [2], aún quedan por responder numerosas preguntas sobre esta enfermedad. A diferencia de las fases iniciales [179], los datos que disponemos a largo plazo de la infección por SARS-CoV-2 son limitados.

En una proporción significativa de pacientes, los síntomas persisten más allá del tercer mes desde el inicio de la infección, sin poder ser explicados por otro diagnóstico alternativo. Dicha condición ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud como “Post-COVID-19 condition” o COVID persistente siendo la fatiga, la dificultad respiratoria y el deterioro cognitivo los síntomas más comunes con un importante impacto sobre la capacidad funcional diaria de quienes los padecen [32]. Otros síntomas como cefalea, mareo, palpitaciones, depresión, ansiedad, artromialgias y pérdida persistente de olfato y gusto aparecen con frecuencia en este síndrome. [33]

Los mecanismos patogénicos involucrados, incluido el papel de la diseminación viral, la cinética de anticuerpos y su actividad neutralizante y la respuesta inmune celular, todavía no son bien conocidos.

Se han propuesto diferentes hipótesis que tratarían de explicar la patogénesis de la COVID persistente, entre ellas, la persistencia del virus en reservorios tisulares, una respuesta inmunológica aberrante desencadenada por la interacción huésped-virus y el daño tisular desencadenado por la fase inflamatoria de la enfermedad junto con la hiperactivación de la coagulación y las plaquetas [18, 36].

Aún no se ha definido detalladamente la dinámica del SARS-CoV-2 a largo plazo, incluida la persistencia de la diseminación viral o “viral shedding”, la incidencia de repuntes virales tardíos o reinfecciones, y su relación con la evolución clínica de los pacientes.

Existen casos publicados en los que el virus puede permanecer detectable en tracto respiratorio e intestino delgado durante meses desde el inicio de la infección [72-76], aún estando los pacientes asintomáticos [41]. El tracto digestivo, donde existe una importante sobreexpresión de receptores ACE-2 (el receptor de entrada del virus en la célula), podría

ser el escenario ideal donde se perpetuase una replicación viral mantenida, actuando como reservorio de la infección. Esta persistencia del virus podría inducir cierto nivel de activación inmune y un estado proinflamatorio mantenido que podría contribuir al desarrollo de la COVID persistente.

Es bien conocido que un estado de hiperinflamación residual podría conducir al daño tisular de distintos órganos [39]. Estudios con PET-TC en pacientes con COVID persistente, han confirmado la persistencia de inflamación residual tanto en vasos sanguíneos como en médula ósea más allá de las 4 semanas.[64].

El estado de hipercoagulabilidad, junto con la presencia de microtrombos circulantes resistentes a la fibrinólisis, con plaquetas hiperactivadas y la alteración del sistema fibrinolítico por los altos niveles de alfa 2 antitripsina, se han vinculado con este síndrome [180].

Desde la perspectiva inmunológica, otra pregunta relevante atañe a la durabilidad de la respuesta de anticuerpos y de la inmunidad celular y al impacto de la intensidad y duración de estas respuestas en la evolución de los pacientes.

Algunos estudios han demostrado una respuesta de anticuerpos duradera en pacientes con COVID-19 severa que requieren hospitalización, en contraste con la rápida disminución de anticuerpos reportada en pacientes con COVID-19 leve [181-183]. De hecho, la gravedad de la enfermedad se ha asociado con la magnitud y duración de la respuesta de anticuerpos [184].

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Algunos pacientes con COVID-19 continúan con síntomas a largo plazo. Los pacientes con síntomas persistentes pueden tener características demográficas, clínicas, virológicas e inmunológicas diferenciales. Es posible por ello identificar determinantes del desarrollo de persistencia de síntomas de mayor intensidad.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

El objetivo general ha sido caracterizar la evolución a largo plazo desde el punto de vista clínico, virológico e inmunológico, de los pacientes ingresados por infección grave por SARS-CoV-2 e identificar predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad tras superar la fase aguda de la enfermedad.

4.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar la persistencia y la intensidad de síntomas generales (astenia, mialgias, cefalea, sudoración, anosmia, ageusia, alopecia), neuropsiquiátricos (depresión y ansiedad, pérdida de memoria), respiratorios (tos, disnea, expectoración, dolor de garganta, congestión nasal) y gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal) a los 2, 6 y 12 meses.
- Caracterizar la presentación clínica inicial de la COVID-19 y la dinámica evolutiva de los biomarcadores inflamatorios y protrombóticos plasmáticos durante la fase aguda de la enfermedad y a los 1, 2, 6 y 12 meses y explorar su relación con la persistencia de los síntomas de mayor intensidad.
- Investigar la dinámica del aclaramiento viral durante la fase aguda de la enfermedad y la persistencia de genoma viral en muestras de exudado nasofaríngeo (diseminación viral o shedding viral) tras un mes, 2 y 6 meses y explorar su relación con la persistencia de los síntomas de mayor intensidad.
- Determinar la respuesta inmune adaptativa humoral (respuesta serológica) a los 1, 2, 6 y 12 meses, junto con su capacidad neutralizante a los 12 meses y la respuesta inmune celular (liberación de interferón gamma) a los 12 meses en pacientes con y sin síntomas de mayor intensidad y su posible relación con la persistencia de los mismos.

5. METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

Estudio longitudinal prospectivo con un seguimiento de 12 meses de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 en seguimiento en consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche (Alicante).

5.2 Población del estudio

Todos los pacientes ingresados en el Hospital General Universitario de Elche por COVID-19 entre el 10 de marzo y el 30 de junio de 2020 fueron incluidos en el estudio y fueron seguidos posteriormente en consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas hasta el 30 de junio de 2021, fecha de censura administrativa del conjunto de datos del estudio.

Los casos incluidos en el estudio presentaron una infección grave por SARS-CoV-2, que requirió ingreso hospitalario, confirmada microbiológicamente en la mayoría de los casos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) a partir de muestras de hisopos nasofaríngeos y en una minoría, en muestras fecales.

Los pacientes fallecidos durante el ingreso hospitalario o que se perdieron administrativamente sin recibir ningún seguimiento en consulta no fueron incluidos en el estudio. Se excluyeron también pacientes que rechazaron el seguimiento en consulta por motivo de traslados de ciudad, dificultad para la movilidad o por motivos personales. Además se excluyeron pacientes de los que no se disponía de un conjunto mínimo básico de datos para poder clasificarlos, como por ejemplo la ausencia o cumplimentación incorrecta de los cuestionarios de síntomas.

Antes de comenzar, la investigación fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario de Elche y todos los sujetos incluidos firmaron un consentimiento informado.

5.3 Registro de los datos

Los pacientes hospitalizados con COVID-19 fueron manejados de acuerdo con un protocolo hospitalario local predefinido que incluía los procedimientos diagnósticos y terapéuticos durante la estancia hospitalaria [185]. Este protocolo consistió en la recolección estandarizada de variables clínicas y muestras seriadas de sangre y nasofaríngeas, obtenidas en diferentes momentos de la estancia hospitalaria para mediciones bioquímicas y seroviológicas.

Una vez dados de alta, el seguimiento de los pacientes se centralizaba a nivel ambulatorio en la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Al igual que otros autores [58], nos centramos en tres períodos de la línea temporal post-aguda de la COVID-19, el “ongoing COVID-19” o la COVID-19 sintomática en curso, que incluye síntomas y anomalías presentes de 4 a 12 semanas después de la fase aguda de COVID-19, y el COVID persistente, que incluye síntomas y anomalías que persisten más allá de las 12 semanas desde el inicio de la fase aguda de la COVID-19, diferenciando un primer periodo hasta los 6 meses y un segundo periodo hasta los 12 meses.

Se programaron visitas presenciales durante el período agudo de la COVID-19 (visita telefónica de seguimiento a las 48 horas y presencial a las 4 semanas-primer mes del alta) y posteriormente, visitas presenciales a los 2 meses, en este documento también denominadas “a medio plazo” y a los 6 y 12 meses del alta, también denominadas “a largo plazo”.

En cada visita, se obtuvieron muestras de sangre y nasofaríngeas para mediciones bioquímicas y seroviológicas (Figura 1). También se concertaron visitas telefónicas y presenciales no previstas en el protocolo a petición de los pacientes.

En las visitas a los 2, 6 y 12 meses, se les ofreció a los pacientes que completaran un cuestionario de autoevaluación de síntomas relacionados con la COVID-19 (CSC-1) que inicialmente incluía 11 ítems (astenia; mialgias; cefalea; disnea; síntomas digestivos [náuseas/vómitos/diarrea]; ageusia/anosmia; congestión nasal; odinofagia; tos; sudoración; fiebre) que tenían que calificar utilizando una escala de intensidad creciente de 10 puntos (donde 0 es la ausencia del síntoma y 10 sería la máxima intensidad percibida del síntoma). Posteriormente, en base a los avances en el conocimiento de la sintomatología de la COVID persistente se añadieron 5 nuevos ítems (dificultad para la concentración o pérdida de memoria; insomnio; ansiedad/depresión; palpitaciones; alopecia) al cuestionario para la visita de 12 meses (CSC-2).

Para caracterizar la persistencia de los síntomas, y como prueba de robustez, definimos tres categorías diferentes de la puntuación del CSC: una puntuación de al menos un punto (en cualquier síntoma del CSC); una puntuación igual o superior a la mediana (mediana del CSC), y una puntuación por encima del tercer cuartil (puntuación más alta del CSC) en cualquiera de los ítems. Las puntuaciones también se clasificaron en categorías leves (1 a 4 puntos), moderadas (5 a 7 puntos) y graves (8 a 10 puntos).

En los pacientes que faltaron a las citas programadas, se intentó contactar con ellos vía telefónica y se revisó cuidadosamente su historia médica electrónica para asegurar el estado de salud de los pacientes.

Los fallecimientos, reingresos hospitalarios y las asistencias al Servicio de Urgencias que ocurrieron durante el período de seguimiento de los primeros 6 meses se revisaron y registraron en el conjunto de datos.

El periodo del estudio tuvo lugar entre 2020 y 2022. La variable principal del estudio, la persistencia de síntomas de mayor intensidad, se analizó a los 2, 6 y 12 meses. Otras variables secundarias como el % de pacientes que desarrollaron anticuerpos para SARS-CoV-2 (seroconversión) y el % de pacientes que los perdieron (seroreversión) también fueron analizados al mes, 2, 6 y 12 meses. El % de pacientes con PCR para SARS-CoV-2 positiva en exudado nasofaríngeo se analizó al mes, 2 y 6 meses, mientras que el % de pacientes con anticuerpos con capacidad neutralizante, con respuesta celular mediante liberación de IFN o con autoanticuerpos antinucleares se analizaron únicamente en el mes 12.

5.4 Variables predictoras

Como variables predictoras de persistencia de síntomas de mayor intensidad se analizaron las siguientes:

- Variables demográficas y clínicas a la entrada en el estudio:

El sexo, la edad y la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 según la escala de severidad de la OMS, la necesidad de ingreso en UCI, el índice SAFI (cociente de saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno), la severidad de afectación radiológica y la duración de los síntomas antes del ingreso hospitalario.

- Variables de respuesta virológica al mes 1, 2 y 6 meses (persistencia de PCR SARS-CoV-2 positiva en exudado nasofaríngeo)

El análisis de PCR para SARS-CoV-2 se realizó por medio de un kit disponible comercialmente (Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene, Seúl, Corea) que se dirigió a los genes E, RdRP y N.

- Variables de respuesta inmunológica al mes 1, 2, 6 y 12 meses: respuesta humoral (título de anticuerpos) y respuesta celular (liberación de interferón gamma, solo a los 12 meses) y presencia de autoanticuerpos (mes 12).

La detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 se realizó con tres técnicas de inmunoensayo diferentes para la detección de IgG contra la proteína de la nucleocápside interna (IgG-N) y contra el dominio S1 de la proteína spike, IgG contra el dominio S1/S2 y anticuerpos neutralizantes.

Los niveles plasmáticos de anticuerpos IgG contra la proteína de la nucleocápside interna (IgG-N) del SARS-CoV-2 (Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Alemania) y el dominio S1 de superficie de la proteína spike (IgG-S) (Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Alemania) se midieron al mes 1,2,6 y 12, utilizando kits de EIA semicuantitativos comerciales en un instrumento automatizado (sistema ELISA Dynex DS2®). Los niveles de anticuerpos se evaluaron calculando la relación entre la densidad óptica (DO) de la muestra del paciente y la DO del calibrador ($DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del calibrador} = S/CO$ [absorbancia/límite]). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: el ratio $<1,1$ se definió como negativo y el ratio $\geq 1,1$ como positivo. A los 12 meses se midieron los niveles plasmáticos de anticuerpos IgG contra el dominio S1/S2 utilizando kits de inmunoensayo comerciales (ensayo LIISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG, DiaSorin, Saluggia, Italia) en una plataforma automatizada (LIAISON® XL Analyzer). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: la razón <15 se definió como negativa y la razón ≥ 15 como positiva.

La detección de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 (NAc) se realizó solo en la visita de 12 meses, con un instrumento automatizado (sistema ELISA Dynex DS2®) mediante una prueba de anticuerpos neutralizantes sustituta (SARS-CoV-2 NeutraLISA, Euroimmun, Lübeck, Alemania), que determina el efecto inhibitor de los anticuerpos que pueden competir con el receptor biotinilado de la célula huésped (ACE2) por la unión a S1/RBD (porcentaje de inhibición, %IH). Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: %IH <35 se consideró negativo y %IH ≥35 se consideró positivo.

La respuesta celular del SARS-CoV-2 se midió mediante un ensayo de liberación de interferón-γ cuantitativo específico (IGRA) siguiendo las instrucciones de fabricación (conjunto de tubos de estimulación SARS-CoV-2 IGRA, Euroimmun, Lübeck, Alemania). En resumen, la sangre heparinizada con litio de cada paciente se incubó 21 h a 37 °C en los tres tubos suministrados: tubo blanco para el fondo individual de IFN-γ y tubo de mitógeno para la secreción de IFN-γ inespecífico como controles, y tubo de estimulación recubierto con antígenos del SARS -Proteína de punta Cov-2 para la secreción específica de IFN-γ. El IFN-γ liberado en el plasma obtenido después de la centrifugación de los tres tubos se cuantificó luego mediante ELISA (Human interferon-gamma ELISA, Euroimmun, Lübeck, Alemania) en un instrumento automatizado (sistema ELISA Dynex DS2®). Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: IFN-γ[SARS-CoV-2] - IFN-γ[en blanco] <100 mIU/mL se consideró negativo, 100-200 se consideró límite y >200 se consideró positivo. El límite superior de cuantificación alcanzado fue de 5000 mIU/mL. Las concentraciones de IFN-γ por encima de la curva de calibración se definieron como >5000 mIU/mL.

- Variables de respuesta biológica al mes 1, 2, 6 y 12 meses: biomarcadores inflamatorios y protombóticos (proteína C reactiva, interleucina 6 o IL-6, dímero D y ferritina).
- Variables psicológicas y psiquiátricas (valoración de síntomas de depresión y ansiedad en el CSC).
- Otras variables de riesgo:
 - Comorbilidad (presencia de al menos alguna comorbilidad, índice Charlson, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiopatía isquémica crónica,

HTA, diabetes mellitus o toma de fármacos antidiabéticos. Se define la diabetes como una glucemia mantenida > 126 mg/dl).

- Tabaquismo en activo: definido como consumo de, al menos, 1 cigarrillo en los últimos 30 días.
- Tratamiento recibido (tratamiento inmunomodulador: corticoides/tocilizumab).

5.5 Análisis estadístico

Las variables continuas se expresan como mediana \pm percentiles 25 y 75 (Q1, Q3), y las variables categóricas como porcentajes. Se utilizó la prueba de Wilcoxon o la t de Student para comparar variables continuas, y la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para la comparación de variables categóricas entre pacientes con y sin síntomas persistentes.

Se utilizaron modelos de regresión logística binomial para identificar predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad a los 2, 6 y 12 meses. Las covariables con un valor de $p < 0,05$ en la comparación univariante entre grupos y variables clínicamente relevantes se incluyeron en análisis multivariados. Para comparar las curvas de carga viral, niveles de anticuerpos y biomarcadores entre grupos, se utilizaron modelos mixtos aditivos generalizados. Las interpolaciones en los gráficos se realizaron con splines cúbicos. Se realizó un análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) para encontrar el nivel sérico más discriminativo de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 que predice la persistencia de los síntomas a los 2 y 6 meses. El análisis estadístico se realizó utilizando R-project versión 3.6.2.

Salida prematura del estudio: Se previó que los pacientes permanecieran en el estudio durante los 12 meses de seguimiento. Se entendió como salida prematura: 1) salida voluntaria por revocación del consentimiento o traslado del paciente, y 2) exitus durante el seguimiento.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Características basales de los pacientes

Durante el periodo de estudio, un total de 166 pacientes fueron hospitalizados con infección grave por SARS-CoV-2, 23 (13,8%) ingresaron en UCI y 12 (7,2%) fallecieron durante su estancia hospitalaria. De los 154 pacientes que recibieron el alta hospitalaria, 8 fueron pérdidas de seguimiento (de los cuales se lograron recuperar 4 para la visita de seguimiento de 12 meses), y los 146 restantes aceptaron el seguimiento en consultas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas.

Durante los 12 meses de seguimiento, 8 pacientes fallecieron en los primeros 6 meses y 3 entre el sexto y duodécimo mes. Además 16 pacientes no completaron el seguimiento anual por presentar dificultades para la movilización (8 pacientes), por traslado de ciudad (5) o por motivos personales (3). Por tanto, 138 y 123 pacientes completaron las visitas de seguimiento de sexto y duodécimo mes, respectivamente. El diagrama de flujo de los pacientes se muestra en la Figura 1.

Ciento cuatro, 116 y 123 pacientes completaron el CSC a los 2, 6 y 12 meses, respectivamente. De los 123 pacientes que completaron el cuestionario de síntomas a los 12 meses, 21 (17.1%) fueron excluidos debido a que habían recibido vacunación de SARS-CoV-2 previa a la visita y 30 (24.4%) porque no disponíamos de resultados de sus cuestionarios a los 6 y 12 meses inclusive, resultando en un total de 72 pacientes sobre los que se realizó el análisis de persistencia de síntomas de mayor intensidad de forma mantenida durante todo el año de seguimiento.

Las características basales de los 146 pacientes inicialmente incluidos se muestran en la Tabla 1. La mediana de edad fue de 64 años, 88 (60,3%) eran hombres y el 72,6% tenía comorbilidades coexistentes. Las características clínicas en el momento del ingreso y la terapia administrada durante la estancia en el hospital se detallan en la Tabla 1.

Las características de los 72 pacientes sobre los que se analizó la persistencia de síntomas de mayor intensidad de forma mantenida tanto al sexto como duodécimo mes se detallan en la Tabla 2.

Definimos persistencia de síntomas de mayor intensidad como presentar algún síntoma del CSC por encima del tercer cuartil de puntuaciones.

6.2 Resultados clínicos y biológicos

Durante los primeros seis meses de seguimiento, 30 pacientes (20.6%) fueron reingresados (Tabla 3). Los motivos más frecuentes de reingreso hospitalario fueron las exacerbaciones de enfermedades subyacentes (23 eventos en 13 pacientes, 8,9%), las infecciones bacterianas (12 en 5 pacientes, 3,4%), las complicaciones trombohemorrágicas (9 en 9 pacientes, 6,1%) y la persistencia de síntomas residuales relacionados con la COVID-19 (8 en 6 pacientes, 4,1%).

Ocho (5,5%) pacientes fallecieron durante los primeros 6 meses y 3 durante los siguientes 6 meses. La información detallada de las causas de las muertes intrahospitalarias y tras el alta se muestran en la Tabla 3.

En la visita a los dos y seis meses, se observaron síntomas persistentes de mayor intensidad en un 26% y 24% de los pacientes, respectivamente, ocurriendo síntomas generales, gastrointestinales y respiratorios de intensidad moderada-severa en el 9,6 %, 7,4 % y 2,9 % de los pacientes a los dos meses, y en el 7,8 %, 4,3 % y 1,0 % de los pacientes a los 6 meses. En la Figura 2a se puede observar la evolución del grado de intensidad de los síntomas en los diferentes periodos (al ingreso, a los 2 y 6 meses) y en la Figura 2b, la intensidad de los síntomas a los 12 meses.

Los síntomas más frecuentes a los 2 y 6 meses fueron fatiga (12.5% y 10.3%, respectivamente), mialgias (7.6% y 6.9%) y disnea (6.7% y 4.3%).

Del total de 72 pacientes que cumplieron el CSC a los 6 y 12 meses, 14 (19.4%) persistieron con síntomas de mayor intensidad en ambas visitas, siendo los síntomas más frecuentes astenia (15.3%), mialgias, falta de concentración y pérdida de memoria (13.9%), insomnio (12.5%) y cefalea (11.1%). Un 18.1% de los pacientes presentaron dos o más síntomas de mayor intensidad durante todo el periodo de seguimiento. La información detallada de la sintomatología persistente a largo plazo se muestran en la Tabla 4.

En los primeros 6 meses, los biomarcadores inflamatorios séricos (ferritina, IL-6, dímero D y PCR) mostraron una disminución inicial durante el seguimiento, seguido de una estabilización posterior. La disminución inicial más marcada se observó en la PCR.

Los cambios temporales en los niveles de los biomarcadores durante los primeros 9 meses se muestran en la Figura 3ab.

6.3 Resultados virológicos

La detección de ARN del SARS-CoV-2 se mantuvo durante una mediana (Q1-Q3) de 13 días (2,2-33,8) (Tabla 1), lo que resultó en una proporción de pacientes que tuvieron un resultado negativo de la PCR en visitas de seguimiento a los 2 y 6 meses del 88% y 97%, respectivamente.

La proporción de pacientes que mantuvieron resultados positivos en la PCR de SARS-CoV-2 fue de 40/146 (27%; mediana [Q1–Q3] del Ct = 34 [31–37]), 15/127 (11,8%; mediana del Ct = 38 [37,25–39]) y 4/134 (3,0% ; mediana del Ct = 36 [36–36]) en las visitas del mes 1, 2 y 6, respectivamente.

Los resultados de la PCR de SARS-CoV-2 durante el seguimiento se muestran en la Figura 4.

6.4 Resultados serológicos

La mediana de tiempo (Q1-Q3) desde el inicio de la enfermedad hasta la seropositividad fue de 12 (8-15) días. El pico de IgG-S fue significativamente mayor en comparación con el de IgG-N (mediana de 5,9 frente a 4,1 de absorbancia/punto de corte [S/CO]; $p < 0,001$, respectivamente) (Tabla 1). La Figura 5 muestra los valores S/CO de IgG-S y IgG-N de todas las determinaciones de los pacientes del estudio a lo largo de los primeros 9 meses de seguimiento.

Los títulos de anticuerpos disminuyeron gradualmente y un total de 29 pacientes (28,7 %) seronegativizaron para IgG-N o IgG-S durante los primeros 6 meses de seguimiento: 23 negativizaron solo IgG-N, 2 IgG-S solo y 4 ambas, IgG-N y IgG-S.

La mayoría de los casos de seroreversión mencionados ocurrieron en la visita de los 6 meses (25/29 pacientes [86,2%]).

En el periodo entre 6 y 12 meses, un total de 21 pacientes recibieron la vacuna de SARS-CoV-2, la mayoría recibieron la vacuna Pfizer y solo la primera dosis (20 pacientes). Un paciente recibió una dosis de la vacuna Astra-Zeneca. A los 12 meses, excluyendo a los pacientes vacunados, ocurrió la seroreversión en 62 pacientes (60.7%) para IgG-N y en 22 (21.6%) para IgG-S, observándose títulos detectables de IgG-S a los 12 meses en 80 pacientes (78.4%).

En los pacientes que mostraron persistencia de síntomas de mayor intensidad se observaron menores títulos de IgG-S en diferentes momentos durante el seguimiento, incluida una tendencia a menores títulos a los 12 meses (mediana de 49 frente a 96.3 de AU/MI; $p=0,06$, respectivamente) y una menor frecuencia de anticuerpos neutralizantes (42.9% vs 79.3%; $p=0.007$) y mayor de anticuerpos antinucleares al año (57.1% vs 29.31%; $p=0.049$).

6.5 Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a los 2 meses

A los dos meses del alta, un número significativo de pacientes (76 [73%]) presentaron algún síntoma de cualquier intensidad en el CSC, siendo fatiga (54,8%), mialgia (30,8%), disnea (26,9%) y tos (25%) los más frecuentes.

Los síntomas de mayor intensidad referidos por los pacientes (por encima del Q3) en los CSC fueron fatiga (12,5 %), mialgia (7,6 %) y disnea (6,7 %).

En la Tabla 5 se muestran las características de los pacientes que presentaron las puntuaciones más elevadas en el cuestionario de síntomas COVID a los 2 meses.

En el análisis univariante, se observó que los pacientes con síntomas persistentes de mayor intensidad eran con mayor frecuencia fumadores activos ($p=0,013$), habían presentado infiltrados pulmonares bilaterales al ingreso ($p=0,015$), habían tenido niveles de ferritina al ingreso menores ($p=0,002$), y una tendencia a niveles de PCR más bajos ($p=0,055$), y habían recibido tocilizumab con menor frecuencia ($p=0,013$) durante el episodio agudo de COVID-19. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos en los valores del Ct de la PCR al ingreso (E-gen, 29,1 [26,5-32,8] vs. 29,7 [26,2-34,3]; $p=0,909$), en el tiempo hasta la negativización de la PCR (8 vs. 13 días; $p=0,237$), en la proporción de pacientes que mantuvieron la PCR positiva en las visitas de 1 mes (19 % frente a 35 %; $p=0,174$) y de 2 meses (7,4 % frente a 16,8 %; $p=0,375$) (Tabla 5), y en los valores del Ct de la PCR al mes (gen E, 35 [33,0-36,0] frente a 36 [31,5-37,5]; $p=0,754$) o a los 2 meses (gen E, 38,5 [38,2-38,8] vs 38,0 [37,0-39,0]; $p=1.000$).

En los pacientes que presentaron síntomas de mayor severidad en el cuestionario a los dos meses, se observó que mostraban una peor respuesta de anticuerpos contra el SARS-CoV-2, como refleja el mayor tiempo hasta alcanzar la seroconversión de IgG-S o IgG-N (mediana de 16 frente a 11 días; $p=0,012$), una pendiente menos pronunciada hasta

alcanzar los niveles máximos de anticuerpos (+0,4 [0–0,5] vs. +1,0 [0,5–3,2] cambio en S/CO por día; $p < 0,001$) y un valor pico de IgG-S más bajo (4,1 vs. 6,4 S/CO ; $p = 0,002$) (Tabla 5 y Figura 3).

En consecuencia, una menor proporción de los pacientes con síntomas de mayor intensidad a los 2 meses, presentó seroconversión para IgG-S e IgG-N (55,6 % frente a 86,7 %; $p = 0,002$).

El análisis de la curva ROC mostró que los pacientes con un valor de IgG-S por debajo de 5,4 S/CO al primer mes tras el alta tenían más probabilidades de tener síntomas de mayor intensidad a los 2 meses con un área bajo la curva (ABC) [IC 95 %] de 0,66 [0,54–0,79]. (Figura 6).

A los 2 meses se observaron dinámicas diferentes en las trayectoria de algunos biomarcadores inflamatorios entre el grupo de pacientes con síntomas de mayor intensidad y el resto. En los más sintomáticos, se apreció una tendencia a niveles más bajos de PCR en los momentos iniciales, observando posteriormente una inversión de los niveles en las visitas al 1 mes y 2 meses en relación con el resto de pacientes. (Figura 3 y Tabla 5).

En el análisis de regresión logística multivariante que incluyó la edad, el sexo, el índice de comorbilidad de Charlson, la puntuación de la escala ordinal de gravedad de la OMS, los valores máximos de IgG-S, los resultados de PCR SARS-CoV-2 positiva al mes y el uso de tocilizumab, se observó que un pico de IgG-S más bajo (OR [IC del 95 %] 0,80 [0,66–0,94]) y una mayor severidad en la escala de la OMS (2,57 [1,20–5,86] por cada punto de aumento) se comportaban como predictores independientes de persistencia de síntomas de mayor intensidad a los 2 meses. (Figura 7a).

Los análisis de sensibilidad realizados utilizando la mediana de las puntuaciones del CSC o la presentación de al menos un síntoma en el CSC para la clasificación de los pacientes mostraron tendencias similares (Figura 8ab).

6.6 Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a los 6 meses

Ciento dieciséis personas aceptaron voluntariamente completar el cuestionario de síntomas en la visita realizada a los 6 meses.

Los síntomas de mayor intensidad (por encima del Q3) referidos por los pacientes en los CSC del sexto mes fueron fatiga (10,3 %), mialgia (6,9 %), disnea (4,3 %), tos (4,3 %) y congestión nasal (4,3 %).

En el análisis univariante los pacientes con síntomas de mayor intensidad a los 6 meses mostraron niveles menores de PCR al ingreso y una tendencia a un pico más bajo de IgG-S (Tabla 6).

En el análisis de regresión logística multivariante incluyendo las mismas variables que en la visita de 2 meses, se observó que un pico de IgG-S más bajo (OR [IC 95%] 0,89 [0,79-0,99]) y el sexo femenino (2,41 [1,20-4,82]) se comportaron como predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad en los cuestionarios a los 6 meses (Figura 7b).

Los análisis de sensibilidad realizados utilizando la mediana de las puntuaciones del CSC o la presentación de al menos un síntoma en el CSC para la clasificación de los pacientes mostraron tendencias similares (Figura 8cd).

6.7 Caracterización y predictores de persistencia de síntomas a los 12 meses

A los 12 meses, de los 72 pacientes con información clínica de los CSC tanto a los 6 como a los 12 meses, 14 (19.4%) fueron los que presentaron mayor intensidad de los síntomas en ambas visitas, siendo astenia (15.3%), mialgias, falta de concentración y pérdida de memoria (13.9%), insomnio (12.5%) y cefalea (11.1%) los más frecuentes.

Un total de 13 pacientes (18.1%) presentaron al menos 2 o más síntomas al año del alta hospitalaria. En la tabla 4 se muestra la información detallada de la sintomatología persistente tras un año de seguimiento.

En el análisis univariante, se observó que los pacientes con síntomas persistentes a 12 meses eran con mayor frecuencia mujeres ($p=0.04$), fumadores activos ($p=0.02$), habían

presentado mayor gravedad de la enfermedad inicial en la escala de severidad de OMS ($p=0.02$), tenían menores títulos de anticuerpos neutralizantes ($p=0.007$) y mostraban una tendencia mayor a ingresar en UCI ($p=0.07$) y a un menor título de IgG S1/S2 de SARS-CoV-2 ($p=0.066$) [Tabla 2]

En el análisis multivariante ajustando por sexo e ingreso en UCI (no se pudo incluir en el mismo modelo la escala de severidad de la OMS debido a multicolinealidad), los predictores de persistencia de síntomas de mayor intensidad al año fueron un menor título de IgG S1/S2 de SARS-CoV-2 (HR [IC del 95 %] 0,14 [0,03–0,65]; $p=0.012$) y menores títulos de anticuerpos neutralizantes (HR [IC del 95 %] 0,98 [0,97–0,99]; $p=0.023$), ser fumador activo (HR [IC del 95 %] 12.02 [1.5–94.5]; $p=0.018$) y una tendencia a tener títulos de ANA \geq 1/160 (HR [IC del 95 %] 3.37 [0.8–13.5]; $p=0.087$).

Tanto el sexo (HR [IC del 95 %] 0,28 [0,1–0,7] $p=0.007$), como el ingreso en UCI (HR [IC del 95 %] 5.05 [1.6–15.8]; $p=0.005$) y la severidad en la escala de la OMS (HR [IC del 95 %] 2.22 [1.4–3.5]; $p=0.001$) se mantuvieron significativas en el modelo ajustado [Figura 9ab y Tabla 2].

No se observó asociación entre la persistencia de los síntomas y la respuesta inmune celular a SARS-CoV-2 medida con IGRA (Tabla 2).

La proporción de pacientes con títulos de anticuerpos antinucleares (ANA) \geq 160 fue mayor entre los pacientes que presentaron mayor intensidad de los síntomas en ambas visitas (57.1% vs 29.3%, $p=0.04$). Las diferencias entre los grupos se mantuvieron, aunque atenuadas tras el ajuste [HR (95% CI) 3.374 (0.84-13.57), $p=0.087$] (Tabla 2).

Los patrones de ANA más frecuentes entre los pacientes con mayor intensidad de los síntomas fueron nucleolar y homogéneo, encontrándose en 6 (42.9%) y 2(14.3%) pacientes.

En la Figura 9c-f pueden observarse las trayectorias de las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores (PCR, dímero D, linfocitos y cociente neutrófilos/linfocitos) durante el seguimiento. Los niveles de PCR y dímero D se mantuvieron más elevados en los pacientes con síntomas de mayor intensidad a los 12 meses ($p<0.01$), mientras que los linfocitos mostraron valores inferiores tanto al inicio como finalmente en los últimos meses del estudio ($p<0.01$). A los 12 meses las diferencias en los biomarcadores no fueron estadísticamente significativas, aunque las curvas de PCR y dímero D mostraron dinámicas diferentes ($p<0.01$).

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

En esta cohorte donde se evaluaron los resultados clínicos, serológicos y virológicos de los pacientes ingresados en el hospital por COVID-19 durante un período de seguimiento de 12 meses, se observó una alta frecuencia de eventos clínicos tras el alta hospitalaria. La mayoría de estos eventos estuvieron relacionados con las comorbilidades subyacentes de los pacientes, las infecciones bacterianas secundarias y las complicaciones asociadas a la COVID-19, incluidos los eventos trombo-hemorrágicos. Un 26% de los pacientes mostraron síntomas persistentes de mayor intensidad a los 2 meses y un 24% a los 6 meses. Durante el año de seguimiento, 14 (19.4%) pacientes de los 72 con datos disponibles a 6 y 12 meses mostraron persistencia mantenida de síntomas de mayor intensidad.

La persistencia de síntomas se asoció con un perfil serológico, inflamatorio y clínico distinto, que difería según el periodo de seguimiento y la duración de los síntomas. Los pacientes que presentaron síntomas persistentes de mayor intensidad tanto a medio como a largo plazo, mostraron una respuesta de anticuerpos inicial y a largo plazo más débil y unos niveles mayores de inflamación residual durante los meses de seguimiento, con una tendencia a atenuarse al año. Los síntomas persistentes a medio plazo (2 meses) se asociaron con mayores niveles de inflamación en los meses 1 y 2 tras el alta, con un menor título de IgG-S, con una mayor severidad de la enfermedad inicial según la escala de la OMS y tendieron a ocurrir más en las mujeres. El sexo femenino se mostró además como predictor de la persistencia de síntomas a 6 y 12 meses, al igual que unos menores títulos de anticuerpos IgG S1/S2 de SARS-CoV-2 y de anticuerpos neutralizantes y una tendencia mayor a tener títulos de ANA $\geq 1/160$ (tanto en el análisis crudo como tras ajustar por sexo e ingreso en UCI/escala de severidad de la OMS).

Desde la perspectiva virológica, tras observar una mediana de duración de excreción viral de alrededor de 2 semanas, se encontró que un 12% de los pacientes mantenían la PCR a los 2 meses positiva, lo que sugiere replicación viral persistente. A los 6 meses, sin embargo, solo cuatro pacientes (3%) mantuvieron la PCR positiva.

A nivel serológico, los anticuerpos IgG-S fueron los que alcanzaron los títulos más elevados, observando posteriormente una disminución gradual tanto de IgG-S como de IgG-N. Se observó seroreversión de IgG-N en más de una cuarta parte de los pacientes a los 6 meses del alta y en un 60% a los 12 meses, pero esto fue poco frecuente con los anticuerpos IgG-S (6 % a los 6 meses y 21.6% a los 12), los cuales son potencialmente neutralizantes, lo que reforzaría la presencia de una respuesta de anticuerpos duradera en pacientes con COVID grave que requieren hospitalización, en contraste a la rápida disminución de anticuerpos reportada en pacientes con COVID leve [109,181,182]. De hecho, la gravedad de la enfermedad se ha asociado con la magnitud y la duración de la respuesta de anticuerpos [183].

En la actualidad, la patogenia y la duración de este síndrome multisistémico siguen sin conocerse en profundidad. Los datos sobre COVID persistente con un seguimiento tan prolongado son escasos [184]. Nuestros datos sugieren una participación de la respuesta de anticuerpos en el desarrollo de la COVID persistente. En este estudio, la persistencia de síntomas de mayor intensidad tanto a medio (2 meses) como a largo plazo (6 meses y 12 meses) se asoció con unos títulos más bajos de IgG-S y con un menor nivel de anticuerpos neutralizantes a los 12 meses. En pacientes con síntomas a medio plazo (2 meses) se observó adicionalmente una respuesta retardada de anticuerpos, esta última también demostrando ser un predictor de la persistencia de síntomas severos en el análisis multivariante.

Algunos estudios experimentales han demostrado que, además de la respuesta de las células T, la IgG y los anticuerpos neutralizantes son cruciales para controlar las infecciones virales [186,187]. Además de la actividad antimicrobiana, los anticuerpos contribuyen a modular la respuesta inflamatoria a través del receptor Fc-gamma, los receptores toll-like y la activación del complemento, todos ellos induciendo la secreción o represión de diversos mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios [188-191]. La infección aguda severa por SARS-CoV-2 se ha asociado con una destrucción de los centros germinales en los ganglios linfáticos y con una reducción considerable de las células B que expresan Bcl-6, lo que conlleva una disregulación de la inmunidad humoral específica frente a SARS-CoV-2 y podría contribuir a la persistencia de inflamación sistémica [192]. Los pacientes que desarrollaron síntomas persistentes de mayor intensidad en nuestro estudio tuvieron una COVID más grave y podrían haber tenido un

efecto lesivo de mayor intensidad y/o duración sobre los centros germinales, lo que podría implicar una peor recuperación de la inmunidad protectora contra el SARS-CoV-2.

La COVID se ha asociado con reducciones de las concentraciones de la subclase de inmunoglobulina IgG3, tanto durante la fase de infección aguda como a los 6 meses [193]. La IgG3, junto con la IgG1, constituyen las respuestas de anticuerpos predominantes contra varias enfermedades virales, incluido el SARS-CoV-2 [194]. Además, en pacientes con COVID persistente de 3 meses se ha descrito una disfunción de neutrófilos que tendía a interferir con la producción de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2-S1 [195]. Una respuesta inmunitaria humoral deteriorada, particularmente cuando involucra los anticuerpos neutralizantes protectores, podría favorecer la infección persistente por SARS-CoV-2 o el reservorio antigénico [196], así como la estimulación inmunitaria, la inflamación mantenida y la autorreactividad [188], que pueden contribuir a la perpetuación de los síntomas. En consecuencia, una respuesta humoral deficitaria podría estar relacionada con la mayor frecuencia de niveles positivos de anticuerpos antinucleares (ANA) en nuestros pacientes con COVID persistente tras 1 año.

Se han detectado ANA positivos en hasta el 50 % de los pacientes con infección aguda por SARS-CoV-2 [77,81] pero, por el contrario, los datos a largo plazo son limitados y contradictorios [197,198]. En nuestro estudio se observó una elevada proporción de pacientes con ANA a títulos altos (≥ 160) en los pacientes persistentemente sintomáticos, mayor que en el resto de pacientes (57.1% vs 29.3%, $p=0.04$), destacando por encima del resto el patrón antinucleolar, el cual está implicado en la patogenia de la esclerosis sistémica donde la afectación pulmonar intersticial y restrictiva recuerda a la que presentan algunos pacientes con COVID persistente. Nuestros resultados están en línea con los hallazgos de Seeble et al, quienes describieron una mayor proporción de ANA positivos 12 meses después del diagnóstico de COVID-19, particularmente en asociación con síntomas neurocognitivos [197].

En nuestra cohorte no encontramos que existiera una asociación entre la persistencia de los síntomas y la respuesta celular de los linfocitos T medida mediante liberación de interferón- γ a los 12 meses. En otros estudios se ha observado que los niveles de células T CD8+ citotóxicas aumentan y se activan en pacientes con COVID persistente hasta 8 meses después de la infección aguda [199, 200], y la activación de estas células T CD8+ se ha asociado con autoinmunidad [201, 202] y con mayor capacidad para producir

mediadores inflamatorios [203]. Nuestros resultados sí sugieren una inflamación crónica mantenida durante un año en pacientes con COVID persistente, siendo el periodo más largo descrito hasta ahora [199,51].

Tanto los efectos antivirales como los inmunomoduladores de los anticuerpos frente a SARS-CoV-2 podrían haber estado involucrados en la mejor recuperación clínica de los pacientes que presentaron niveles altos de anticuerpos en nuestra cohorte. Los efectos protectores de las inmunoglobulinas son en realidad la base para el uso de plasma de convaleciente [204, 205] y de los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la proteína spike del SARS-CoV-2 [206] para tratar pacientes en la fase aguda de la COVID-19.

Potencialmente, los anticuerpos monoclonales o los refuerzos (“booster”) de la respuesta de anticuerpos con la vacunación podrían ser una estrategia para prevenir la COVID persistente en pacientes con títulos bajos de anticuerpos. Esta hipótesis precisa aún más investigación.

La COVID persistente se asoció en nuestro estudio con características diferenciales en la respuesta inmune innata y adaptativa, que consisten en una respuesta inflamatoria inicial en la fase aguda más débil, como lo demuestran los niveles basales más bajos de PCR y ferritina. Estos hallazgos son coherentes con la menor respuesta de anticuerpos observada en este grupo de pacientes y respaldan la correlación descrita entre los niveles de anticuerpos y los biomarcadores de inflamación [207]. Una respuesta inmunitaria/inflamatoria menos intensa puede provocar un control deficiente o incompleto de la replicación viral y, finalmente, mayores secuelas y síntomas a largo plazo. Por otro lado, las potentes respuestas inmunitarias innatas y adaptativas durante la infección aguda podrían conducir potencialmente a un control más eficaz de la enfermedad y una menor inflamación residual e incidencia de secuelas posteriores. Curiosamente, los pacientes con síntomas duraderos de mayor intensidad mostraron una inflamación residual persistente a largo plazo, con una tendencia a atenuarse. En otros síndromes postinfecciosos relacionados con los virus Chikungunya o Epstein-Barr, o en la encefalomielitis miálgica se han descrito también marcadores elevados de inflamación y autoinmunidad [65-67].

Además de la respuesta inmune, también se han observado factores demográficos y clínicos que actuarían como predictores de la COVID persistente.

Los síntomas persistentes a largo plazo (6 meses y 12 meses) se asociaron con el sexo femenino, un hallazgo también respaldado por otros estudios [184, 208].

Una mayor gravedad de la enfermedad inicial demostró ser un predictor de síntomas persistentes a medio y largo plazo. Se esperaría que la enfermedad grave y la respuesta hiperinflamatoria que ocurre en la fase tardía indujeran una mayor lesión de órganos, lo que podría estar asociado con una mayor incidencia de secuelas, una hipótesis respaldada por la mayor prevalencia de síntomas persistentes encontrados en pacientes con COVID-19 ingresados en la UCI [109, 172]. Aunque también se ha descrito COVID persistente en pacientes con formas leves de COVID en la fase aguda, en los pacientes críticos se han observado con mayor frecuencia daños estructurales subyacentes que contribuyen a explicar los síntomas [209], y hasta el 80% de ellos desarrollan deterioro físico, cognitivo o de salud mental que persisten más allá del alta hospitalaria [210].

En nuestro análisis a los 12 meses, sí se observó que la gravedad de la enfermedad fue un predictor de síntomas de mayor intensidad mantenidos a largo plazo, en línea con los resultados de Huang et al. [109].

Nuestro estudio incluye datos a muy largo plazo sobre COVID persistente, sobre la que actualmente existe todavía escasa información. La principal innovación de nuestra investigación ha sido el hallazgo de la importancia de la respuesta de anticuerpos en la patogenia de la COVID persistente, y la asociación de la misma con una respuesta más débil de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en los pacientes en los que persistían los síntomas de mayor intensidad, tanto en título como en capacidad neutralizante. La implicación de la respuesta inmune humoral como potencial mecanismo etiopatogénico de persistencia de síntomas supone una novedad, hasta donde sabemos previamente no publicada en la COVID persistente. Otro dato sobre el que existe poca información es la prevalencia de títulos positivos de ANA en pacientes con persistencia de síntomas a muy largo plazo. En nuestro estudio se observó una elevada proporción de pacientes con títulos de anticuerpos antinucleares positivos (≥ 160) en este grupo de pacientes persistentemente sintomáticos, siendo mayor que en el resto de pacientes (57.1% vs 29.3%, $p=0.04$).

El tamaño de la muestra es una limitación del estudio. Dado que la COVID persistente es un síndrome heterogéneo, las asociaciones encontradas pueden diferir según la naturaleza de los síntomas analizados. Otra posible limitación es que para analizar la COVID persistente no existe una definición operativa de caso “COVID persistente”. Nosotros nos centramos en los pacientes que notificaron puntuaciones más elevadas en los cuestionarios clínicos, para identificar aquellos síntomas que tenían más probabilidades de ser significativos para los pacientes y evitar la sobrerrepresentación de los casos de COVID persistente. Por lo tanto, aquellos pacientes con síntomas más leves no estarían representados. Sin embargo, para minimizar esta limitación, realizamos análisis de sensibilidad que incluyeron pacientes con cualquier síntoma, o aquellos con una puntuación por encima de la mediana, los cuales mostraron resultados similares a los que analizamos en este estudio (mayores del tercer cuartil de puntuaciones del CSC). Para algunas de las figuras, las líneas de interpolación en ciertos intervalos se desarrollaron con un número relativamente bajo de datos. Las principales fortalezas de nuestro estudio son su diseño longitudinal con una incorporación de pacientes de forma consecutiva, que proporciona datos longitudinales a largo plazo de una cohorte de pacientes tras ingreso por COVID-19 con un seguimiento estrecho y exhaustivo, y con una caracterización integral de las respuestas inmunitarias a los 12 meses.

En conclusión, los pacientes con síntomas persistentes de mayor intensidad de 1 año de duración exhiben un fenotipo inmunológico diferencial que incluye niveles reducidos de anticuerpos neutralizantes y anti-proteína S de SARS-CoV-2, mayores niveles de autoinmunidad y una inflamación crónica de bajo grado que tiende a atenuarse. Aunque estos hallazgos aún no se han confirmado en cohortes de mayor tamaño, pueden contribuir a profundizar en la patogénesis de la COVID persistente.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- Una proporción apreciable de los pacientes ingresados por COVID-19 presenta síntomas persistentes a los dos y seis meses del alta (principalmente respiratorios y generales) y en menor medida al año (generales y neuropsiquiátricos).
- El sexo femenino y una mayor severidad inicial de la COVID-19 se relacionan con la persistencia de síntomas de mayor intensidad.
- Los pacientes con síntomas persistentes de mayor intensidad muestran niveles mayores de biomarcadores inflamatorios (dímero D y PCR) durante los primeros 12 meses tras la infección, aunque las diferencias tienden a atenuarse con el paso del tiempo.
- Aunque en la mayoría de los pacientes la detección del virus en el tracto respiratorio superior se negativiza en las primeras dos semanas, a los dos meses aún se detecta el genoma vírico por PCR en una minoría de los pacientes. No se ha observado asociación entre la persistencia viral y la permanencia de síntomas de mayor intensidad.
- La persistencia de síntomas de mayor intensidad se asocia con menores títulos de anticuerpos anti-proteína S en diferentes momentos del seguimiento y con una menor probabilidad de presentar anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 y una mayor frecuencia de anticuerpos antinucleares al año.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382:1708-20.
2. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382:1199–207.
3. Pandey P, Agarwal S, Rajkumar. Lung Pathology in COVID-19: A Systematic Review. *Int J Appl Basic Med Res.* 2020; 10: 226-33.
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579: 270-3.
5. Cobos-Siles M, Cubero-Morais P, Arroyo-Jiménez I, Rey-Hernández M, Hernández-Gómez L, Vargas-Parra DJ, et al. Cause-specific death in hospitalized individuals infected with SARS-CoV-2: more than just acute respiratory failure or thromboembolic events. *Internal and emergency medicine.* 2020; 15: 1533-44.
6. 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.* 2020; 323:1061-9.
7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020; 181:271-80.e8.
8. Sahu S, Patil CR, Kumar S, Apparsundaram S, Goyal RK. Role of ACE2-Ang (1-7)-Mas axis in post-COVID-19 complications and its dietary modulation. *Mol Cell Biochem.* 2022; 477: 225-40.
9. 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.* 2020;368:1091.

10. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323:1239-42.
11. Li X, Ma X. Acute respiratory failure in COVID-19: is it "typical" ARDS? *Crit Care*. 2020; 24:198.
12. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed [13/2/22]
13. Piroth L, Cottenet J, Mariet AS, Bonniaud P, Blot M, Tubert-Bitter P, et al. Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2021; 9:251-9.
14. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012 ;12:687-95.
15. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization (COVID-19) Homepage. Available at <https://www.covid19.who.int/>. Accessed [13/2/22]
16. Tabish SA. COVID-19 pandemic: Emerging perspectives and future trends. *J Public Health Res*. 2020 ;9:1786.
17. Greenhalgh T, Knight M, A'Court C, Buxton M, Husain L. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ*. 2020; 370:m3026.
18. Crook H, Raza S, Nowell J, Young M, Edison P. Long covid-mechanisms, risk factors, and management. *BMJ*. 2021; 374:n1648.
19. World Health Organization. International Classification of Diseases (ICD). Emergency use ICD codes for COVID-19 disease outbreak. Available at

- <https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases/emergency-use-icd-codes-for-covid-19-disease-outbreak>. Accessed [13/2/22].
20. NIH-National Institutes of Health (EE. UU.). Available from: <https://videocast.nih.gov/watch=38878>. Accessed [13/2/22].
 21. Datta SD, Talwar A, Lee JT. A Proposed Framework and Timeline of the Spectrum of Disease Due to SARS-CoV-2 Infection: Illness Beyond Acute Infection and Public Health Implications. *JAMA*. 2020; 324:2251-2.
 22. COVID-19 rapid guideline: managing the longterm effects of COVID-19. National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) and Royal College of General Practitioners (RCGP). Version 1.13 published on 01.02.2022. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188/resources/covid19-rapid-guideline-managing-the-longterm-effects-of-covid19-pdf-51035515742> Accessed [13/2/22].
 23. Modi N, Conti G, Hanson M. Post-COVID economic recovery: women and children first ... or last? *Arch Dis Child*. 2021: archdischild-2020-320898.
 24. Nune A, Iyengar KP, Ahmed A, Bilgrami S, Sapkota HR. Impact of COVID-19 on rheumatology practice in the UK-a pan-regional rheumatology survey. *Clin Rheumatol*. 2021;40:2499-504.
 25. Talarico R, Aguilera S, Alexander T, Amoura Z, Antunes AM, Arnaud L, et al. The impact of COVID-19 on rare and complex connective tissue diseases: the experience of ERN ReCONNET. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17:177-84.
 26. O'Brien H, Tracey MJ, Ottewill C, O'Brien ME, Morgan RK, Costello RW, et al. An integrated multidisciplinary model of COVID-19 recovery care. *Ir J Med Sci*. 2021;190:461-8.

27. UK Research and Innovation (UKRI) and the National Institute for Health Research (NIHR). Available from: <https://www.ukri.org/news/18-5-million-to-tackle-long-covid-in-the-community/> Accessed [13/2/22].
28. Yeo I, Baek S, Kim J, Elshakh H, Voronina A, Lou MS, et al. Assessment of thirty-day readmission rate, timing, causes and predictors after hospitalization with COVID-19. *Journal of internal medicine*. 2021; 290: 157-65.
29. Günster C, Busse R, Spoden M, Rombey T, Schillinger G, Hoffmann W, et al. 6-month mortality and readmissions of hospitalized COVID-19 patients: A nationwide cohort study of 8,679 patients in Germany. *PLoS One*. 2021;16:e0255427.
30. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)*. 2021;53:737-54.
31. Lledó GM, Sellares J, Brotons C, Sans M, Antón JD, Blanco J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome: a new tsunami requiring a universal case definition. *Clin Microbiol Infect*. 2021:S1198-743X(21)00661-3.
32. Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, Relan P, Diaz JV; on behalf of the WHO Clinical Case Definition Working Group on Post-COVID-19 Condition. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis*. 2021; S1473-3099(21)00703-9. [Available at [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00703-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00703-9)] Accessed [13/2/22].
33. Post-COVID Conditions: Information for Healthcare Providers. Centers for Disease Control and Prevention. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/post-covid-conditions.html> Accessed [13/2/22].
34. Lledó G, Sellares J, Brotons C, Sans M, Díez J, Blanco J, et al. Postacute COVID Syndrome (PACS): Definition, impact and management. Multidisciplinary Collaborative Group for the Scientific Monitoring of COVID-19. ISGlobal, CoMB. 2021. Available from: <https://www.isglobal.org/documents/10179/6022921/3+GCMSC+report+postac>

ute+covid+syndrome.pdf/8d7d0410-6606-49d7-b4ec-b8566a048e8b?version=1.2 Accessed [13/2/22].

35. Becker RC. COVID-19 and its sequelae: a platform for optimal patient care, discovery and training. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;51:587-94.
36. Chippa V, Aleem A, Anjum F. Post Acute Coronavirus (COVID-19) Syndrome. StatPearls Publishing. 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570608>
37. Cañas CA. The triggering of post-COVID-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals. *Med Hypotheses*. 2020 ;145:110345.
38. Loarce-Martos J, García-Fernández A, López-Gutiérrez F, García-García V, Calvo-Sanz L, Del Bosque-Granero I, et al. High rates of severe disease and death due to SARS-CoV-2 infection in rheumatic disease patients treated with rituximab: a descriptive study. *Rheumatol Int*. 2020;40:2015-21.
39. Garg SS, Sharma A, Gupta J. Immunomodulation and immunotherapeutics of COVID-19. *Clin Immunol*. 2021;231:108842.
40. Patterson BK, Guevara-Coto J, Yogendra R, Francisco EB, Long E, Pise A, et al. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning. *Front Immunol*. 2021;12:700782.
41. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;591:639-44.
42. Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, et al. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2020;19:102597.
43. Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med*. 2021;26:107-8.

44. Ou M, Zhu J, Ji P, Li H, Zhong Z, Li B, et al. Risk factors of severe cases with COVID-19: a meta-analysis. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e175.
45. He R, Lu Z, Zhang L, Fan T, Xiong R, Shen X, et al. The clinical course and its correlated immune status in COVID-19 pneumonia. *J Clin Virol.* 2020;127:104361.
46. Fathi N, Rezaei N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. *Cell Biol Int.* 2020;44:1792-7.
47. Cheng Y, Zhao H, Song P, Zhang Z, Chen J, Zhou YH. Dynamic changes of lymphocyte counts in adult patients with severe pandemic H1N1 influenza A. *J Infect Public Health.* 2019;12:878-83.
48. Kong M, Zhang H, Cao X, Mao X, Lu Z. Higher level of neutrophil-to-lymphocyte is associated with severe COVID-19. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e139.
49. Karlsson AC, Humbert M, Buggert M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. *Sci Immunol.* 2020;5:eabe8063.
50. Silva Andrade B, Siqueira S, de Assis Soares WR, de Souza Rangel F, Santos NO, Dos Santos Freitas A, et al. Long-COVID and Post-COVID Health Complications: An Up-to-Date Review on Clinical Conditions and Their Possible Molecular Mechanisms. *Viruses.* 2021;13:700.
51. Ong SWX, Fong SW, Young BE, Chan YH, Lee B, Amrun SN, et al. Persistent Symptoms and Association With Inflammatory Cytokine Signatures in Recovered Coronavirus Disease 2019 Patients. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8:ofab156.
52. Sedaghat Z, Karimi N. Guillain Barre syndrome associated with COVID-19 infection: A case report. *J Clin Neurosci.* 2020;76:233-5.
53. García-Manzanedo S, López de la Oliva Calvo L, Ruiz Álvarez L. Guillain-Barré syndrome after Covid-19 infection. *Med Clin (Engl Ed).* 2020;155:366.

54. Gonçalves LF, Gonzales AI, Patatt FSA, Paiva KM, Haas P. Kawasaki and COVID-19 disease in children: a systematic review. *Rev Assoc Med Bras.* 2020 ;66Suppl2:136-42.
55. Sadanandam A, Bopp T, Dixit S, Knapp DJHF, Emperumal CP, Vergidis P, et al. A blood transcriptome-based analysis of disease progression, immune regulation, and symptoms in coronavirus-infected patients. *Cell Death Discov.* 2020 ;6:141.
56. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med.* 2019;25:198-214.
57. Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun.* 2020 ;109:102421.
58. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* 2021;27:601–15.
59. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021 ;93:250-6.
60. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol.* 2020;39:2085-94.
61. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020;395:1033-4.
62. Amato MK, Hennessy C, Shah K, Mayer J. Multisystem inflammatory syndrome in an adult. *J Emerg Med.* 2021;61:e1-e3.
63. Morris SB, Schwartz NG, Patel P, Abbo L, Beauchamps L, Balan S, et al. Case Series of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults Associated with SARS-CoV-2 Infection - United Kingdom and United States, March-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69:1450-6.

64. Sollini M, Ciccarelli M, Cecconi M, Aghemo A, Morelli P, Gelardi F, et al. Vasculitis changes in COVID-19 survivors with persistent symptoms: an [18F]FDG-PET/CT study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48:1460-6.
65. Rodriguez LST, Pou C, Lakshmikanth T, Zhang J, Mugabo CH, Wang J, et al. Achieving symptom relief in patients with myalgic encephalomyelitis by targeting the neuro-immune interface and inducing disease tolerance. *BioRxiv* [Preprint]. February 28, 2020. Available at <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.958249>.
66. Blundell S, Ray KK, Buckland M, White PD. Chronic fatigue syndrome and circulating cytokines: a systematic review. *Brain Behav Immun*. 2015;50:186–95.
67. Guillot X, Ribera A, Gasque P. Chikungunya-induced arthritis in Reunion Island: a long-term observational follow-up study showing frequently persistent joint symptoms, some cases of persistent chikungunya immunoglobulin M positivity, and no anticyclic citrullinated peptide seroconversion after 13 years. *J Infect Dis*. 2020;222:1740–4.
68. De Melo GD, Lazarini F, Levallois S, Hautefort C, Michel V, Larrous F, et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabf8396.
69. Brainard J, Pond K, Hooper L, Edmunds K, Hunter P. Presence and Persistence of Ebola or Marburg Virus in Patients and Survivors: A Rapid Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004475.
70. Liu B; Han J; Cheng X; Yu L; Zhang L; Wang W; et al. Reduced numbers of T cells and B cells correlates with persistent SARS-CoV-2 presence in non-severe COVID-19 patients. *Sci. Rep.* 2020, 10, 17718.
71. Carmo A, Pereira-Vaz J, Mota V, Mendes A, Morais C, da Silva AC, et al. Clearance and persistence of SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19. *J Med Virol*. 2020;92:2227-31.

72. Kandetu TB, Dziuban EJ, Sikuvi K, Beard RS, Nghihepa R, van Rooyen G, et al. Persistence of Positive RT-PCR Results for Over 70 Days in Two Travelers with COVID-19. *Disaster Med Public Health Prep.* 2020;19:1-2.
73. Vibholm LK, Nielsen SSF, Pahus MH, Frattari GS, Olesen R, Andersen R, et al. SARS-CoV-2 persistence is associated with antigen-specific CD8 T-cell responses. *EBioMedicine.* 2021;64:103230.
74. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis.* 2020;99:397-402.
75. Park SK, Lee CW, Park DI, Woo HY, Cheong HS, Shin HC, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Fecal Samples From Patients With Asymptomatic and Mild COVID-19 in Korea. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19:1387-94.
76. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:434-5.
77. Chang SE, Feng A, Meng W, Apostolidis SA, Mack E, Artandi M, et al. New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nat Commun.* 2021; 12:5417.
78. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020;370:eabd4585.
79. Zuo Y, Estes SK, Ali RA, Gandhi AA, Yalavarthi S, Shi H, et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med.* 2020;12:eabd3876.
80. Peker BO, Şener AG, Kaptan Aydoğmuş F. Antinuclear antibodies (ANAs) detected by indirect immunofluorescence (IIF) method in acute COVID-19

- infection; future roadmap for laboratory diagnosis. *J Immunol Methods*. 2021;499:113174.
81. Pascolini S, Vannini A, Deleonardi G, Ciordinik M, Sensoli A, Carletti I, et al. COVID-19 and immunological dysregulation: can autoantibodies be useful? *Clin.Transl. Sci.* 2021; 14:502-8.
 82. Muratori P, Lenzi M, Muratori L, Granito A. Antinuclear antibodies in COVID 19. *Clin Transl Sci.* 2021;14:1627-8.
 83. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008 ;4:491-8.
 84. Piazza G, Campia U, Hurwitz S, Snyder JE, Rizzo SM, Pfeferman MB, et al. Registry of Arterial and Venous Thromboembolic Complications in Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76:2060-72.
 85. Sakr Y, Giovini M, Leone M, Pizzilli G, Kortgen A, Bauer M, et al. Pulmonary embolism in patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19) pneumonia: a narrative review. *Ann Intensive Care.* 2020;10:124.
 86. Van Kruijsdijk RC, de Jong PA, Abrahams AC. Pulmonary vein thrombosis in COVID-19. *BMJ Case Rep.* 2020;13:e239986.
 87. Lee SG, Fralick M, Sholzberg M. Coagulopathy associated with COVID-19. *CMAJ.* 2020;192:E583.
 88. Moreno G, Carbonell R, Bodí M, Rodríguez A. Systematic review of the prognostic utility of D-dimer, disseminated intravascular coagulation, and anticoagulant therapy in COVID-19 critically ill patients. *Med Intensiva (Engl Ed).* 2021;45:42-55.
 89. Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. *Circulation.* 2020;142:68-78.
 90. Al-Gburi S, Beissert S, Günther C. Molecular mechanisms of vasculopathy and coagulopathy in COVID-19. *Biol Chem.* 2021;402:1505-18.

91. Giustino G, Croft LB, Stefanini GG, Bragato R, Silbiger JJ, Vicenzi M, et al. Characterization of Myocardial Injury in Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76:2043-55.
92. Escher R, Breakey N, Lämmle B. ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thromb Res*. 2020;192:174-5.
93. Zachariah U, Nair SC, Goel A, Balasubramanian KA, Mackie I, Elias E, et al. Targeting raised von Willebrand factor levels and macrophage activation in severe COVID-19: Consider low volume plasma exchange and low dose steroid. *Thromb Res*. 2020;192:2.
94. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395:1417-8.
95. Lui DTW, Lee CH, Chow WS, Lee ACH, Tam AR, Fong CHY, et al. Thyroid dysfunction in relation to immune profile, disease status, and outcome in 191 patients with COVID-19. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2021;106:e926–e935.
96. Muller I, Cannavaro D, Dazzi D, Covelli D, Mantovani G, Muscatello A, et al. SARS-CoV-2-related atypical thyroiditis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8:739-41.
97. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157:121-41.
98. Marazzato M, Ceccarelli G, D'Ettorre G, Santinelli L, Pinacchio C, Celani L, et al. Fr576 ORAL BACTERIOTHERAPY IN PATIENTS WITH COVID-19: A RETROSPECTIVE COHORT STUDY. *Gastroenterology*. 2021;160:S-370.
99. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021;70:698-706.

100. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*. 2020;159:944-55.e8.
101. Elrashdy F, Aljaddawi AA, Redwan EM, Uversky VN. On the potential role of exosomes in the COVID-19 reinfection/reactivation opportunity. *J Biomol Struct Dyn*. 2021 ;39:5831-42.
102. Theoharides TC. Could SARS-CoV-2 Spike Protein Be Responsible for Long-COVID Syndrome? *Mol Neurobiol*. 2022:1–12.
103. Afrin LB, Weinstock LB, Molderings GJ. Covid-19 hyperinflammation and post-Covid-19 illness may be rooted in mast cell activation syndrome. *Int J Infect Dis*. 2020;100:327-32.
104. Prevalence of ongoing symptoms following coronavirus (COVID-19) infection in the UK. Office of National Statistics. Available from: <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/bulletins/prevalenceofongoingsymptomsfollowingcoronaviruscovid19infectionintheuk/3february2022> . Accessed [13/2/22].
105. Andrews PJ, Pendolino AL, Ottaviano G, Scarpa B, Grant J, Gaudio P, et al. Olfactory and taste dysfunction among mild-to-moderate symptomatic COVID-19 positive health care workers: An international survey. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2020;5:1019-28.
106. Mandal S, Barnett J, Brill SE, Brown JS, Denny EK, Hare SS, et al. 'Long-COVID': a cross-sectional study of persisting symptoms, biomarker and imaging abnormalities following hospitalisation for COVID-19. *Thorax*. 2021;76:396-8.
107. Arnold DT, Hamilton FW, Milne A, Morley AJ, Viner J, Attwood M, et al. Patient outcomes after hospitalisation with COVID-19 and implications for follow-up: results from a prospective UK cohort. *Thorax*. 2021;76:399-401.

108. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, et al. More than 50 Long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2021 ;11:16144.
109. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet.* 2021;397:220-32.
110. Chopra V, Flanders SA, O'Malley M, Malani AN, Prescott HC. Sixty-Day Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19. *Ann Intern Med.* 2021;174:576-8.
111. D'Errico S, Zanon M, Montanaro M, Radaelli D, Sessa F, Di Mizio G, et al. More than Pneumonia: Distinctive Features of SARS-Cov-2 Infection. From Autopsy Findings to Clinical Implications: A Systematic Review. *Microorganisms.* 2020;8:1642.
112. Carfi A, Bernabei R, Landi F; Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA.* 2020;324:603-5.
113. De Lorenzo R, Conte C, Lanzani C, Benedetti F, Roveri L, Mazza MG, et al. Residual clinical damage after COVID-19: A retrospective and prospective observational cohort study. *PLoS One.* 2020;15:e0239570.
114. Wei J, Yang H, Lei P, Fan B, Qiu Y, Zeng B, et al. Analysis of thin-section CT in patients with coronavirus disease (COVID-19) after hospital discharge. *J Xray Sci Technol.* 2020;28:383-9.
115. Zhao YM, Shang YM, Song WB, Li QQ, Xie H, Xu QF, et al. Follow-up study of the pulmonary function and related physiological characteristics of COVID-19 survivors three months after recovery. *EClinicalMedicine.* 2020;25:100463.

116. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;18:1421-4.
117. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383:120-8.
118. Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL, Keerthisingam C, McAnulty RJ, Laurent GJ, et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol.* 2003 ;163:345-54.
119. King CS, Mannem H, Kukreja J, Aryal S, Tang D, Singer JP, et al. Lung Transplantation for Patients With COVID-19. *Chest.* 2022;161:169-78.
120. Wong TL, Weitzer DJ. Long COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS)-A Systemic Review and Comparison of Clinical Presentation and Symptomatology. *Medicina (Kaunas).* 2021;57:418.
121. Komaroff AL, Bateman L. Will COVID-19 Lead to Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome? *Front Med (Lausanne).* 2021 18;7:606824.
122. Guedj E, Campion JY, Dudouet P, Kaphan E, Bregeon F, Tissot-Dupont H, et al. 18F-FDG brain PET hypometabolism in patients with long COVID. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021;48:2823-33.
123. Townsend L, Dyer AH, Jones K, Dunne J, Mooney A, Gaffney F, et al. Persistent fatigue following SARS-CoV-2 infection is common and independent of severity of initial infection. *PLoS One.* 2020;15:e0240784.
124. Brooks SK, Webster RK, Smith LE, Woodland L, Wessely S, Greenberg N, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet.* 2020;395:912-20.

125. Tansey CM, Louie M, Loeb M, Gold WL, Muller MP, de Jager J, et al. One-year outcomes and health care utilization in survivors of severe acute respiratory syndrome. *Arch Intern Med.* 2007;167:1312-20.
126. Lam MH, Wing YK, Yu MW, Leung CM, Ma RC, Kong AP, et al. Mental morbidities and chronic fatigue in severe acute respiratory syndrome survivors: long-term follow-up. *Arch Intern Med.* 2009;169:2142-7.
127. Haberman RH, Castillo R, Chen A, Yan D, Ramirez D, Sekar V, et al. COVID-19 in Patients With Inflammatory Arthritis: A Prospective Study on the Effects of Comorbidities and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Clinical Outcomes. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72:1981-9.
128. Hassen LM, Almaghlouth IA, Hassen IM, Daghestani MH, Almohisen AA, Alqurtas EM, et al. Impact of COVID-19 outbreak on rheumatic patients' perceptions and behaviors: A cross-sectional study. *Int J Rheum Dis.* 2020;23:1541-9.
129. Disser NP, De Micheli AJ, Schonk MM, Konnaris MA, Piacentini AN, Edon DL, et al. Musculoskeletal Consequences of COVID-19. *J Bone Joint Surg Am.* 2020;102:1197-204.
130. Namiranian P, Razavi SZE, Karimi M, Ayati MH. Avascular Necrosis in Patients Recovering from COVID-19. *Am J Med Sci.* 2021;362:331-2.
131. Tang C, Wang Y, Lv H, Guan Z, Gu J. Caution against corticosteroid-based COVID-19 treatment. *Lancet.* 2020;395:1759-60.
132. Barker-Davies RM, O'Sullivan O, Senaratne KPP, Baker P, Cranley M, Dharm-Datta S, et al. The Stanford Hall consensus statement for post-COVID-19 rehabilitation. *Br J Sports Med.* 2020;54:949-59.
133. Panda M, Dash S, Behera B, Sil A. Dermatological Manifestations Associated with COVID-19 Infection. *Indian J Dermatol.* 2021 ;66:237-45.
134. Aksoy H, Yıldırım UM, Ergen P, Gürel MS. COVID-19 induced telogen effluvium. *Dermatol Ther.* 2021;34:e15175.

135. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:259-60.
136. Perez-Bermejo JA, Kang S, Rockwood SJ, Simoneau CR, Joy DA, Silva AC, et al. SARS-CoV-2 infection of human iPSC-derived cardiac cells reflects cytopathic features in hearts of patients with COVID-19. *Sci Transl Med.* 2021;13:eabf7872.
137. Puntmann VO, Carerj ML, Wieters I, Fahim M, Arendt C, Hoffmann J, et al. Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5:1265-73.
138. Rajpal S, Tong MS, Borchers J, Zareba KM, Obarski TP, Simonetti OP, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance Findings in Competitive Athletes Recovering From COVID-19 Infection. *JAMA Cardiol.* 2021;6:116-8.
139. Raj SR, Arnold AC, Barboi A, Claydon VE, Limberg JK, Lucci VM, et al. Long-COVID postural tachycardia syndrome: an American Autonomic Society statement. *Clin Auton Res.* 2021;31:365-8.
140. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020;369:50-4.
141. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158:1831-3.e3.
142. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020;159:81-95.

143. Mao R, Liang J, Shen J, Ghosh S, Zhu LR, Yang H, et al. Implications of COVID-19 for patients with pre-existing digestive diseases. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:425-7.
144. Liang L, Yang B, Jiang N, Fu W, He X, Zhou Y, et al. Three-month Follow-up Study of Survivors of Coronavirus Disease 2019 after Discharge. *J Korean Med Sci.* 2020;35:e418.
145. Aggarwal K, Agarwal A, Jaiswal N, Dahiya N, Ahuja A, Mahajan S, Tong L, Duggal M, Singh M, Agrawal R, Gupta V. Ocular surface manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020 Nov 5;15(11):e0241661. doi: 10.1371/journal.pone.0241661. PMID: 33151999; PMCID: PMC7643964.
146. Bilbao-Malavé V, González-Zamora J, Saenz de Viteri M, de la Puente M, Gándara E, Casablanca-Piñera A, et al. Persistent Retinal Microvascular Impairment in COVID-19 Bilateral Pneumonia at 6-Months Follow-Up Assessed by Optical Coherence Tomography Angiography. *Biomedicines.* 2021;9:502.
147. Fancello V, Hatzopoulos S, Corazzi V, Bianchini C, Skarżyńska MB, Pelucchi S, et al. SARS-CoV-2 (COVID-19) and audio-vestibular disorders. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2021;35:20587384211027373.
148. Von Weyhern CH, Kaufmann I, Neff F, Kremer M. Early evidence of pronounced brain involvement in fatal COVID-19 outcomes. *Lancet.* 2020 ;395:e109.
149. Lukiw WJ, Pogue A, Hill JM. SARS-CoV-2 Infectivity and Neurological Targets in the Brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2022;42:217-24.
150. Needham EJ, Chou SH, Coles AJ, Menon DK. Neurological Implications of COVID-19 Infections. *Neurocrit Care.* 2020;32:667-71.
151. Yong SJ. Persistent Brainstem Dysfunction in Long-COVID: A Hypothesis. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12:573-80.

152. Otte MS, Eckel HNC, Poluschkin L, Klussmann JP, Luers JC. Olfactory dysfunction in patients after recovering from COVID-19. *Acta Otolaryngol.* 2020;140:1032-5.
153. Fjaeldstad AW. Prolonged complaints of chemosensory loss after COVID-19. *Dan Med J.* 2020;67:A05200340.
154. Choudhry AA, Shahzeen F, Choudhry SA, Batool N, Murtaza F, Dilip A, et al. Impact of COVID-19 Infection on Quality of Sleep. *Cureus.* 2021;13:e18182.
155. Rogers JP, Chesney E, Oliver D, Pollak TA, McGuire P, Fusar-Poli P, et al. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. *Lancet Psychiatry.* 2020;7:611-27.
156. Taquet M, Geddes JR, Husain M, Luciano S, Harrison PJ. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry.* 2021;8:416-27.
157. Kaseda ET, Levine AJ. Post-traumatic stress disorder: A differential diagnostic consideration for COVID-19 survivors. *Clin Neuropsychol.* 2020;34:1498-514.
158. Lorkiewicz P, Waszkiewicz N. Biomarkers of Post-COVID Depression. *J Clin Med.* 2021;10:4142.
159. Ruggeri RM, Campenni A, Siracusa M, Frazzetto G, Gullo D. Subacute thyroiditis in a patient infected with SARS-COV-2: an endocrine complication linked to the COVID-19 pandemic. *Hormones (Athens).* 2021;20:219-21.
160. Brancatella A, Ricci D, Viola N, Sgrò D, Santini F, Latrofa F. Subacute Thyroiditis After Sars-COV-2 Infection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:dga276.

161. Murugan AK, Alzahrani AS. SARS-CoV-2: Emerging Role in the Pathogenesis of Various Thyroid Diseases. *J Inflamm Res.* 2021;14:6191-221.
162. Battisti S, Napoli N, Pedone C, Lombardi M, Leanza G, Tramontana F, et al. Vertebral fractures and mortality risk in hospitalised patients during the COVID-19 pandemic emergency. *Endocrine.* 2021;74:461-9.
163. Fagni F, Simon D, Tascilar K, Schoenau V, Sticherling M, Neurath MF, et al. COVID-19 and immune-mediated inflammatory diseases: effect of disease and treatment on COVID-19 outcomes and vaccine responses. *Lancet Rheumatol.* 2021;3:e724-e736.
164. Pablos JL, Abasolo L, Alvaro-Gracia JM, Blanco FJ, Blanco R, Castrejón I, et al. Prevalence of hospital PCR-confirmed COVID-19 cases in patients with chronic inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2020;79:1170-3.
165. Haberman RH, Castillo R, Chen A, Yan D, Ramirez D, Sekar V, et al. COVID-19 in Patients With Inflammatory Arthritis: A Prospective Study on the Effects of Comorbidities and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Clinical Outcomes. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72:1981-9.
166. Thompson EJ, Williams DM, Walker AJ, Mitchell RE, Niedzwiedz CL, Yang TC, et al. Risk factors for long COVID: analyses of 10 longitudinal studies and electronic health records in the UK. *medRxiv* 2021.06.24.21259277
167. Sudre CH, Murray B, Varsavsky T, Graham MS, Penfold RS, Bowyer RC, et al. Attributes and predictors of long COVID. *Nat Med.* 2021;27:626-31.
168. Poyraz BÇ, Poyraz CA, Olgun Y, Gürel Ö, Alkan S, Özdemir YE, et al. Psychiatric morbidity and protracted symptoms after COVID-19. *Psychiatry Res.* 2021;295:113604.
169. Dennis A, Wamil M, Alberts J, Oben J, Cuthbertson DJ, Wootton D, et al. Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open.* 2021;11:e048391.

170. Townsend L, Dowds J, O'Brien K, Sheill G, Dyer AH, O'Kelly B, et al. Persistent Poor Health after COVID-19 Is Not Associated with Respiratory Complications or Initial Disease Severity. *Ann Am Thorac Soc.* 2021;18:997-1003.
171. Stavem K, Ghanima W, Olsen MK, Gilboe HM, Einvik G. Persistent symptoms 1.5-6 months after COVID-19 in non-hospitalised subjects: a population-based cohort study. *Thorax.* 2021;76:405-7.
172. Halpin SJ, McIvor C, Whyatt G, Adams A, Harvey O, McLean L, et al. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation. *J Med Virol.* 2021;93:1013-22.
173. Raman B, Cassar MP, Tunnicliffe EM, Filippini N, Griffanti L, Alfaro-Almagro F, et al. Medium-term effects of SARS-CoV-2 infection on multiple vital organs, exercise capacity, cognition, quality of life and mental health, post-hospital discharge. *EClinicalMedicine.* 2021;31:100683.
174. Valent A, Dudoignon E, Ressaire Q, Dépret F, Plaud B. Three-month quality of life in survivors of ARDS due to COVID-19: A preliminary report from a French academic centre. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2020;39:740-1.
175. Moreno-Pérez O, Merino E, Leon-Ramirez JM, Andres M, Ramos JM, Arenas-Jiménez J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study. *J Infect.* 2021;82:378-83.
176. Marvisi M, Ferrozzi F, Balzarini L, Mancini C, Ramponi S, Uccelli M. First report on clinical and radiological features of COVID-19 pneumonitis in a Caucasian population: Factors predicting fibrotic evolution. *Int J Infect Dis.* 2020;99:485-8.
177. Liao B, Liu Z, Tang L, Li L, Gan Q, Shi H, et al. Longitudinal clinical and radiographic evaluation reveals interleukin-6 as an indicator of persistent pulmonary injury in COVID-19. *Int J Med Sci.* 2021;18:29-41.

178. Simani L, Ramezani M, Darazam IA, Sagharichi M, Aalipour MA, Ghorbani F, et al. Prevalence and correlates of chronic fatigue syndrome and post-traumatic stress disorder after the outbreak of the COVID-19. *J Neurovirol.* 2021;27:154-9.
179. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. *China Lancet.* 2020;395:497–506.
180. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;50:54-67.
181. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020;26:1200–4.
182. Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild COVID-19. *N Engl J Med.* 2020;383:1085–7.
183. Duysburgh E, Mortgat L, Barbezange C, Dierick K, Fischer N, Heyndrickx L, et al. Persistence of IgG response to SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis.* 2021;21:163–4.
184. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiol.* 2020;5:1598–607.
185. Masiá M, Fernández-González M, Padilla S, Ortega P, García JA, Agulló V, et al. Impact of interleukin-6 blockade with tocilizumab on SARS-CoV-2 viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19: A prospective cohort study. *EBioMedicine* 2020; 60:102999.

186. Cao WC, Liu W, Zhang PH, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med.* 2007;357:1162–3.
187. Forthal DN. Functions of Antibodies *Microbiol Spectr.* 2014;2:1–17.
188. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity.* 2008;28:833-46.
189. Bunk S, Sigel S, Metzdorf D, Sharif O, Triantafilou K, Triantafilou M, et al. Internalization and coreceptor expression are critical for TLR2-mediated recognition of lipoteichoic acid in human peripheral blood. *J Immunol.* 2010;185:3708–17.
190. Fernandez N, Renedo M, Alonso S, Crespo MS. Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the FcγR and the complement receptor 3 pathways. *J Biol Chem.* 2003;278:52179-87.
191. E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:43-56.
192. Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell.* 2020;183:143-57.e13.
193. Cervia C, Zurbuchen Y, Taeschler P, Ballouz T, Menges D, Hasler S, et al. Immunoglobulin signature predicts risk of post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Commun.* 2022;13:446.
194. Moura AD, da Costa HHM, Correa VA, de S Lima AK, Lindoso JAL, De Gaspari E, et al. Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Sci Rep.* 2021;11:17642.
195. Siemińska I, Węglarczyk K, Surmiak M, Kurowska-Baran D, Sanak M, Siedlar M, et al. Mild and Asymptomatic COVID-19 Convalescents Present

- Long-Term Endotype of Immunosuppression Associated With Neutrophil Subsets Possessing Regulatory Functions. *Front Immunol.* 2021;12:748097.
196. Truong TT, Ryutov A, Pandey U, Yee R, Goldberg L, Bhojwani D, et al. Persistent SARS-CoV-2 infection and increasing viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity. *EBioMedicine.* 2021;67:103355.
197. Seeßle J, Waterboer T, Hippchen T, Simon J, Kirchner M, Lim A, et al. Persistent symptoms in adult patients one year after COVID-19: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2021: ciab611. Epub ahead of print.
198. Peluso MJ, Thomas IJ, Munter SE, Deeks SG, Henrich TJ. Lack of Antinuclear Antibodies in Convalescent COVID-19 Patients with Persistent Symptoms. *Clin Infect Dis.* 2021:ciab890. Epub ahead of print.
199. Phetsouphanh C, Darley DR, Wilson DB, Howe A, Munier CML, Patel SK, et al. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01113-x>
200. Kratzer B, Trapin D, Ettl P, Kormoczi U, Rottal A, Tuppy F, et al. Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy.* 2021;76:751- 65.
201. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 9452-7.
202. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004; 21: 357–66.
203. Ausiello CM, Urbani F, la Sala A, Funaro A, Malavasi F. CD38 ligation induces discrete cytokine mRNA expression in human cultured lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1995;25:1477-80.

204. Rojas M, Rodríguez Y, Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Camacho B, Gallo JE, et al. Convalescent plasma in Covid-19: possible mechanisms of action. *Autoimmun Rev* 2020; 19:102554.
205. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:1015-27.
206. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:238–51.
207. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Astudillo MG, Yang D, Miller TE, Feldman J, et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*. 2021;184:476–88.
208. Lee AM, Wong JG, McAlonan GM, Cheung V, Cheung C, Sham PC, et al. Stress and psychological distress among SARS survivors 1 year after the outbreak. *Can J Psychiatry*. 2007;52:233-40.
209. Hall J, Myall K, Lam JL, Mason T, Mukherjee B, West A, et al. Identifying patients at risk of post-discharge complications related to COVID-19 infection. *Thorax*. 2021;76:408-11.
210. Hosey MM, Needham DM. Survivorship after COVID-19 ICU stay. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6:60.

10. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

10. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Title: Antibody response to SARS-CoV-2 is associated with long-term clinical outcome in patients with COVID-19: A longitudinal study.

Authors: Javier García-Abellán^{1*}, Sergio Padilla^{1,2*}, Marta Fernández-González¹, José A. García³, Vanesa Agulló¹, María Andreo¹, Sandra Ruiz⁴, Antonio Galiana⁵, Félix Gutiérrez^{1,2#}, Mar Masiá^{1,2#}

Affiliations:

1 Internal Medicine and Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain.

2 Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain.

3 Statistics, Operational Research Center, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain.

4 Section of Respiratory Medicine, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain.

5 Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain.

*Javier García-Abellán and Sergio Padilla contributed equally to the work.

#Félix Gutiérrez and Mar Masiá contributed equally to the work

ABSTRACT

Background: The relationship of host immune response and viral replication with health outcomes in patients with COVID-19 remains to be defined. We aimed to characterize the medium and long-term clinical, virological, and serological outcomes after hospitalization for COVID-19, and to identify predictors of long-COVID.

Methods: Prospective, longitudinal study conducted in COVID-19 patients confirmed by RT-PCR. Serial blood and nasopharyngeal samples (NPS) were obtained for measuring SARS-CoV-2 RNA and S-IgG/N-IgG antibodies during hospital stay, and at 1, 2 and 6 months post-discharge. Genome sequencing was performed where appropriate. Patients filled out a COVID19-symptom-questionnaire (CSQ) at 2-month and 6-month visits, and those with highest scores were characterized.

Results: Of 146 patients (60% male, median age 64 years) followed-up, 20.6% required hospital readmission and 5.5% died. At 2-months and 6-months, 9.6% and 7.8% patients, respectively, reported moderate/severe persistent symptoms. SARS-CoV-2 RT-PCR was positive in NPS in 11.8% (median Ct=38) and 3% (median Ct=36) patients at 2-months and 6-months, respectively, but no reinfections were demonstrated. Antibody titers gradually waned, with seroreversion occurring at 6 months in 27 (27.6%) patients for N-IgG and in 6 (6%) for S-IgG. Adjusted 2-month predictors of the highest CSQ scores (OR [95%CI]) were lower peak S-IgG (0.80 [0.66-0.94]) and higher WHO-severity-score (2.57 [1.20-5.86]); 6-month predictors were lower peak S-IgG (0.89 [0.79-0.99]) and female sex (2.41 [1.20-4.82]); no association was found with prolonged viral RNA shedding.

Conclusions: Long-COVID is associated with weak anti-SARS-CoV-2 antibody response, severity of illness and female gender. Late clinical events and persistent

symptoms in the medium and long term occur in a significant proportion of patients hospitalized for COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, long COVID, antibody response, viral shedding.

INTRODUCTION

One year after the COVID-19 outbreak was first described [1], several questions about the disease remain to be answered. In contrast to the initial phases [2], long-term data following SARS-CoV-2 infection are limited. Dynamics of SARS-CoV-2 in the long-term, including the persistence of viral shedding, the incidence of late viral rebounds or reinfections, and their relationship with the clinical evolution of patients have not been defined. From the immunological perspective, another relevant question refers to the durability of the antibody response, and the impact of the intensity and duration of response on patients' outcomes. In a significant proportion of patients, symptoms persist after hospital discharge for more than 2 months, which has been defined as long-COVID [3-5]. In addition to a more comprehensive characterization of the syndrome, the pathogenic mechanisms involved, including the role of viral shedding and the antibody kinetics, need to be determined. Acute respiratory distress induced by SARS-CoV-2 has been associated with persistent inflammation and pro-coagulation [6], which might potentially contribute to incomplete recovery, but the kinetics of inflammation and coagulation biomarkers after prolonged follow-up have not been disclosed.

We have longitudinally followed a cohort of patients hospitalized with COVID-19 who have been thoroughly investigated over a 6-month period after discharge. Our objective was to characterize the medium and long-term clinical, virological, and immunological outcomes, and to identify evolutionary trajectories and predictors of long-COVID.

METHODS

Study design, patients and study procedures

This prospective, longitudinal study was carried out at Hospital General Universitario de Elche, Spain. All patients admitted for COVID-19 between March 10th and June 30th, 2020, were included in the analysis and were followed-up until 31st December, 2020, the administrative censoring date of the study dataset. Cases included in the study were microbiologically confirmed through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) from nasopharyngeal swab samples in most cases and from fecal samples in 8.

Hospitalized COVID-19 patients were managed according to a predefined local protocol that included the diagnostic and therapeutic procedures during hospital stay [7]. This protocol consisted on the standardized collection of clinical variables and serial blood and nasopharyngeal sampling, obtained at different time-points during hospital stay for biochemical and sero-virological measurements.

Once discharged, patients' follow-up was centralized at the Infectious Diseases Unit Outpatients' clinic. Like other authors [8] we have focused on two periods of the post-acute COVID-19 timeline, the ongoing symptomatic COVID-19, which includes symptoms and abnormalities present from 4–12 weeks beyond acute COVID-19, and the post-COVID-19 syndrome, which includes symptoms and abnormalities persisting or present beyond 12 weeks of the onset of acute COVID-19. Accordingly, face-to-face visits were scheduled in the ongoing symptomatic COVID-19 period (one and two months visits, herein also “mid-term”) and in the post-COVID-19 period (six-month visits, herein also “long-term”) after discharge. On each visit, blood and nasopharyngeal

samples were obtained for biochemical and sero-virological measurements (Figure S-1). Phone and face-to-face visits not foreseen in the protocol were also appointed at the patients' request.

At 2-month and 6-month visits, patients were offered to fill out a self-administered, self-rated COVID-19 symptom questionnaire (CSQ, Annex 1) in which they had to grade 11 items using a 10-point increasing intensity scale (0=absence of the symptom and 10=the maximum perceived intensity of the symptom). To characterize the persistence of symptoms, and as a test for robustness, we defined three different categories of the CSQ score: a score of at least one point (any symptom-CSQ); a score equal or more than the median (median-CSQ); a score above the third quartile (highest CSQ score) in any of the CSQ items. Scores were also classified into mild (1-4 points), moderate (5-7 points) and severe (8-10 points) categories.

In patients who missed scheduled appointments, an attempt was made to contact them by phone and their electronic medical records were carefully scrutinized to ensure the vital status of the patients. Hospital readmissions occurring during the 6-month follow up period were reviewed and recorded in the dataset.

SARS-CoV-2 RNA and antibody measurements.

RT-PCR analysis for SARS-CoV-2 was performed by means of a commercially available kit (Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, Korea) which targeted the E, RdRP,

and N genes. Suspected SARS-CoV-2 reinfection was defined according to the CDC criteria [9]. Briefly, subjects with detected SARS-CoV-2 RNA more than 90 days after the first detection of SARS-CoV-2 RNA, whether or not symptoms were present, and if detected by RT-PCR, only considering if Ct value was less than 33 or if Ct value was unavailable. Genome sequencing of SARS-CoV-2 was performed on NPS samples following ARTIC amplicon sequencing protocol for MinIon version V3 (see Supplementary material for full description). IgG antibody plasma levels against the SARS-CoV-2 internal nucleocapsid (N) protein (N-IgG) (Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Germany) and surface S1 domain of the spike protein (S-IgG) (Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA, Euroimmun, Lubeck, Germany) were measured using commercial semi-quantitative EIA kits in an automated instrument (Dynex DS2® ELISA system). More procedures details can be found elsewhere [7].

Statistical analyses

Continuous variables are expressed as median \pm 25th and 75th percentiles (Q1, Q3), and categorical variables as percentages. Wilcoxon or Student's t-test were used to compare continuous variables, and the chi-square or Fisher's exact test for categorical variables comparison among patients with and without persistent symptoms. To compare the curves of viral load, antibody levels and biomarkers between groups, generalized additive mixed models were used. Interpolations in the graphs were carried out with cubic splines. Covariates with a p-value <0.05 in the crude comparison between groups and clinical relevant variables were included in multivariate analyses. Binomial logistic regression models were used to identify predictors of persistence of symptoms at 2 and 6 months. A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to find the most

discriminative serum level of anti-SARS-CoV-2 antibodies predicting persistence of symptoms. Statistical analysis was performed using R-project version 3.6.2.

RESULTS

Patient's characteristics

A total of 162 patients were hospitalized with SARS-CoV-2 infection, 23 (14%) were admitted to the ICU and 12 (7.4%) died during hospital stay. After hospital discharge, 4 patients were lost to follow-up. Flow chart of patients is shown in Figure S-2. One hundred and four and 116 patients completed the SCQ at 2 and 6 months, respectively.

Baseline characteristics of the 146 included patients are shown in Table S-1. Median age was 64 years, 88 (60.3%) were male, and 72.6% had coexisting comorbid diseases. Clinical status on admission and therapy administered during hospital stay are detailed in Table S-1.

Clinical and biological outcomes

During follow-up 30 patients (20%) were readmitted to hospital (Table S-2). The most frequent reasons for hospital readmission were underlying disease exacerbation (23 events in 13 patients, 8.9%), bacterial infection (12 in 5 patients, 3.4%), thrombohemorrhagic events (9 in 9, 6.1%), and persistent COVID-19 symptoms (8 in 6, 4.1%) patients. Eight (5.5%) patients died. Detailed information of causes of in-hospital and after-discharge deaths are shown in Table S-2.

Persistent symptoms of moderate or severe intensity at the 2-month visit were observed in 9.6%, 7.4% and 2.9% patients for general, gastrointestinal and respiratory symptoms,

respectively, and in 7.8%, 4.3% and 1.0% patients, respectively, at the 6-month visit (Figure 1).

Serum inflammatory biomarkers showed an initially steep and later flatter substantial decrease during follow-up, followed by stabilization or non-significant ulterior increase. The most prominent initial decrease was observed with C-reactive protein (CRP). Temporal changes in the levels of several biomarkers throughout the study period are shown in Figure 1.

Virological outcomes

SARS-CoV-2 RNA shedding lasted a median of 13 (2.2-33.8) days in those with the last RT-PCR test negative (Table S-1), resulting in a proportion of patients who tested negative at 2-month and 6-month follow-up visits of 88% and 97%, respectively. Viral RNA shedding of low intensity was detected in some patients in subsequent nasopharyngeal tests beyond the acute phase of the disease. Thus, 40/146 (27%; median [Q1-Q3] Ct=34 [31-37]), 15/127 (11.8%; median Ct=38 [37.25-39]) and 4/134 (3.0%; median Ct=36 [36-36]) individuals tested positive at month 1, 2 and 6 visits, respectively. SARS-CoV-2 RT-PCR results during follow-up are displayed in Figure 2a. Although none of the four patients with positive SARS-CoV-2 RNA at month 6 met the criteria for reinfection [9], sequencing could be performed in three of them for whom paired stored samples were available. Patients' age ranged from 44 to 73 years, two were men and two had subjacent comorbidities (breast cancer in remission in one patient and epilepsy and mental retardation in another). Two patients received immunomodulatory therapy (high-dose corticosteroids or interferon- β -1b) during COVID-19 hospital admission. The same clade 20B (lineage B.1.1) was present in all cases (see Figure S-3 for phylogenetic

assignment of the samples and current notable variants). In two patients, the clade showed the same hallmark single nucleotide variants (individuals #88 and #95, Table S-3), and in the third patient, two new mutations were detected in the most recent sample (a K374R substitution in the N gene and an A222V substitution in the S gene), probably developed due to persistent infection.

Serological outcomes

Median [Q1-Q3] time from illness onset to seropositivity was 12 (8-15) days. Peak S-IgG was significantly higher compared to N-IgG (median 5.9 vs 4.1 absorbance/cut-off [S/CO]; $p < 0.001$, respectively) (Table S-1). Figure 2b shows S-IgG and N-IgG S/CO values of all determinations of the study patients over time.

Antibody titers gradually waned, and 29 (28.7%) patients became seronegative for either N-IgG or S-IgG during follow-up: 23 for N-IgG alone, 2 for S-IgG alone, and 4 for both N-IgG and S-IgG. The majority of cases of seroreversion were observed at the 6-month visit (25/29 [86.2%] patients).

Characterization and predictors of short-term persistence of symptoms.

A significant number (76 [73%]) of patients scored any symptom-CSQ, being fatigue (54.8%), myalgia (30.8%), dyspnoea (26.9%) and cough (25%) the most frequent. The most frequent symptoms reported by patients with the highest CSQ scores were fatigue (12.5%), myalgia (7.6%) and dyspnoea (6.7%).

Table 1 shows the characteristics of the patients with the highest CSQ scores at 2 months. In the univariate analysis, they were more frequently active smokers ($p=0.013$), had more frequently bilateral lung infiltrates ($p=0.015$), exhibited at hospital admission lower baseline ferritin levels ($p=0.002$), a trend to lower CRP ($p=0.055$) and had received less frequently tocilizumab ($p=0.013$) during the acute episode of COVID-19.

No differences were found between groups in the Ct values on admission (E-gene, 29.1 [26.5-32.8] vs 29.7 [26.2-34.3]; $p=0.909$), time to first negative RT-PCR results (8 vs 13 days; $P=0.237$), the proportion of individuals who tested positive beyond 1-month (19% vs 35%; $p=0.174$) and 2-month (7.4% vs 16.8%; $p=0.375$) visits (Table 1), and in the Ct values at 1-month (E-gene, 35 [33.0-36.0] vs 36 [31.5-37.5]; $p=0.754$) or 2-month (E-gene, 38.5 [38.2-38.8] vs 38.0 [37.0-39.0]; $p=1.000$) visits.

There was a weaker antibody response against SARS-CoV-2 in the highest CSQ scores group, consisting of a longer time to either S-IgG or N-IgG seroconversion from illness onset (median 16 vs 11 days; $p=0.012$), a flatter slope ($+0.4$ [0-0.5] vs $+1.0$ [0.5-3.2] change in S/CO per day; $p<0.001$) until reaching peak levels, and lower peak S-IgG value (4.1 vs 6.4 S/CO; $p=0.002$) (Table 1 and Figure 3). Accordingly, fewer patients within the highest CSQ scores showed seroconversion at 2 months for S-IgG and for N-IgG (55.6% vs 86.7%; $p=0.002$).

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that a SARS-CoV-2 S-IgG value below 5.4 S/CO at 1-month post-discharge predicted the highest CSQ scores at 2 months with an AUC [CI 95%] of 0.66 [0.54-0.79] (Figure S-4).

A differential profile in the dynamics of CRP levels was observed according to group, with a trend to lower levels at baseline in individuals with highest CSQ scores, and subsequent inversion in the trend at 1-month and 2-month visits (Figure 3 and Table 1). Baseline ferritin levels were higher in the group with highest CSQ scores. No differences were found in other inflammatory biomarkers among groups.

In the multivariate logistic regression analysis including age, sex, Charlson comorbidity index, WHO severity ordinal scale score, peak S-IgG values, testing positive for SARS-CoV-2 RT-PCR at 1-month visit and tocilizumab use, we found that a lower peak in SARS-CoV-2 S-IgG value (OR [95% CI] 0.80 [0.66-0.94]), and a higher WHO severity scale score (2.57 [1.20-5.86] per point increase) were independent predictors of the highest CSQ scores at 2-months after discharge (Figure 4a). Sensitivity analyses with the outcomes median-CSQ score or any symptom-CSQ showed similar trends (Figure S-5 a-b).

Characterization and predictors of long-term persistence of symptoms.

One hundred and sixteen individuals, including 85 who also had completed the survey at two months, voluntarily agreed to fill out the CSQ at the 6-month visit. The most frequent symptoms reported by patients with the highest CSQ scores were fatigue (10.3%), myalgia (6.9%), dyspnoea (4.3%), cough (4.3%) and nasal congestion (4.3%).

Patients with the highest CSQ scores showed lower CRP levels on admission and a trend to lower peak S-IgG value (Table 1).

In the multivariate logistic regression analysis including the same variables as in 2-month visit, a lower peak in SARS-CoV-2 S-IgG (OR [95% CI] 0.89 [0.79-0.99]) and female sex (2.41 [1.20-4.82]) were predictors of the highest CSQ scores at the 6-month visit (Figure 4b). Sensitivity analyses with median-CSQ score and any symptom-CSQ showed similar trends (Figure S-5 c-d).

DISCUSSION

In this closely followed-up cohort evaluating the clinical, serological and virological outcomes of patients admitted to hospital for COVID-19 during a 6-month period, we observed a high frequency of clinical events following hospital discharge. Most of these events were related to patients' underlying comorbidities, secondary bacterial infections and recurrence or complications associated with COVID-19, including thrombohemorrhagic events. A proportion of patients reported persistent symptoms in the medium (2-month) and half of them in the long-term (6-month). Chronic persistence of symptoms was associated with a distinct serological, inflammatory and clinical profile, which differed according to duration of symptoms. Patients with the highest CSQ scores both in the mid-term and long-term exhibited a weaker initial antibody response and lower inflammation during the acute phase of the disease. Lasting symptoms in the mid-term were associated with persistent inflammation at months 1 and 2 after discharge and higher WHO severity score. Female sex predicted long-term complaints.

Patients included in this longitudinal study were comprehensively monitored. From the virological perspective, after a median duration of viral shedding of around two weeks, we found evidence of prolonged viral replication, as shown by persistent RT-PCR test positivity (or re-positivity) two months after discharge in 12% of the patients, but only four cases had a RT-PCR positive in the very late phases of follow-up. Interestingly, most

patients with late RT-PCR positivity had high Ct values, and none of them fulfilled the CDC criteria for potential reinfection [9]. Moreover, genotypic sequencing confirmed the same clade in all analyzed samples, suggesting that they represented persistent infection/reactivation.

S-IgG antibodies reached higher titers, followed by a gradual decline of both S-IgG and N-IgG. Seroreversion was observed for N-IgG titers in more than one fourth of patients at 6 months after discharge, but it was infrequent with the potentially neutralizing S-IgG antibodies, which implies a durable antibody response in patients with severe COVID requiring hospitalization, in contrast to the rapid waning of antibodies reported in patients with mild COVID [10-12]. Severity of disease has actually been associated with the magnitude and duration of the antibody response [13].

While long-COVID is increasingly being described after acute infection, the pathogenesis and duration of this multifaceted syndrome remain unknown. Data about long-COVID with such a lengthy follow-up are very scarce [14]. Our data suggest an involvement of the antibody response in the occurrence of long-COVID. The highest CSQ scores in the medium and long term were associated with a lower peak of S-IgG, and in patients with mid-term symptoms a delayed antibody response was additionally observed, the latter also showing to be a predictor of the highest CSQ scores in multivariate analysis (data not shown). Experimental studies have demonstrated that, in addition to T-cell response, IgG and neutralizing antibodies are crucial to control viral infections [15,16]. Besides the antimicrobial activity, antibodies contribute to modulate the inflammatory response via the Fc-gamma receptor, toll-like receptors and activation of the complement, all of them inducing the secretion or repression of various pro-inflammatory and anti-inflammatory

mediators [17-20]. Both the antiviral and the immunomodulatory effects of antibodies might have been involved in the enhanced recovery of patients with higher antibody levels in our cohort. The protective effects of immunoglobulins are actually the basis for the use of convalescent plasma [21,22] or neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 spike protein [23] to treat patients with acute COVID-19. Unfortunately, no patient in our study was treated with convalescent plasma or neutralizing monoclonal antibodies to test this hypothesis. Monoclonal antibodies or boosting the antibody response with vaccination might be potential strategies to prevent long-COVID in patients with low antibody titers. This hypothesis warrants further research.

Post-COVID syndrome was associated with additional distinctive innate and adaptive immune traits, consisting of a weaker initial inflammatory response, as shown by lower baseline levels of CRP and ferritin. This is aligned with the poorer antibody response observed in this subset of patients, and supports the correlation described between antibody levels and inflammation biomarkers [24]. A less intense immune/inflammatory response may lead to impaired or incomplete control of viral replication and eventually greater long-term sequelae and symptoms. On the other hand, potent innate and adaptive immune responses during acute infection might potentially lead to a more efficient control of illness and lower residual inflammation and incidence of subsequent sequelae. Interestingly, patients with mid-term lasting symptoms showed persistent residual inflammation. Elevated markers of inflammation and autoimmunity have been reported in post-infectious syndromes linked with Chikungunya or Epstein-Barr viruses, or in myalgic encephalomyelitis [25-27].

Besides the immune response, demographic and clinical factors were found to be predictors of long-COVID. Long-term persistent symptoms were associated with female sex, a finding also supported by other studies [14,28]. Higher severity of disease showed to be a predictor of mid-term persistent symptoms. Severe disease and the hyperinflammatory response occurring in the late phase would be expected to induce greater organ injury, which might be associated with higher incidence of sequelae, as supported by the higher prevalence of persistent symptoms found in patients with COVID-19 admitted to the ICU [14,29]. Although post-discharge complaints have also been described in patients with milder forms of COVID, critically-ill patients have more frequently shown subjacent structural causes contributing to explain the symptoms [30], and up to 80% of them develop physical, cognitive or mental health impairments that persist beyond hospital discharge [31]. Differences in patients' characteristics and in the intensity of symptoms might have contributed to the higher degree of reversibility potentially occurring in our patients, in whom severity of disease did not show to be a predictor of long-term high-score symptoms compared to the results of Huang et al [14].

The sample size is a limitation of the study. Long-COVID is a heterogeneous syndrome and the associations found might differ according to the nature of the symptoms analyzed. We focused on subjects reporting the highest scores in the questionnaire to identify those symptoms that were more likely to be meaningful to patients and avoid overrepresentation of long-COVID cases. However, sensitivity analyses including patients with any symptom, or those with a score above the median, showed similar results. For some of the figures, the interpolation lines in certain intervals were developed with relatively low number of data. Strengths are the longitudinal design with consecutive sampling, close monitoring and thorough investigations conducted in the patients.

In conclusion, long-term follow-up of patients hospitalized for COVID shows a high frequency of clinical events after hospitalization, a durable antibody response of S-IgG, and frequent RT-PCR test positivity/re-positivity occurring beyond two months after acute infection, but with no evidence of reinfection. Persistent symptoms are common in the medium and long term. Gender, severity of illness and the immune response are associated with long-COVID, but with different implication according to the temporality of symptoms. The antibody response predicts both mid-term and long-term clinical outcomes, and consequently the use of monoclonal antibodies or boosting the antibody response with vaccination might be potential strategies to prevent long-COVID.

Declarations

Funding

FG, MM, SP and MFG were supported by RD16/0025/0038 project as a part of the Plan Nacional Research + Development + Innovation (R+D+I) and cofinanced by Instituto de Salud Carlos III – Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [grant number PI16/01740; PI18/01861; CM19/00160, CM20/00066, COV20/00005]). AG was supported by COV20/00156.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Availability of data, code and material

Data and statistical code are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval

Approval was granted by the ethics committee of Hospital General Universitario de Elche (PI 46/2020). The procedures used in this study adhere to the principles of the Declaration of Helsinki.

Consent to participate

The approval of the project by the ethics committee allowed obtaining verbal informed consent from the patient to participate in the study.

Consent for Publication

The authors consent to publish the content of this original report.

Contributions

MM and FG conceived the study. MM, FG, JGA and SP designed the study. JGA and SP collected and were responsible for the data. JAG performed the statistical analysis. MM, FG, JGA, SP, MA and SR participated in patient care, investigation, and data collection. MFG, VA, AG performed the microbiology analyses. MM, FG, JGA and SP wrote the first draft of the manuscript. All authors drafted the manuscript for important intellectual content, contributed to the revision of the final version of the manuscript, and approved the final version submitted.

REFERENCES

1. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. **2020**;382: 1199–207.
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**; 395:497-506.
3. Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med* **2021**; 27:28-33.
4. Carfi A, Bernabei R, Landi F, for the Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* **2020**; 324:603–5.
5. Garrigues E, Janvier P, Kherabi Y, Le Bot A, Hamon A, Gouze H, et al. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. *J Infect* **2020**; 81:E4-E6.
6. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* **2020**; 7:998–1002.
7. Masiá M, Fernández-González M, Padilla S, Ortega P, García JA, Agulló V, et al. Impact of interleukin-6 blockade with tocilizumab on SARS-CoV-2 viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19: A prospective cohort study. *EBioMedicine* **2020**; 60:102999.
8. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* **2021**; 27:601–15

9. Common Investigation Protocol for Investigating Suspected SARS-CoV-2 Reinfection. Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reinfection.html>. [Accessed 4 March 2021].
10. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* **2020**; 26:1200-4.
11. Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild COVID-19. *N Engl J Med* **2020**; 383:1085–7.
12. Duysburgh E, Mortgat L, Barbezange C, Dierick K, Fischer N, Heyndrickx L, et al. Persistence of IgG response to SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* **2021**; 21:163-4.
13. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiol* **2020**; 5:1598–607.
14. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet* **2021**; 397:220-32.
15. Cao WC, Liu W, Zhang PH, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med* **2007**; 357:1162–3.
16. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr* **2014**; 2:1-17.

17. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* **2008**; 28:833–46.
18. Bunk S, Sigel S, Metzdorf D, Sharif O, Triantafilou K, Triantafilou M, et al. Internalization and coreceptor expression are critical for TLR2-mediated recognition of lipoteichoic acid in human peripheral blood. *J Immunol* **2010**; 185:3708–17.
19. Fernandez N, Renedo M, Alonso S, Crespo MS. Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the FcγR and the complement receptor 3 pathways. *J Biol Chem* **2003**; 278:52179–87.
20. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov* **2010**; 9:43-56.
21. Rojas M, Rodríguez Y, Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Camacho B, Gallo JE, et al. Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action. *Autoimmun Rev* **2020**; 19:102554.
22. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N Engl J Med* 13 Jan 2021; NEJMoa2031893. Available at: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893>.
23. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* **2021**; 384:238-51.
24. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Astudillo MG, Yang D, Miller TE, Feldman J, et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* **2021**; 184:476-88.

25. Rodriguez LST, Pou C, Lakshmikanth T, Zhang J, Mugabo CH, Wang J, et al. Achieving symptom relief in patients with Myalgic encephalomyelitis by targeting the neuro-immune interface and inducing disease tolerance. *BioRxiv* [Preprint]. February 28, 2020. Available at <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.958249>.
26. Blundell S, Ray KK, Buckland M, White PD. Chronic fatigue syndrome and circulating cytokines: A systematic review. *Brain Behav Immun* **2015**; 50:186-95.
27. Guillot X, Ribera A, Gasque P. Chikungunya-induced arthritis in Reunion Island: a long-term observational follow-up study showing frequently persistent joint symptoms, some cases of persistent chikungunya immunoglobulin M positivity, and no anticyclic citrullinated peptide seroconversion after 13 years. *J Infect Dis* **2020**; 222:1740-4.
28. Lee AM, Wong JG, McAlonan GM, Cheung V, Cheung C, Sham PC, et al. Stress and psychological distress among SARS survivors 1 year after the outbreak. *Can J Psychiatry* **2007**; 52:233-40.
29. Halpin SJ, McIvor C, Whyatt G, Adams A, Harvey O, McLean L, et al. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation. *J Med Virol* **2021**; 93:1013-22.
30. Hall J, Myall K, Lam JL, Mason T, Mukherjee B, West A, et al. Identifying patients at risk of post-discharge complications related to COVID-19 infection. *Thorax* **2021**; Feb 4: thoraxjnl-2020-215861.
31. Hosey MM, Needham DM. Survivorship after COVID-19 ICU stay. *Nat Rev Dis Primers* **2020**; 6:60.

Table 1. Clinical, sero-virological variables and serum biomarkers according to the persistence of symptoms at two and six months after hospital admission for COVID-19.

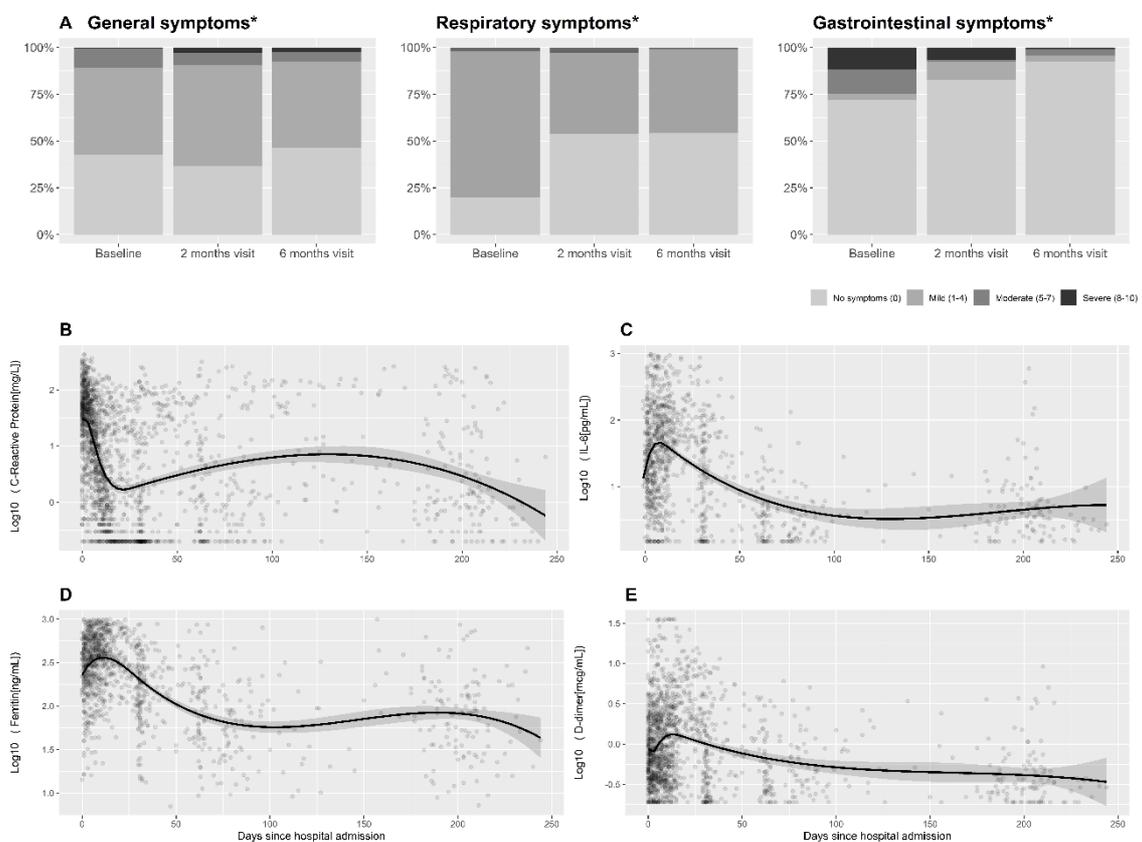
	Symptoms at 2 months				P value	Symptoms at 6 months				
	Yes*		No			Yes*		No		P value
Patients, no.	27	(26)	77	(74)	-	28	(24)	88	(76)	-
Male sex	12	(44)	51	(66)	0.066	14	(50)	55	(62.5)	0.274
Age, years	65	(55-75)	64	(53-76)	0.860	66	(56-76)	65	(54-76)	0.747
Current smoking	5	(20)	2	(3)	0.013	1	(3.8)	10	(12.2)	0.291
Comorbidity, no. (%)										
Any comorbidity#	18	(67)	52	(68)	1.000	20	(71.4)	63	(71.6)	1.000
CCI, median (Q1, Q3) points	2	(1-4)	3	(1-5)	0.793	3	(1-5)	3	(1-5)	0.718
Cardiovascular disease	6	(22.2)	14	(18.2)	0.777	6	(21.4)	20	(23)	1.000
Hypertension	5	(18.5)	23	(30)	0.319	7	(25)	20	(22.7)	0.801
Diabetes	6	(22.2)	13	(16.9)	0.568	8	(28.6)	19	(21.6)	0.451
Chronic obstructive lung disease	1	(3.7)	6	(8)	0.674	3	(10.7)	5	(5.7)	0.398
Symptoms duration, median (Q1, Q3)	6	(3-11)	8	(4-11)	0.577	7.5	(4.8-10)	7	(3-11)	0.895
No. of symptoms on admission	3	(2-4)	3	(2-4)	0.654	3	(2-5)	3	(1-4)	0.425
Maximum WHO severity score	4	(4-4)	4	(4-4)	0.578	4	(4-4)	4	(4-4)	0.844
SpO2/FIO2 on admission	354	(339-457)	350	(339-381)	0.613	350	(321-457)	350	(340-440)	0.958
Bilateral lung infiltrates in CR	19	(76)	70	(94.6)	0.015	23	(85)	74	(91.4)	0.462
Length of hospital stay, days	10	(7-14)	11	(8-14)	0.494	11	(7-14)	11	(7-16)	0.354
Admission to ICU	5	(18.5)	6	(7.8)	0.148	3	(10.7)	12	(13.6)	1.000
Treatments										
Dexamethasone /Methylprednisolone	3	(11.1)	14	(18.2)	0.549	4	(14.3)	16	(18.2)	0.778
Tocilizumab	9	(33.3)	48	(62.3)	0.013	15	(53.6)	43	(48.9)	0.829
Sero-virological features										
SARS-CoV-2 viral quantification	1726	(170-13869)	4914	(400-41608)	0.262	1481	(262-10379)	2592	(160-21023)	0.900
Time to viral clearance	8	(1-15)	13	(3.5-26.5)	0.237	8	(1-21.5)	13	(2-28)	0.511
RT-PCR SARS-CoV-2 positive, n (%)										
≥1 month	5	(18.5)	27	(35.1)	0.174	10	(35.7)	24	(27.3)	0.466
≥2 months	2	(7.4)	13	(16.8)	0.375	5	(17.9)	13	(14.8)	0.808
Time to Serconversion*	16	(11.5-28)	11	(8-13)	0.012	12	(9-16.8)	12	(8-15)	0.413
SARS-CoV-2 IgG-S										
Seropositivity at 1 month, n (%)	14	(56)	64	(86.5)	0.003	17	(68)	58	(72.5)	0.800
Seropositivity at 2 month, n (%)	15	(55.6)	65	(86.7)	0.002	17	(68)	61	(72.6)	0.801
Seropositivity at 6 month, n (%)	16	(59.3)	65	(85.5)	0.007	19	(73.1)	62	(72.9)	1.000
Peak*, serum concentration (S/CO)	4.1	(0.1-6.2)	6.4	(4.5-7.5)	0.002	5.1	(2.2-6.1)	6.3	(2.6-7.2)	0.055
Trough* serum concentration (S/CO)	3.5	(2.0-4.5)	3.8	(2.4-4.7)	0.346	3.9	(2.0-4.8)	3.7	(2.2-4.7)	0.987
SARS-CoV-2 IgG-N										
Seropositivity at 1 month, n (%)	14	(56)	64	(86.5)	0.003	17	(68)	59	(74)	0.613
Seropositivity at 2 month, n (%)	15	(55.6)	65	(86.7)	0.002	17	(68)	61	(72.6)	0.801
Seropositivity at 6 month, n (%)	16	(59.3)	65	(85.5)	0.007	19	(73)	61	(71.8)	1.000
Peak*, serum concentration (S/CO)	3.6	(0.1-5.0)	4.3	(3.5-4.9)	0.210	3.8	(1.8-4.7)	4.1	(2.6-4.8)	0.563
Trough* serum concentration (S/CO)	2.3	(1.9-2.7)	2.0	(1.4-2.6)	0.171	1.7	(1.3-2.6)	2.2	(1.5-2.7)	0.124
Inflammatory biomarkers										
Serum C-reactive protein, mg/L										
On admission	25.3	(3.5-59)	49.2	(23.2-104.3)	0.055	21.6	(2.5-45.4)	47.5	(15.3-130.6)	0.014
1 month	1.3	(0.2-12.6)	0.2	(0.2-0.8)	0.001	0.8	(0.2-4.0)	0.3	(0.2-2.4)	0.215
2 months	1.7	(0.7-10.9)	0.3	(0.2-1.0)	0.001	1.0	(0.3-4.2)	0.4	(0.2-4.8)	0.357
6 months	1.4	(0.8-9.4)	0.7	(0.3-2)	0.012	1.0	(0.7-7.2)	1.1	(0.3-3.1)	0.227
Serum IL-6, pg/mL										
On admission	15.1	(4.9-72)	27	(12-91.3)	0.193	13.5	(7.5-47.5)	28.3	(11.4-94.6)	0.099
1 month	7.7	(3.4-52.5)	19.9	(3.4-49.3)	0.682	18.1	(3.5-75.6)	13.8	(3.3-48)	0.504
2 months	4.6	(2.4-12.1)	5.5	(2.6-23.8)	0.450	5.1	(2.5-21.0)	5.8	(2.5-22.6)	0.820
6 months	3.7	(2.2-4.7)	2.9	(1.8-5.1)	0.454	3.6	(1.5-6.8)	3.1	(1.8-5.2)	0.965
Serum Ferritin, ng/mL										
On admission	164	(85-462)	398	(235-589)	0.002	193	(127-498)	358	(205-597)	0.132
1 month	129	(60-311)	181	(98-291)	0.219	100	(53-256)	195	(106-364)	0.020
2 months	66	(50.4-182.2)	126	(63-199)	0.294	58	(37-130)	140	(68-213)	0.008
6 months	57	(19-109)	77	(38-129)	0.233	53	(23-88)	76	(32-130)	0.239
Serum D-dimer, mcg/mL										
On admission	0.7	(0.4-1.5)	0.6	(0.4-1.2)	0.784	0.7	(0.4-1.3)	0.8	(0.4-1.9)	0.656
1 month	0.7	(0.3-1.7)	0.4	(0.2-0.8)	0.071	0.4	(0.3-0.8)	0.6	(0.2-1.4)	0.764
2 months	0.6	(0.3-1.4)	0.4	(0.2-0.7)	0.069	0.5	(0.3-0.8)	0.5	(0.2-0.9)	0.746
6 months	0.4	(0.3-0.7)	0.4	(0.2-0.7)	0.378	0.4	(0.3-0.8)	0.3	(0.2-0.7)	0.160
NLR										
On admission	3.5	(2.7-6.5)	5.0	(2.9-6.7)	0.536	3.6	(2.9-5.3)	5.0	(3.1-6.6)	0.076

1 month	1.8	(1.3-2.2)		1.7	(1.3-2.4)	0.758	2.0	(1.5-2.8)		1.7	(1.1-2.6)		0.163
2 months	2.0	(1.5-2.6)		1.7	(1.3-2.3)	0.326	2.2	(1.3-2.8)		1.8	(1.3-2.4)		0.310
6 months	2.1	(1.7-3.2)		1.9	(1.5-2.3)	0.160	2.0	(1.8-2.6)		2.0	(1.4-2.7)		0.338

*Patients were allocated in the symptomatic group if the score on any of the symptoms in CSQ was in the top quartile of these symptoms' group scores. #This category included at least one of the following: diabetes, cardiovascular (including hypertension) respiratory, kidney, neurological disease, cirrhosis or malignant neoplasm. & From illness onset and considering either S-IgG or N-IgG. CSQ, Covid-19 symptoms questionnaire; CCI, Charlson Comorbidity Index score; SpO2/FIO2, Pulse oximetry saturation to fraction of inspired oxygen ratio; CR, Chest radiography; ICU, Intensive care unit; Q1, first quartile; Q3, third quartile; S/CO, absorbance/cut-off; IL-6, Interleukin-6; NLR, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio. Summary statistics are provided as medians with interquartile ranges or numbers with percentages as appropriate.

FIGURES.

Figure 1. Temporal changes in symptom scores and serum levels of biomarkers during follow-up. Panel A shows the scores of self-reported general, respiratory and gastrointestinal symptoms included in the COVID-19 symptoms questionnaire at baseline, two months and six months. Panels B-E represent the temporal changes in the serum levels of C-reactive protein (Panel B), interleukin-6 (Panel C), ferritin (Panel D) and D-dimer (Panel E) since COVID-19 diagnosis.

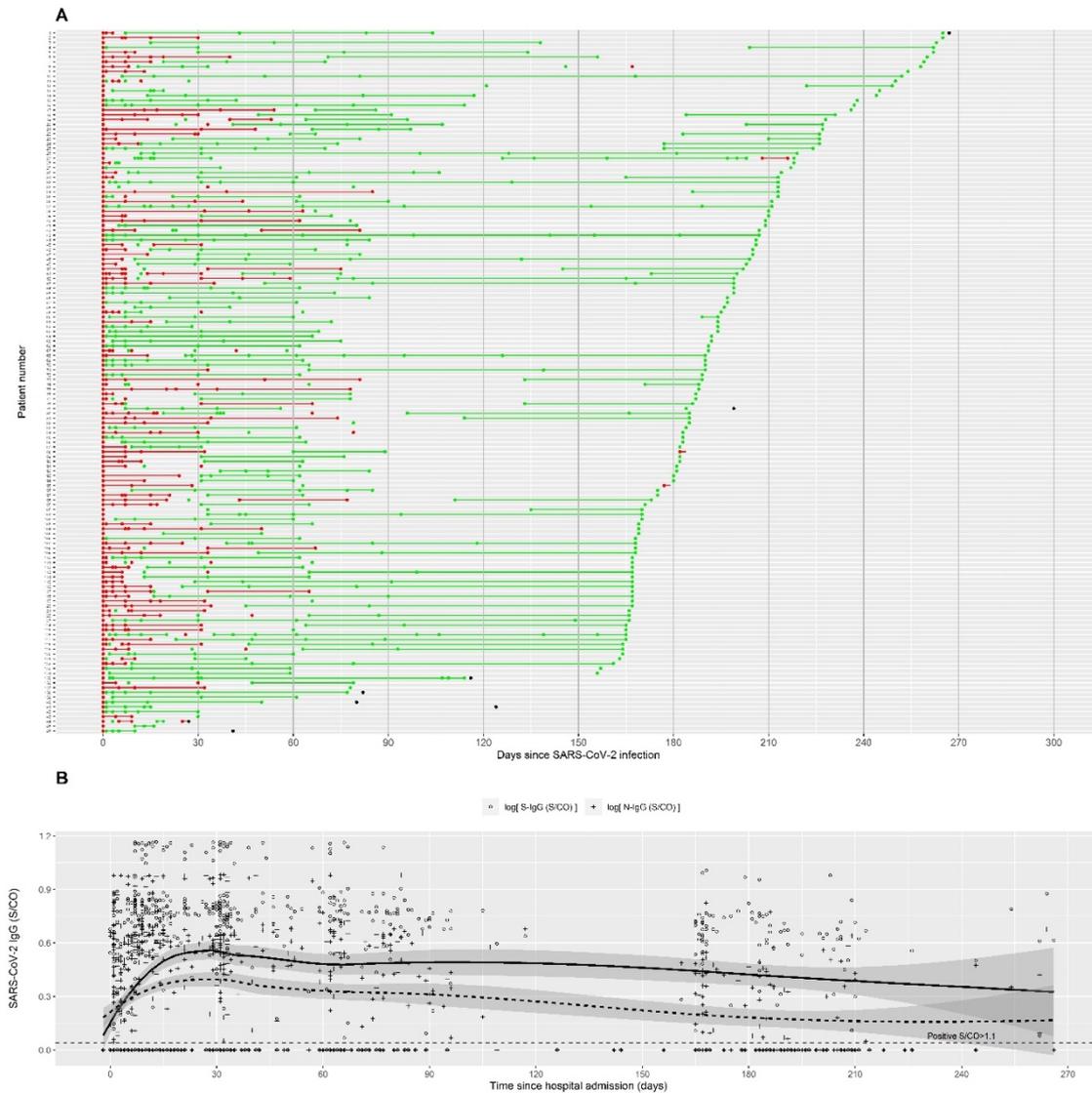


Panel A: General symptoms include fatigue, myalgia, sweating, headache; respiratory symptoms include cough, difficulty breathing, nasal congestion, sore throat, anosmia; gastrointestinal symptoms include diarrhea, vomiting, abdominal pain. *Pearson's Chi-squared test P-value <0.05. **Panels B-E:** Each dot represents a serum biomarker value in an individual subject since hospital admission, with interpolation line and 90% confidence interval. Biomarkers normal ranges: C-reactive protein, below 5 mg/L; IL-6,

below 7 pg/mL; ferritin, normal ranges values depend on patient's sex and age (17-464 ng/mL for men older than 20 years and 6-137 ng/mL and 11-264 ng/mL for women between 20-50 and older than 50 years old, respectively); D-dimer, below 0.5 µg/mL.

Abbreviations: IL-6, interleukin-6.

Figure 2. SARS-CoV-2 sero-virological changes during follow up. Panel A: SARS-CoV-2 RT-PCR test results during follow-up in the entire cohort. Panel B: Temporal changes in anti-SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike protein and nucleocapsid protein IgG antibodies.

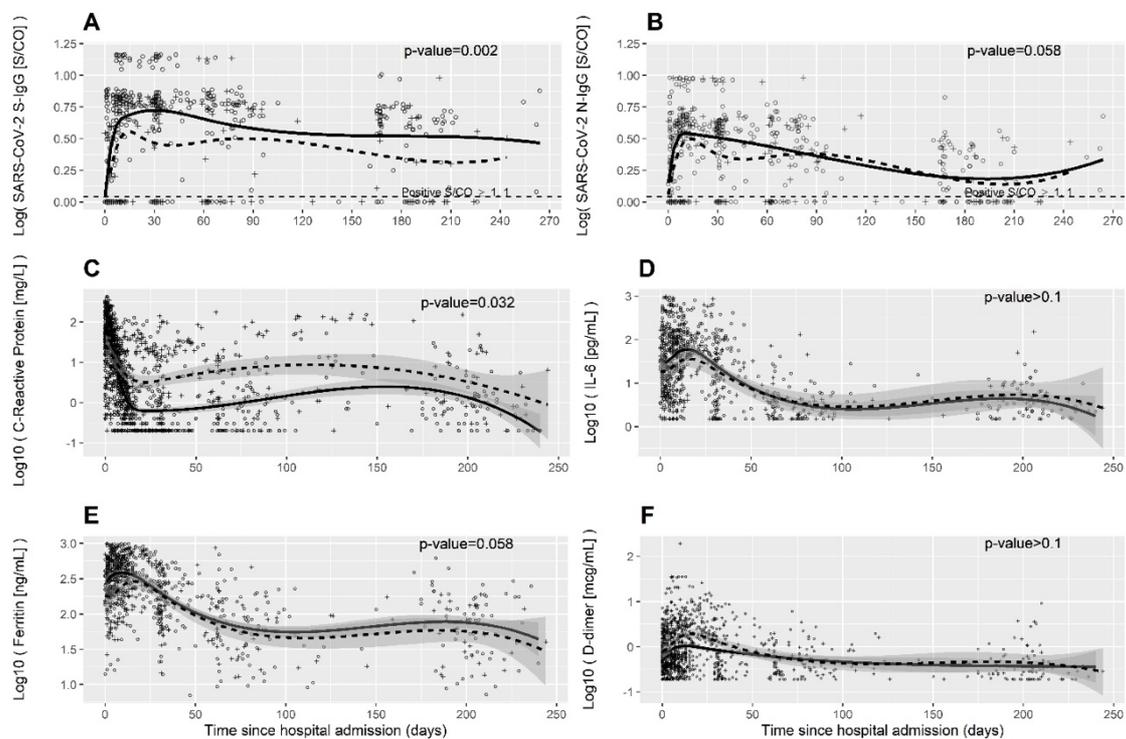


Panel A: Each horizontal level represents the RT-PCR SARS-CoV-2 results for each patient in the cohort throughout follow-up, since the first positive result to the last available one. Red dots represent positive results and green dots negative results. Black dots mark those patients who died and time of death since the first positive SARS-CoV-

2 RT-PCR result. Colored lines join two consecutive dots in the same patient with the same result and less than 90 days between dots. Patient #143 moved to another country after discharge. Patients #139, #142 and #145 could only be reached by phone. Patients #136 and #137 refused to have a new nasopharyngeal sample taken but agreed to continue with the clinical follow-up. RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Panel B:** Each dot represents an S-IgG (continuous line and circle symbols) or N-IgG (dashed line and plus symbols) value in an individual subject, with interpolation line and 90% confidence interval

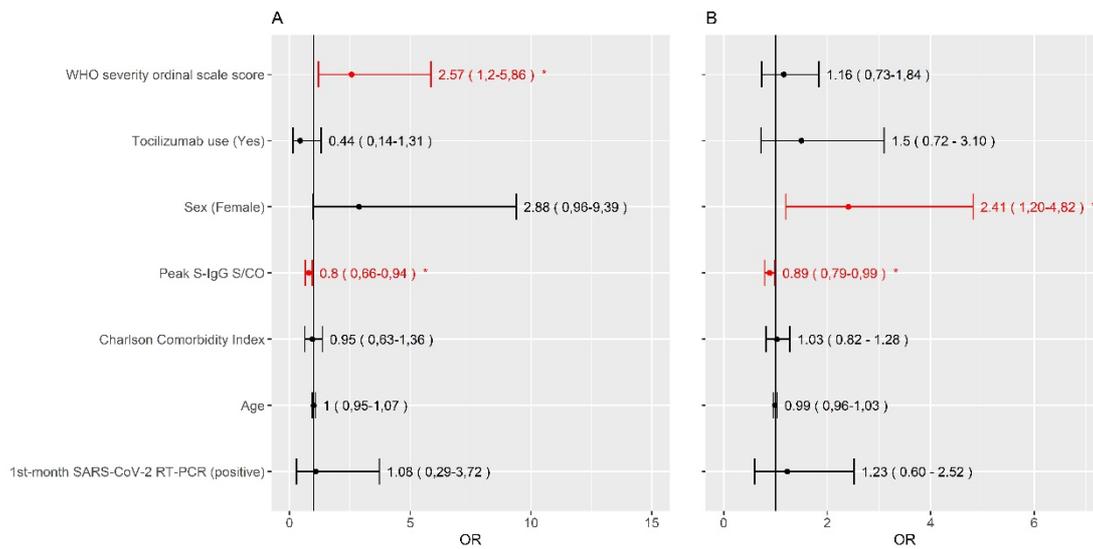
Abbreviations: S/CO, absorbance/cut-off; S-IgG, S-IgG antibody against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike protein; N-IgG, antibody against the SARS-CoV-2 internal nucleocapsid protein.

Figure 3. Temporal changes in SARS-CoV-2 IgG antibodies and serum inflammatory biomarkers during follow-up by symptomatic status. Serum levels of S-IgG (panel A), N-IgG (panel B), C-reactive protein (Panel C), interleukin-6 (Panel D), ferritin (Panel E) and D-dimer (Panel F) during follow up. Dashed lines and plus symbols represent individuals with the highest scores in COVID-19 symptoms questionnaire; continuous lines and circle symbols represent all other patients filling the questionnaire.



Abbreviations: S-IgG, IgG antibody against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike protein; N-IgG, IgG antibody against the SARS-CoV-2 internal nucleocapsid protein; S/CO, absorbance/cut-off. P-value for the comparison between groups according to the score in COVID-19 symptoms questionnaire.

Figure 4. Predictors of the highest scores in COVID-19 symptoms questionnaire in multivariate regression logistic model at two-month and six-month follow-up. Panel A represents 2-month, and panel B 6-month follow-up.



Abbreviations: WHO, World Health Organization; S-IgG, IgG antibody against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike protein; S/CO, absorbance/cut-off; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **P* value <0.05.

11. ANEXO II: TABLAS Y FIGURAS

11. ANEXO II: TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores de los 146 pacientes en seguimiento y principales eventos clínicos ocurridos durante los primeros seis meses de seguimiento.

Variable		
Pacientes, n. (%)	146	(100)
Sexo masculino	88	(60.3)
Edad, años	64	(54-76)
Fumador activo	12	(8.8)
Comorbilidad		
Cualquier comorbilidad	106	(72.6)
Índice Comorbilidad Charlson, mediana (Q1,Q3) puntos	3	(1-5)
Enfermedad cardiovascular	31	(21.2)
Hipertensión arterial	32	(21.9)
Diabetes mellitus	33	(22.6)
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	8	(5.5)
Duración de síntomas, mediana (Q1, Q3)	7	(3-10.5)
Número de síntomas al ingreso	3	(2-4)
Máximo de la escala severidad de OMS	4	(4-4)
SpO2/FIO2 al ingreso	350	(339.3-452.4)
Infiltrados pulmonares bilaterales en RT	122	(89.1)
Duración de estancia hospitalaria, días	11	(8-15)
Tratamientos		
Dexametasona/Metilprednisolona	23	(15.8)
Tocilizumab	73	(50)
Características sero-viroológicas		
Cuantificación viral nasofaríngea SARS-CoV-2	2227	(149 - 23382)
SARS-CoV-2 “Cycle threshold”	34.7	(27-40)
Tiempo hasta el aclaramiento viral	13	(2.2-33.8)
PCR SARS-CoV-2 positiva, n (%)		
≥1 mes	40	(27.4)
≥2 meses	15	(11.8)
≥6 meses	4	(3.0)
Tiempo hasta la seroconversión, días	12	(8-15)
SARS-CoV-2 IgG-S		
Seropositividad a mes 1, n (%)	93	(70.5)
Seropositividad a mes 2, n (%)	96	(70.6)
Seropositividad a mes 6, n (%)	99	(71.2)
Concentración sérica pico (S/CO)	5.9	(0.3-7.1)
Concentración sérica valle (s/CO)	3.9	(2.1-4.7)
SARS-CoV-2 IgG-N		
Seropositividad a mes 1, n (%)	94	(71.2)
Seropositividad a mes 2, n (%)	96	(70.6)
Seropositividad a mes 6, n (%)	98	(70.5)
Concentración sérica pico (S/CO)	4.1	(0.3-4.9)
Concentración sérica valle (s/CO)	2.2	(1.5-2.8)
Eventos clínicos durante seguimiento		
Exitus	8	(5.48)
Persistencia de cualquier síntomas*		
A los 2 meses	27	(25.9)
A los 6 meses	28	(24.1)

Biomarcadores inflamatorios	
Proteína-C-Reactiva suero, mg/L	
Al ingreso	39.1 (15.2-89.9)
1 mes	0.3 (0.2-2.1)
2 meses	0.5 (0.2-4.2)
6 meses	1 (0.4-5.1)
IL-6 suero, pg/mL	25.1 (10.9-73.6)
Al ingreso	15.6 (3.5-54.9)
1 mes	5.2 (2.2-20.5)
2 meses	3 (1.8-5.1)
6 meses	
Ferritina suero, ng/mL	354 (174-579)
Al ingreso	181 (90-346)
1 mes	121 (52-208)
2 meses	75 (31-134)
6 meses	
Dímero D suero, mcg/mL	0.7 (0.4-1.7)
Al ingreso	0.4 (0.2-1.3)
1 mes	0.4 (0.3-0.8)
2 meses	0.4 (0.2-0.7)
6 meses	
Cociente neutrófilos/linfocitos	4.5 (2.9-6.5)
Al ingreso	1.7 (1.2-2.7)
1 mes	1.8 (1.3-2.6)
2 meses	2.0 (1.4-2.9)
6 meses	

*Pacientes con una puntuación \geq del tercer cuartil en cualquiera de los ítems del cuestionario de síntomas. RT, radiografía de tórax. Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; IL-6, Interleucina-6; SpO₂, saturación de oxígeno pulsimétrica; FiO₂, Fracción inspirada de oxígeno; S/CO, “absorbance/cut-off”; Los resultados se proporcionan como medianas con rangos intercuartílicos o números con porcentajes, según corresponda. Las PCR SARS-CoV-2 estaban disponibles en 146, 127 y 134 pacientes al 1, 2 y 6 mes.

Tabla 2. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores de acuerdo a la persistencia mantenida de síntomas durante los doce meses de seguimiento tras COVID-19.

Síntomas persistentes a los 6 y 12 meses					
	Sí*	No	P valor	Hazard Ratio ajustado 95% IC	p ajustada
Pacientes, n.	14 (19.4)	58 (80.6)	-		
Sexo masculino	5 (35.7)	39 (67.2)	0.037	0.28 (0.11-0.70)	0.007
Edad, años	59.5 (53-71)	60 (52-71)	0.938	-	-
Fumador activo	3 (25)	1 (2)	0.021	12.02 (1.52-94.51)	0.01
Comorbilidad, n. (%)				-	-
Cualquier comorbilidad #	10 (71.4)	38 (65.5)	0.761		
ICC, mediana (Q1, Q3) puntos	2 (1-3.5)	2 (1-3)	0.800		
Enfermedad Cardiovascular	3 (21.4)	10 (17.2)	0.708		
Hipertensión arterial	8 (57.1)	23 (39.7)	0.368		
Diabetes mellitus	3 (21.4)	8 (13.8)	0.438		
EPOC	0 (0)	2 (3.4)	1.000		
Escala de severidad de la OMS			0.021	2.22 (1.41-3.50)	0.001
3 puntos	9 (64.3)	53 (91.4)			
4 puntos	1 (7.1)	0 (0)			
5 puntos	0 (0)	1 (1.7)			
6 puntos	4 (28.6)	4 (6.9)			
Infiltrados bilaterales en RT	12 (85.7)	54 (93.1)	0.330	-	-
Duración de estancia hospitalaria, días	11 (7-28.5)	11 (9-16)	0.852	-	-
Ingreso en UCI	4 (28.6)	5 (8.6)	0.065	5.05 (1.62-15.76)	0.005
Tratamiento inmunomodulador	9 (64.3)	40 (69)	0.756	-	-
Características inmunitarias					
SARS-CoV-2 IgG S1/S2, AU/MI	49 (16-96)	96.3 (46.4-133)	0.066	0.14 (0.03-0.65)	0.012
SARS-CoV-2 IgG ELISA, serum conc.	1.9 (1-4.3)	3.3 (1.9-4.6)	0.252	-	-
SARS-CoV-2-NeutraLISA, %IH	27.3 (16-75)	69.7 (39-83)	0.155	-	-
SARS-CoV-2-NeutraLISA positivo	6 (42.9)	46 (79.3)	0.007	0.98 (0.97-0.99)	0.023
SARS-CoV-2 IGRA, mIU/mL	1067(341-1920)	1184 (544-2027)	0.739	-	-
SARS-CoV-2 IGRA positivo, n(%)	11 (78.6)	49 (86)	0.524	-	-
Marcadores inflamatorios a 12 meses					
Proteína C reactiva suero, mg/L	1.8 (0.6-5.1)	1(0.6-3.4)	0.825	-	-
IL-6 suero, pg/mL	3.6 (3.4-5.9)	3.4 (2.5-4.9)	0.466		
Ferritin suero, ng/mL	49.3 (29-93.8)	66.2 (37.9-124)	0.453		
Dímero-D suero, mcg/mL	0.4 (0.2-0.8)	0.3 (0.2-0.4)	0.234		
Cociente neutrófilos/linfocitos	3.4 (3.1-4.6)	3.8 (3.1-4.5)	0.890		
Nadir de linfocitos	0.6 (0.5-0.9)	0.9 (0.7-1.2)	0.065		
Anticuerpos antinucleares >1/160,n (%)	8 (57.1)	17 (29.3)	0.049	3.37 (0.84-13.57)	0.087

*Los pacientes fueron clasificados en el grupo de persistencia de síntomas tanto en el cuestionario a los 6 como a los 12 meses presentaban algún síntoma por encima del cuartil 3. #En comorbilidad se incluye: diabetes, enfermedad cardiovascular, respiratoria, renal y neurológica, cirrosis o cáncer. ICC, Índice de Comorbilidad de Charlson; RT, Radiografía de tórax; UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; AU/mL (arbitrary units per milliliters), BAU/mL (binding antibody units), %IH (inhibition percentage), IGRA (Interferon-Gamma Release Assays); mIU/MI ; IL-6, Interleucina-6. Los resultados se proporcionan como medianas con rangos intercuartílicos o números con porcentajes, según corresponda.

Tabla 3. Causas de mortalidad intrahospitalaria y ambulatoria, reingresos hospitalarios y asistencias a Urgencias en los 166 pacientes con COVID-19 ingresados en el Hospital General Universitario de Elche entre el 1 de marzo y el 30 de junio de 2020.

	Eventos			
	Exitus		Reingresos hospitalarios &	Asistencia a Urgencias &
	Intrahospitalarios	Tras el alta		
Todas las causas, n.	12	11	30/54	58/117
Infección bacteriana, n.	6	5	5/12	11/27
Exacerbación de enfermedad de base,n	4	5	13/23	16/31
Complicaciones trombohemorrágicas,n	2	1	9/9	9/9
Relacionadas con COVID-19, n.	-	0	6/8	14/14
Desconocidas/Otras, n.			2/2	23/36

& Cada una de estas dos columnas muestra el número de pacientes (izquierda) y el número de eventos (derecha). Algunos pacientes tuvieron más de un evento.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con persistencia de síntomas de mayor intensidad al año del alta.

Variable	
Pacientes con cuestionario disponible a 6 y 12 meses, n.	72 (100)
Sintomáticos a los 6 y 12 meses	14 (19.4)
Resto de pacientes	58 (80.6)
Síntomas persistentes a 12 meses	
Astenia	11 (15.3)
Mialgias	10 (13.9)
Falta de concentración/Pérdida de memoria	10 (13.9)
Insomnio	9 (12.5)
Cefalea	8 (11.1)
Disnea	6 (8.3)
Síntomas digestivos (náuseas/vómitos/diarrea)	6 (8.3)
Ansiedad/depresión	6 (8.3)
Palpitaciones	6 (8.3)
Ageusia/anosmia	5 (6.9)
Congestión nasal	4 (5.6)
Odinofagia	4 (5.6)
Alopecia	4 (5.6)
Tos	3 (4.2)
Sudoración	3 (4.2)
Número de síntomas por paciente	
1 síntoma	1 (1.4)
2 síntomas	2 (2.8)
3 síntomas	2 (2.8)
4 síntomas	3 (4.2)
5 o más síntomas	6 (8.3)

Tabla 5. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores según persistencia de síntomas a los dos meses del ingreso hospitalario por COVID-19

	Síntomas a los 2 meses				P valor
	Sí*		No		
Pacientes, n.	27	(26)	77	(74)	-
Sexo masculino	12	(44)	51	(66)	0.066
Edad, años	65	(55-75)	64	(53-76)	0.860
Fumador activo	5	(20)	2	(3)	0.013
Comorbilidad, n. (%)					
Cualquier comorbilidad #	18	(67)	52	(68)	1.000
ICC, mediana (Q1, Q3) puntos	2	(1-4)	3	(1-5)	0.793
Enfermedad Cardiovascular	6	(22.2)	14	(18.2)	0.777
Hipertensión arterial	5	(18.5)	23	(30)	0.319
Diabetes mellitus	6	(22.2)	13	(16.9)	0.568
EPOC	1	(3.7)	6	(8)	0.674
Duración de síntomas, mediana (Q1, Q3)	6	(3-11)	8	(4-11)	0.577
Número de síntomas al ingreso	3	(2-4)	3	(2-4)	0.654
Máximo de la escala severidad de OMS	4	(4-4)	4	(4-4)	0.578
SpO2/FIO2 al ingreso	354	(339-457)	350	(339-381)	0.613
Infiltrados bilaterales en RT	19	(76)	70	(94.6)	0.015
Duración de estancia hospitalaria, días	10	(7-14)	11	(8-14)	0.494
Ingreso en UCI	5	(18.5)	6	(7.8)	0.148
Treatmentos					
Dexametasona/Metilprednisolona	3	(11.1)	14	(18.2)	0.549
Tocilizumab	9	(33.3)	48	(62.3)	0.013
Características sero-viroológicas					
Cuantificación viral nasofaríngea	1726	(170-13869)	4914	(400-41608)	0.262
Tiempo hasta el aclaramiento viral	8	(1-15)	13	(3.5-26.5)	0.237
PCR SARS-CoV-2 positiva, n (%)					
≥1 mes	5	(18.5)	27	(35.1)	0.174
≥2 meses	2	(7.4)	13	(16.8)	0.375
Tiempo hasta la seroconversión & SARS-CoV-2 IgG-S	16	(11.5-28)	11	(8-13)	0.012
Seropositividad a 1 mes, n (%)	14	(56)	64	(86.5)	0.003
Seropositividad a 2 meses, n (%)	15	(55.6)	65	(86.7)	0.002
Seropositividad a 6 meses, n (%)	16	(59.3)	65	(85.5)	0.007
Pico*, concentración sérica (S/CO)	4.1	(0.1-6.2)	6.4	(4.5-7.5)	0.002
Valle* concentración sérica (S/CO)	3.5	(2.0-4.5)	3.8	(2.4-4.7)	0.346

SARS-CoV-2 IgG-N						
Seropositividad a 1 mes, n (%)	14	(56)	64	(86.5)	0.003	
Seropositividad a 2 meses, n (%)	15	(55.6)	65	(86.7)	0.002	
Seropositividad a 6 meses, n (%)	16	(59.3)	65	(85.5)	0.007	
Pico*, concentración sérica (S/CO)	3.6	(0.1-5.0)	4.3	(3.5-4.9)	0.210	
Valle* concentración sérica (S/CO)	2.3	(1.9-2.7)	2.0	(1.4-2.6)	0.171	
Biomarcadores inflamatorios						
Proteína-C-reactiva suero, mg/L						
Al ingreso	25.3	(3.5-59)	49.2	(23.2-104.3)	0.055	
1 mes	1.3	(0.2-12.6)	0.2	(0.2-0.8)	0.001	
2 meses	1.7	(0.7-10.9)	0.3	(0.2-1.0)	0.001	
6 meses	1.4	(0.8-9.4)	0.7	(0.3-2)	0.012	
IL-6 suero, pg/mL						
Al ingreso	15.1	(4.9-72)	27	(12-91.3)	0.193	
1 mes	7.7	(3.4-52.5)	19.9	(3.4-49.3)	0.682	
2 meses	4.6	(2.4-12.1)	5.5	(2.6-23.8)	0.450	
6 meses	3.7	(2.2-4.7)	2.9	(1.8-5.1)	0.454	
Ferritin suero, ng/mL						
Al ingreso	164	(85-462)	398	(235-589)	0.002	
1 mes	129	(60-311)	181	(98-291)	0.219	
2 meses	66	(50.4-182.2)	126	(63-199)	0.294	
6 meses	57	(19-109)	77	(38-129)	0.233	
Dímero D suero, mcg/mL						
Al ingreso	0.7	(0.4-1.5)	0.6	(0.4-1.2)	0.784	
1 mes	0.7	(0.3-1.7)	0.4	(0.2-0.8)	0.071	
2 meses	0.6	(0.3-1.4)	0.4	(0.2-0.7)	0.069	
6 meses	0.4	(0.3-0.7)	0.4	(0.2-0.7)	0.378	
Cocientes neutrófilos/linfocitos						
Al ingreso	3.5	(2.7-6.5)	5.0	(2.9-6.7)	0.536	
1 mes	1.8	(1.3-2.2)	1.7	(1.3-2.4)	0.758	
2 meses	2.0	(1.5-2.6)	1.7	(1.3-2.3)	0.326	
6 meses	2.1	(1.7-3.2)	1.9	(1.5-2.3)	0.160	

*Los pacientes fueron clasificados en el grupo de sintomáticos si presentaban algún síntoma por encima del cuartil 3.
#En comorbilidad se incluye: diabetes, enfermedad cardiovascular, respiratoria, renal y neurológica, cirrosis o cáncer.
& Desde el inicio de la enfermedad y considerando IgG-S o IgG-N. ICC, Índice de Comorbilidad de Charlson; RT, Radiografía de tórax; UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; IL-6, Interleucina-6. S/CO, absorbance/cut-off. Los resultados se proporcionan como medianas con rangos intercuartílicos o números con porcentajes, según corresponda.

Tabla 6. Características basales, clínicas, seroviroológicas y de biomarcadores según persistencia de síntomas a los seis meses del ingreso hospitalario por COVID-19

	Síntomas a los 6 meses				
	Sí*		No		P valor
	n	(%)	n	(%)	
Pacientes, n.	28	(24)	88	(76)	-
Sexo masculino	14	(50)	55	(62.5)	0.274
Edad, años	66	(56-76)	65	(54-76)	0.747
Fumador activo	1	(3.8)	10	(12.2)	0.291
Comorbilidad, n. (%)					
Cualquier comorbilidad #	20	(71.4)	63	(71.6)	1.000
ICC, mediana (Q1, Q3) puntos	3	(1-5)	3	(1-5)	0.718
Enfermedad Cardiovascular	6	(21.4)	20	(23)	1.000
Hipertensión arterial	7	(25)	20	(22.7)	0.801
Diabetes mellitus	8	(28.6)	19	(21.6)	0.451
EPOC	3	(10.7)	5	(5.7)	0.398
Duración de síntomas, mediana (Q1, Q3)	7.5	(4.8-10)	7	(3-11)	0.895
Número de síntomas al ingreso	3	(2-5)	3	(1-4)	0.425
Máximo de la escala severidad de OMS	4	(4-4)	4	(4-4)	0.844
SpO2/FIO2 al ingreso	350	(321-457)	350	(340-440)	0.958
Infiltrados bilaterales en RT	23	(85)	74	(91.4)	0.462
Duración de estancia hospitalaria, días	11	(7-14)	11	(7-16)	0.354
Ingreso en UCI	3	(10.7)	12	(13.6)	1.000
Treatmentos					
Dexametasona/Metilprednisolona	4	(14.3)	16	(18.2)	0.778
Tocilizumab	15	(53.6)	43	(48.9)	0.829
Características sero-viroológicas					
Cuantificación viral nasofaríngea	1481	(262-10379)	2592	(160-21023)	0.900
Tiempo hasta el aclaramiento viral	8	(1-21.5)	13	(2-28)	0.511
PCR SARS-CoV-2 positiva, n (%)					
≥1 mes	10	(35.7)	24	(27.3)	0.466
≥2 meses	5	(17.9)	13	(14.8)	0.808
Tiempo hasta la seroconversión &	12	(9-16.8)	12	(8-15)	0.413
SARS-CoV-2 IgG-S					
Seropositividad a 1 mes, n (%)	17	(68)	58	(72.5)	0.800
Seropositividad a 2 meses, n (%)	17	(68)	61	(72.6)	0.801
Seropositividad a 6 meses, n (%)	19	(73.1)	62	(72.9)	1.000
Pico*, concentración sérica (S/CO)	5.1	(2.2-6.1)	6.3	(2.6-7.2)	0.055
Valle* concentración sérica (S/CO)	3.9	(2.0-4.8)	3.7	(2.2-4.7)	0.987

SARS-CoV-2 IgG-N					
Seropositividad a 1 mes, n (%)	17	(68)	59	(74)	0.613
Seropositividad a 2 meses, n (%)	17	(68)	61	(72.6)	0.801
Seropositividad a 6 meses, n (%)	19	(73)	61	(71.8)	1.000
Pico*, concentración sérica (S/CO)	3.8	(1.8-4.7)	4.1	(2.6-4.8)	0.563
Valle* concentración sérica (S/CO)	1.7	(1.3-2.6)	2.2	(1.5-2.7)	0.124
Biomarcadores inflamatorios					
Proteína-C-reactiva suero, mg/L					
Al ingreso	21.6	(2.5-45.4)	47.5	(15.3-130.6)	0.014
1 mes	0.8	(0.2-4.0)	0.3	(0.2-2.4)	0.215
2 meses	1.0	(0.3-4.2)	0.4	(0.2-4.8)	0.357
6 meses	1.0	(0.7-7.2)	1.1	(0.3-3.1)	0.227
IL-6 suero, pg/mL					
Al ingreso	13.5	(7.5-47.5)	28.3	(11.4-94.6)	0.099
1 mes	18.1	(3.5-75.6)	13.8	(3.3-48)	0.504
2 meses	5.1	(2.5-21.0)	5.8	(2.5-22.6)	0.820
6 meses	3.6	(1.5-6.8)	3.1	(1.8-5.2)	0.965
Ferritina suero, ng/mL					
Al ingreso	193	(127-498)	358	(205-597)	0.132
1 mes	100	(53-256)	195	(106-364)	0.020
2 meses	58	(37-130)	140	(68-213)	0.008
6 meses	53	(23-88)	76	(32-130)	0.239
Dímero D suero, mcg/mL					
Al ingreso	0.7	(0.4-1.3)	0.8	(0.4-1.9)	0.656
1 mes	0.4	(0.3-0.8)	0.6	(0.2-1.4)	0.764
2 meses	0.5	(0.3-0.8)	0.5	(0.2-0.9)	0.746
6 meses	0.4	(0.3-0.8)	0.3	(0.2-0.7)	0.160
Cocientes neutrófilos/linfocitos					
Al ingreso	3.6	(2.9-5.3)	5.0	(3.1-6.6)	0.076
1 mes	2.0	(1.5-2.8)	1.7	(1.1-2.6)	0.163
2 meses	2.2	(1.3-2.8)	1.8	(1.3-2.4)	0.310
6 meses	2.0	(1.8-2.6)	2.0	(1.4-2.7)	0.338

*Los pacientes fueron clasificados en el grupo de sintomáticos si presentaban algún síntoma por encima del cuartil 3.
#En comorbilidad se incluye: diabetes, enfermedad cardiovascular, respiratoria, renal y neurológica, cirrosis o cáncer.
& Desde el inicio de la enfermedad y considerando IgG-S o IgG-N. ICC, Índice de Comorbilidad de Charlson; RT, Radiografía de tórax; UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; IL-6, Interleucina-6. S/CO, absorbancia/cut-off. Los resultados se proporcionan como medianas con rangos intercuartílicos o números con porcentajes, según corresponda.

Figura 1. Diagrama de flujo de pacientes con COVID-19 ingresados en el Hospital General Universitario de Elche entre el 1 de marzo y el 30 de junio de 2020. Programa de visitas y procedimientos.

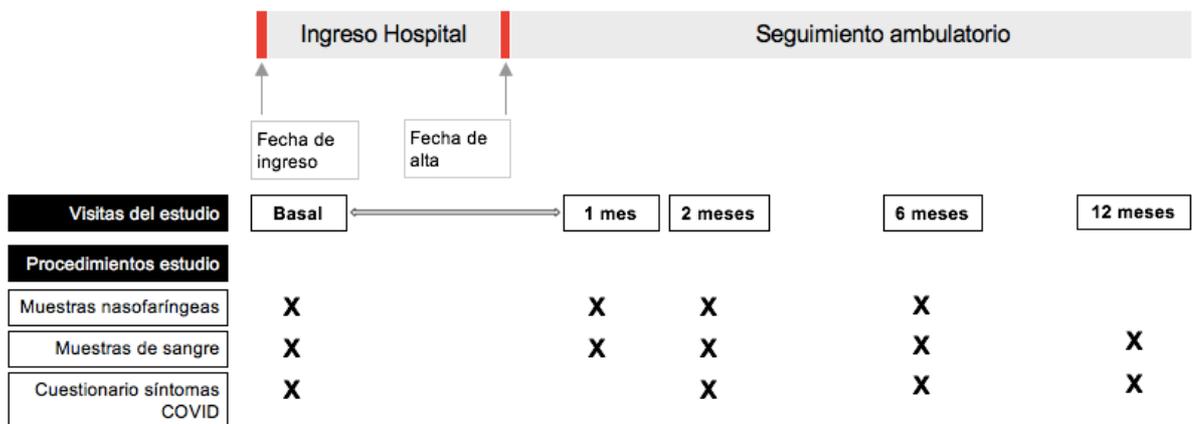
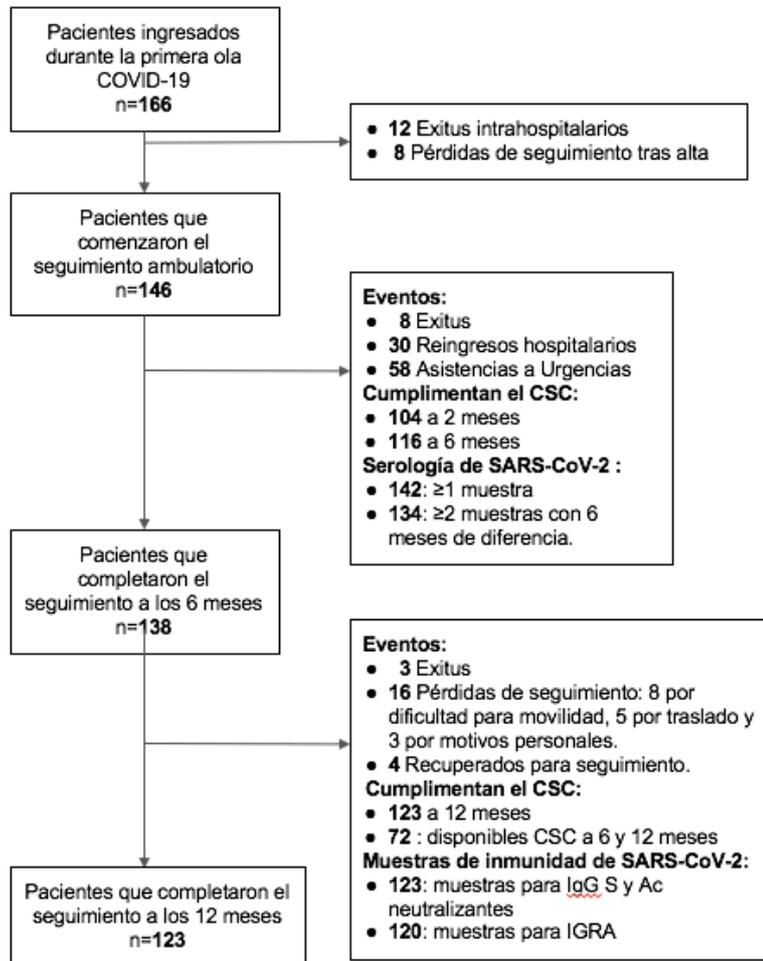


Figura 2a. Evolución temporal de los síntomas durante los primeros 6 meses se seguimiento. Se observan las puntuaciones de los síntomas generales, respiratorios y gastrointestinales recogidos en los cuestionarios de síntomas de COVID-19 al inicio, a los dos meses y a seis meses.

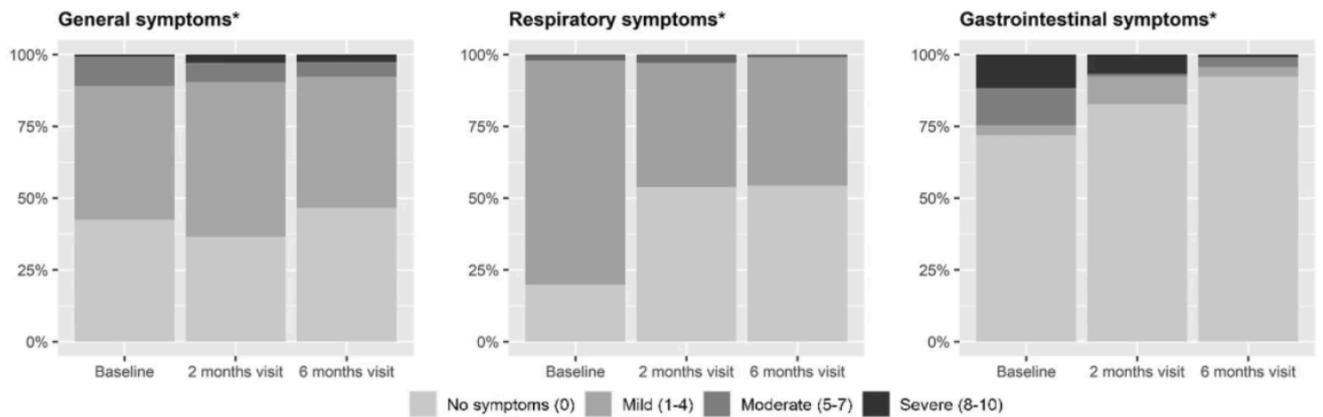


Figura 2b. Intensidad de los síntomas generales, respiratorios, gastrointestinales y neuropsiquiátricos a los 12 meses entre los pacientes en los que se analizó la persistencia de síntomas mantenida durante todo el año de seguimiento.

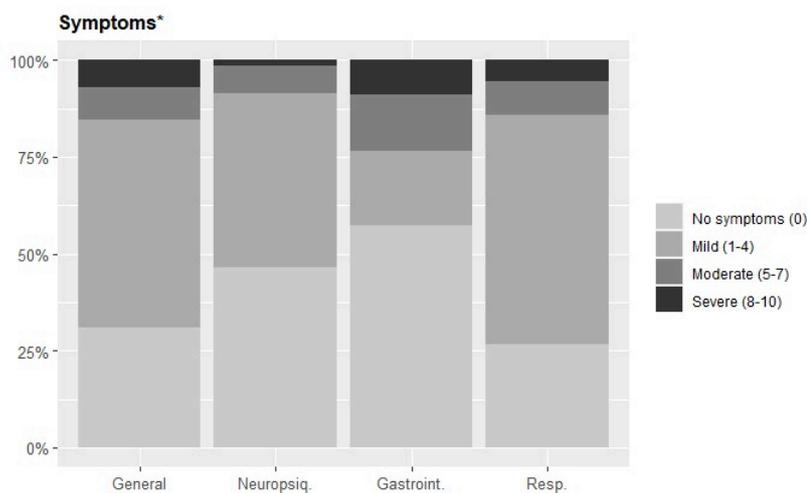


Figura 3a. Evolución temporal de los biomarcadores séricos durante los primeros 6 meses de seguimiento. Se muestran los cambios en los niveles séricos de proteína C reactiva (B), interleucina-6 (C), ferritina (D) y dímero D (E) desde el diagnóstico de COVID-19.

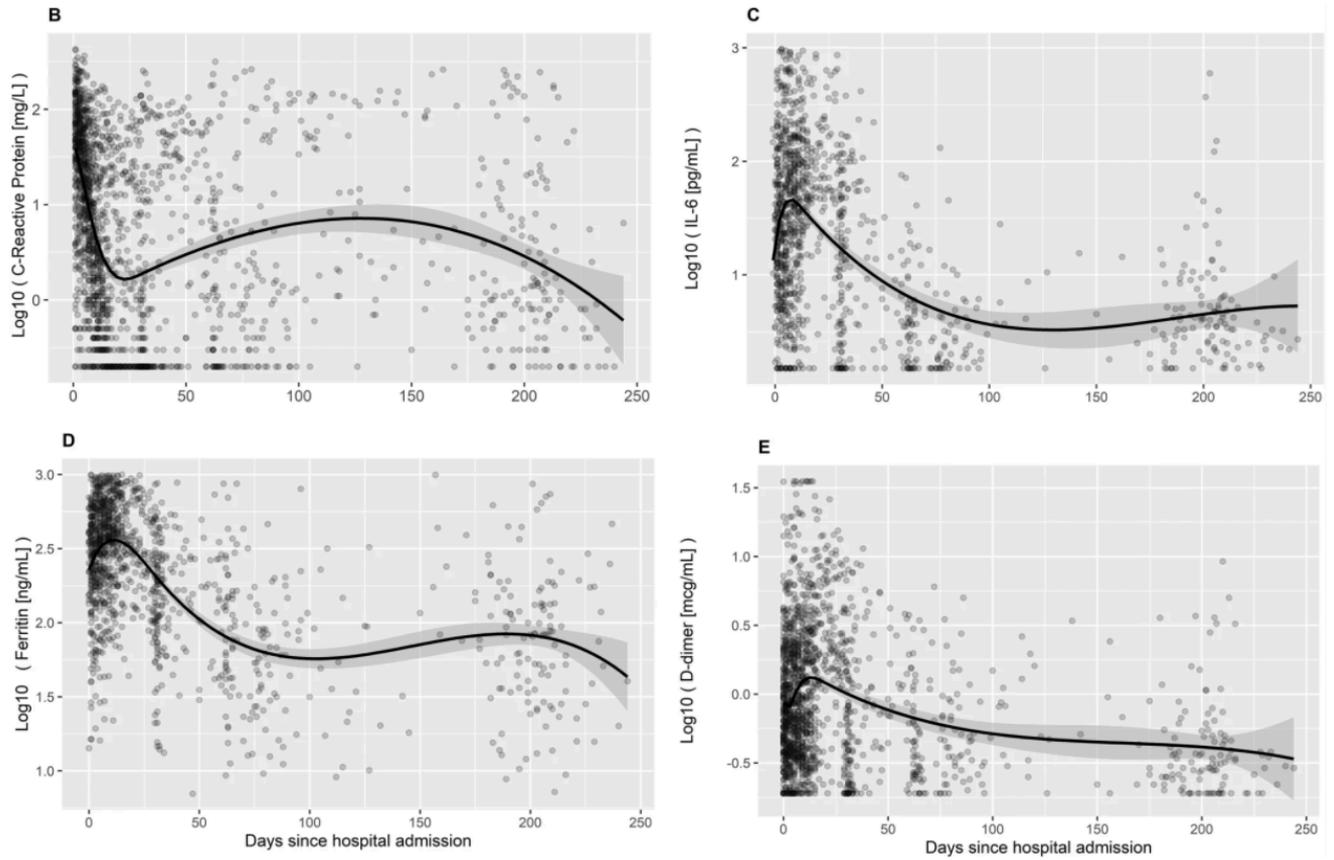
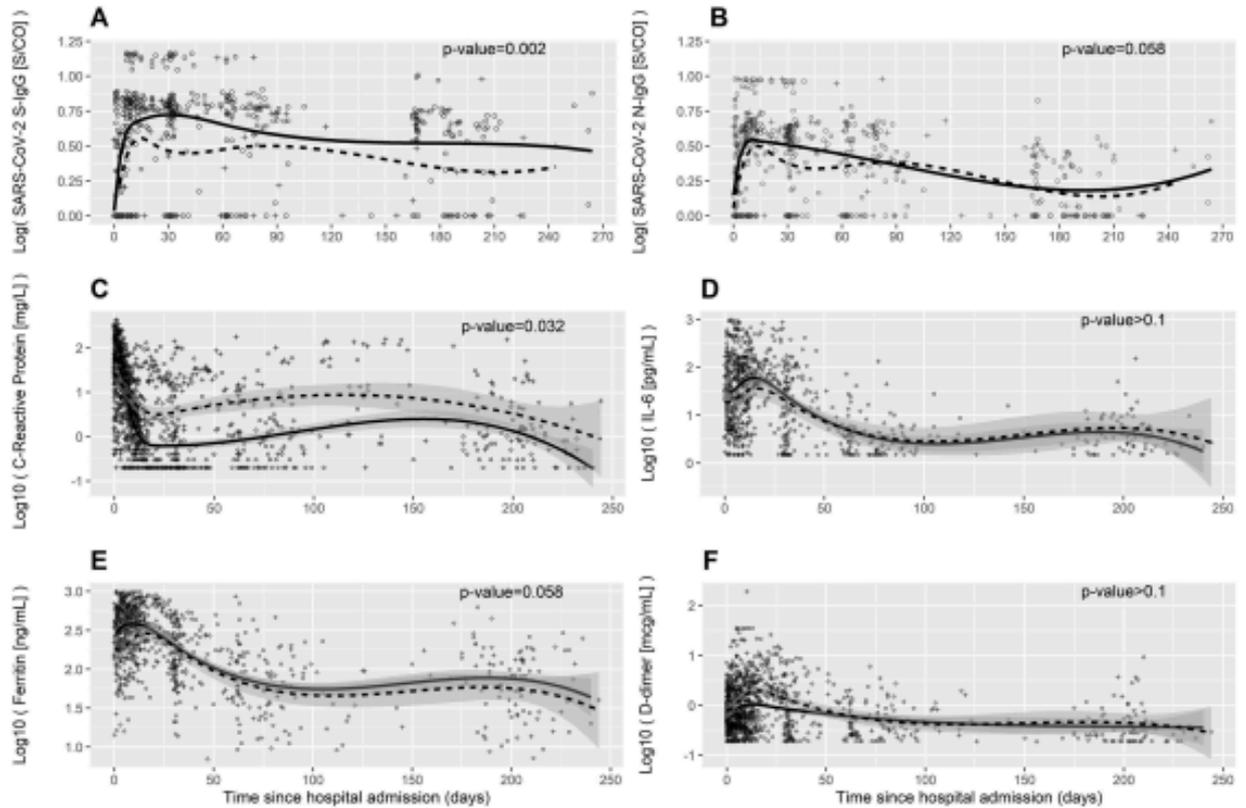
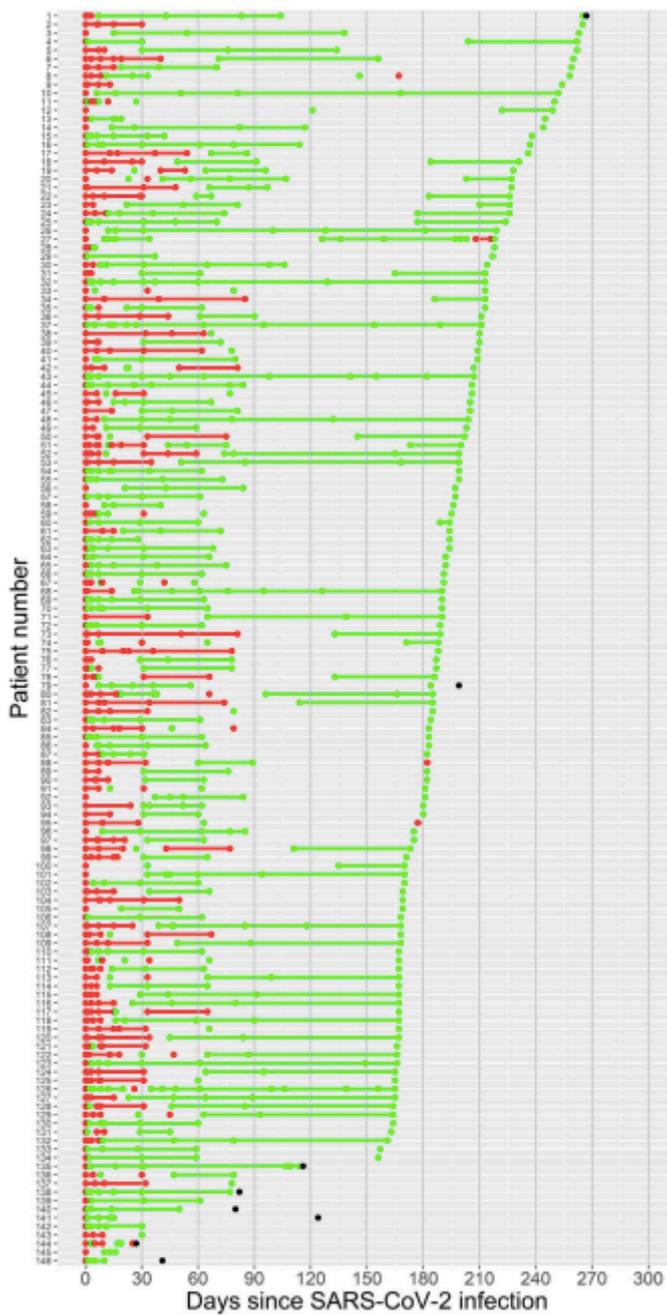


Figura 3b. Diferencias entre el grupo con síntomas de mayor severidad y el resto en la evolución temporal de los biomarcadores y anticuerpos antiSARS-CoV-2 IgG-S y N durante los primeros 6 meses de seguimiento.



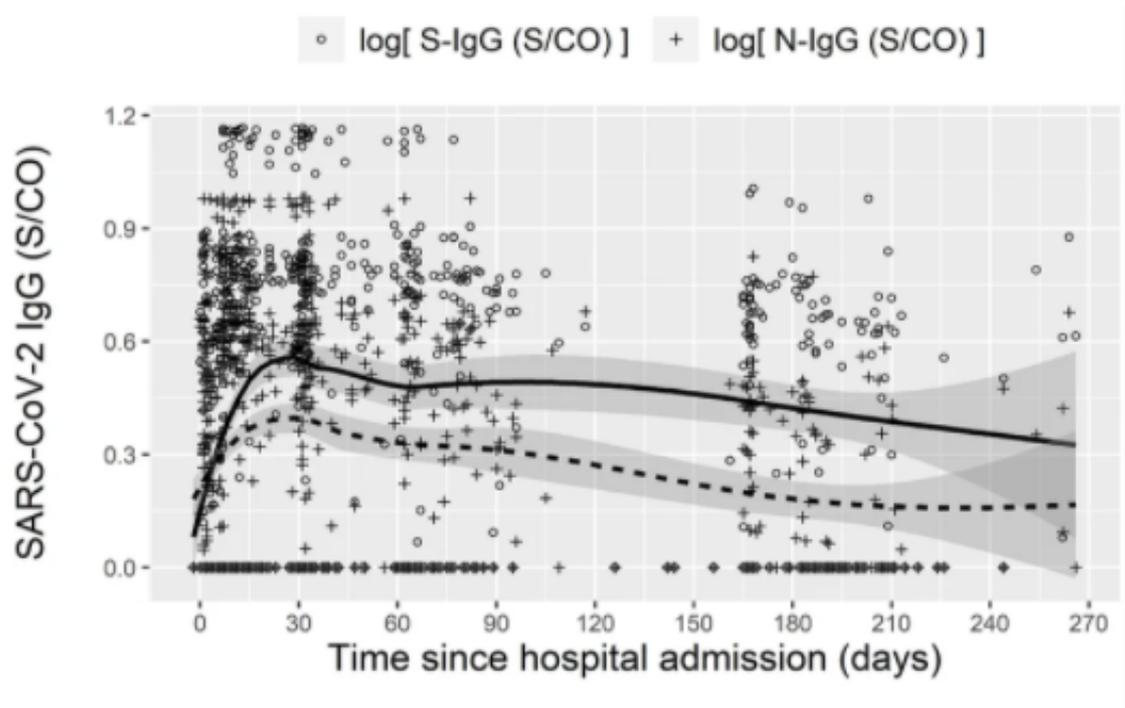
A continuación se muestran los niveles séricos de IgG-S (panel A), IgG-N (panel B), proteína C reactiva (panel C), interleucina-6 (panel D), ferritina (panel E) y dímero D (panel F) durante el seguimiento. Las líneas discontinuas y los símbolos de cruz representan a las personas con las puntuaciones más altas en el cuestionario de síntomas de COVID-19; las líneas continuas y los símbolos circulares representan a todos los demás pacientes que completan el cuestionario. IgG-S, anticuerpo IgG contra el dominio S1 de la superficie del SARS-CoV-2 de la proteína spike; N-IgG, anticuerpo IgG contra la proteína de la nucleocápside interna del SARS-CoV-2; S/CO, absorbancia/punto de corte. Valor p para la comparación entre grupos según la puntuación en cuestionarios. S/CO positivo >1,1

Figura 4. Dinámica temporal virológica del SARS-CoV-2 en los pacientes con COVID-19 durante el seguimiento.



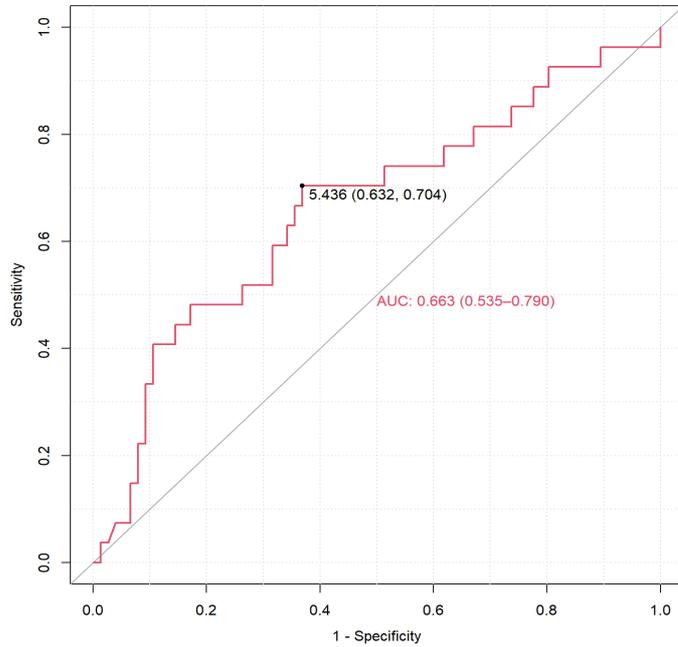
A continuación se muestran los resultados de PCR SARS-CoV-2 durante el seguimiento en los 146 pacientes del estudio. Cada fila representa los resultados de las PCR SARS-CoV-2 de cada paciente en el tiempo desde el primer resultado de PCR disponible. Los puntos rojos representan resultados positivos de PCR y los verdes, negativos. Los puntos negros representan a los éxitus, la fecha que ocurrió y el tiempo desde el primer resultado positivo en PCR. Las líneas coloreadas unen dos puntos consecutivos con el mismo resultado de PCR con menos de 90 días entre ambos. El paciente #143 se trasladó a otro país tras el alta. Los pacientes #139, #142, y #145 solo pudieron ser contactados por teléfono. Los pacientes #136 and #137 rechazaron nueva muestra nasofaríngea pero permitieron continuar con el seguimiento en consultas.

Figura 5. Dinámica temporal serológica en los pacientes con COVID-19 durante el seguimiento. Evolución de los niveles de IgG-S e IgG-N.



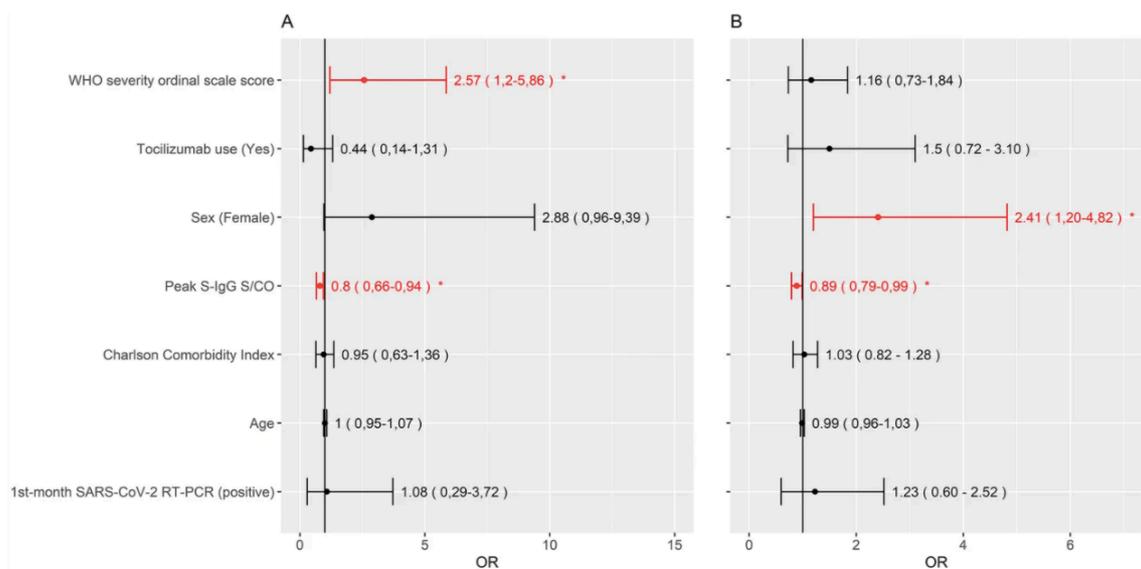
A continuación se muestran los cambios temporales en IgG-S1 e IgG-N. Cada punto representa un valor de IgG-S (línea continua y símbolos circulares) o IgG-N (línea discontinua y símbolos cruz) en un paciente, con una línea de interpolación y un intervalo de confianza del 90%. S/CO, absorbancia/punto de corte; IgG-S, anticuerpo IgG-S contra el dominio S1 de superficie de la proteína spike del SARS-CoV-2; IgG-N, anticuerpo contra la proteína de la nucleocápside interna del SARS-CoV-2. S/CO positivo >1,1

Figura 6. Curva ROC de los valores del pico de IgG-S anti-SARS-CoV-2 en el primer mes para la predicción de persistencia de síntomas a los dos meses.



ROC: Curva ROC “Receiver operating characteristics”; AUC, Área bajo la curva o “area under the curve”.

Figura 7a y 7b. Predictores de persistencia de síntomas a los 2 y 6 meses de seguimiento mediante modelo logístico de regresión multivariante.



El panel A representa el análisis multivariante a los 2 meses, y el B, a los 6 meses. WHO, Organización Mundial de la Salud “World Health Organization”; S- IgG, IgG antibody against the SARS-CoV-2 surface S1 domain of the spike protein; S/CO, “absorbance/cut-off”; RT-PCR, PCR “reverse transcriptase-polymerase chain reaction”. **P* valor < 0.05

Figura 8a-d. Análisis de sensibilidad para predictores, en modelo logístico de regresión multivariante, utilizando la mediana de los síntomas o cualquier valor en algún síntoma, a los dos (paneles A y B, respectivamente) y seis (paneles C y D, respectivamente) meses de seguimiento.

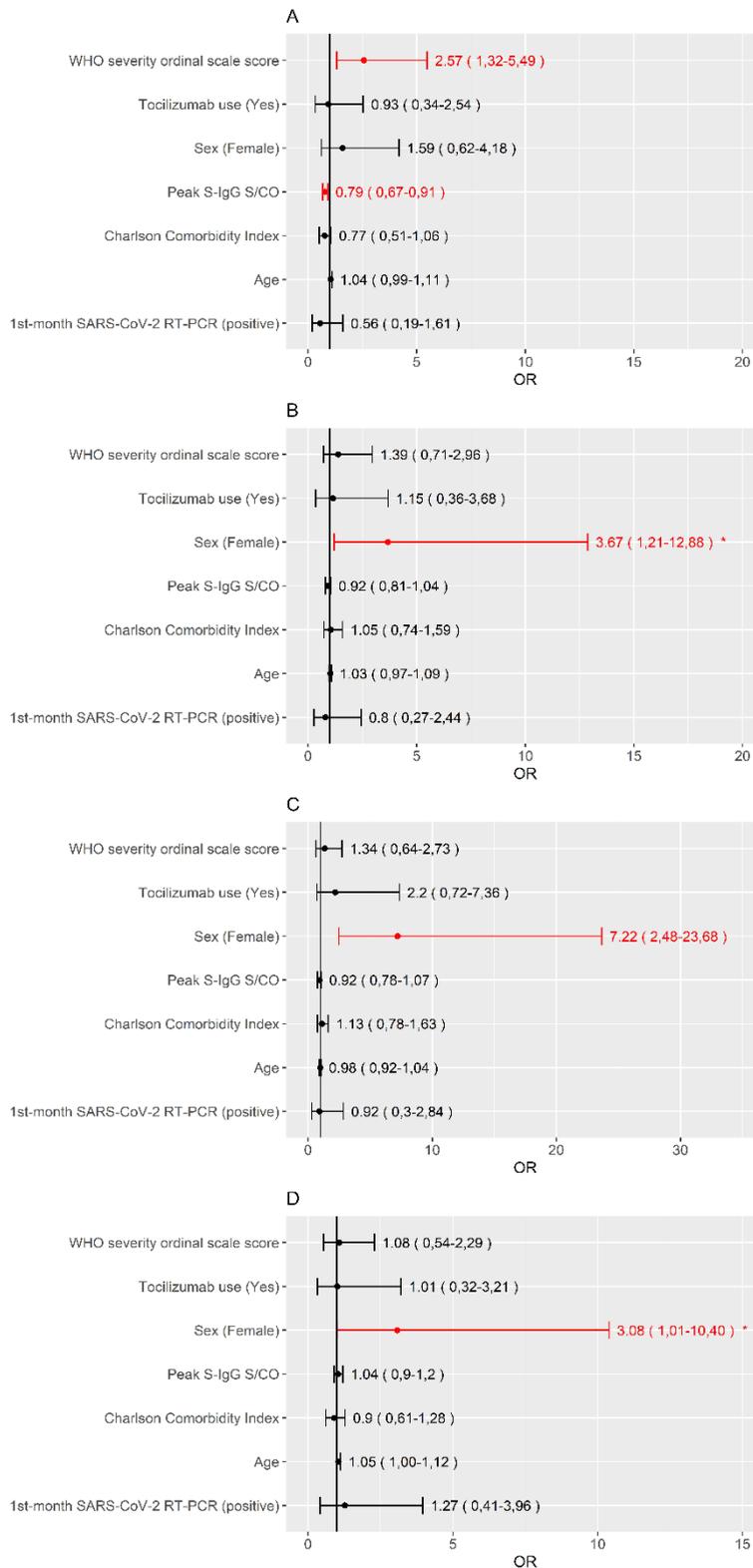


Figura 9a y 9b. A. Diferencias entre el grupo de pacientes con síntomas persistentes a largo plazo y el resto, en la evolución temporal de IgG-S al ingreso, mes 1, mes 2, mes 6 y mes 12. B. Diferencias entre grupos en capacidad neutralizante a los 12 meses.

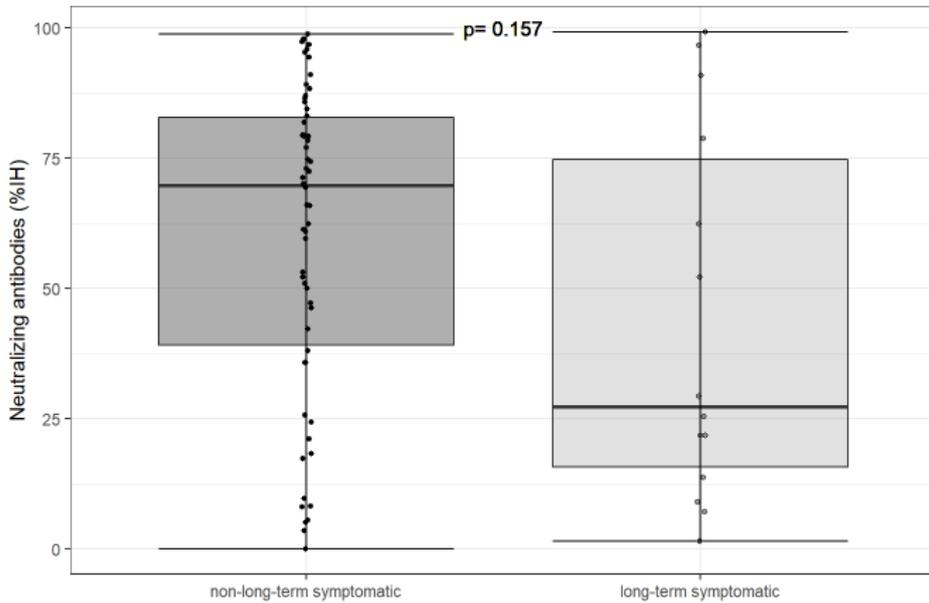
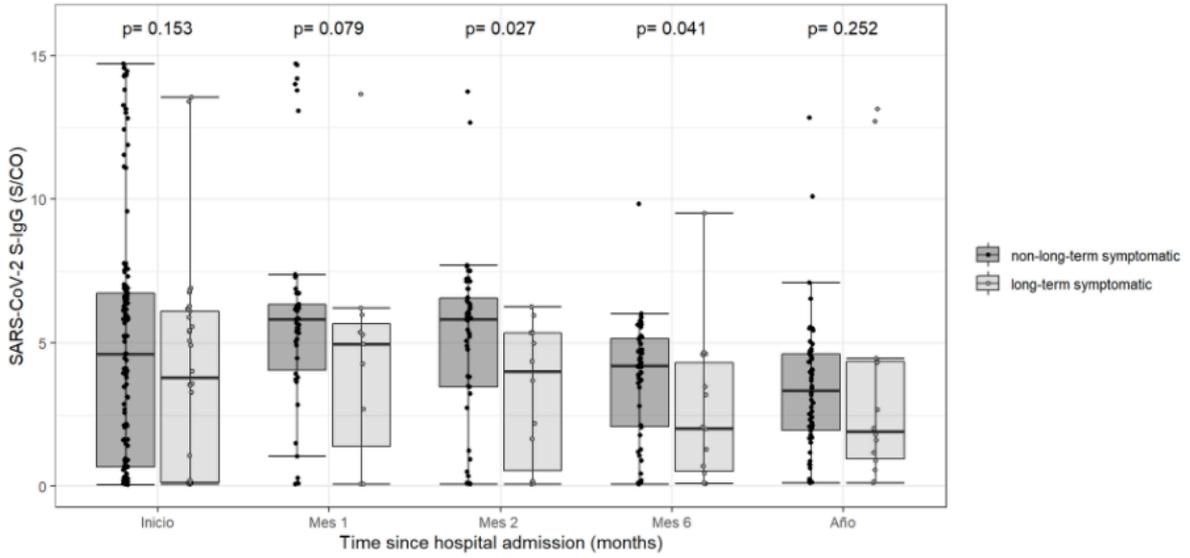
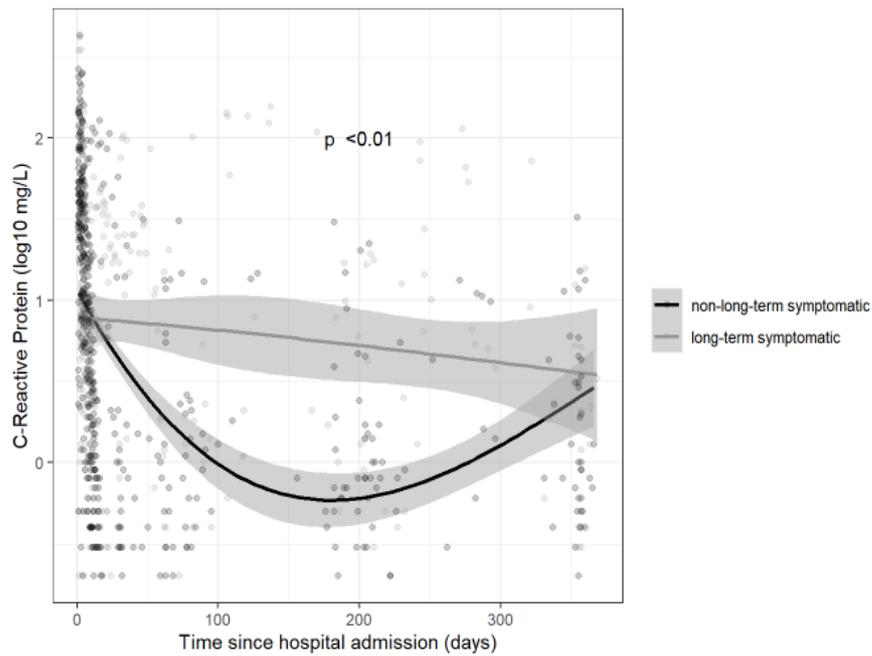
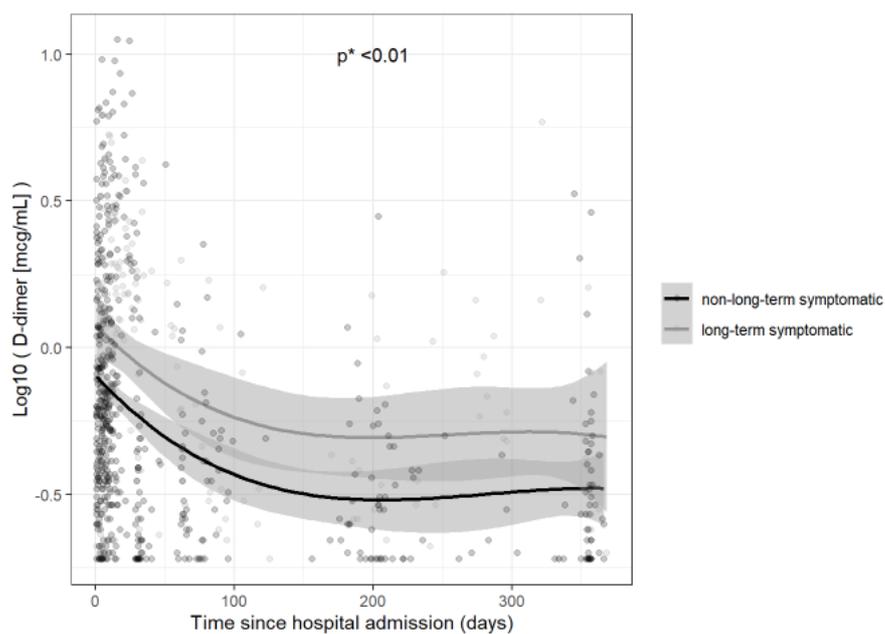


Figura 9c-f. Evolución temporal de los biomarcadores séricos durante todo el periodo de seguimiento. Se muestran los cambios en los niveles séricos de proteína C reactiva, dímero D, cociente neutrófilos/linfocitos y linfocitos desde el diagnóstico de COVID-19, separados por grupos de pacientes con síntomas persistentes de mayor intensidad frente al resto de pacientes.

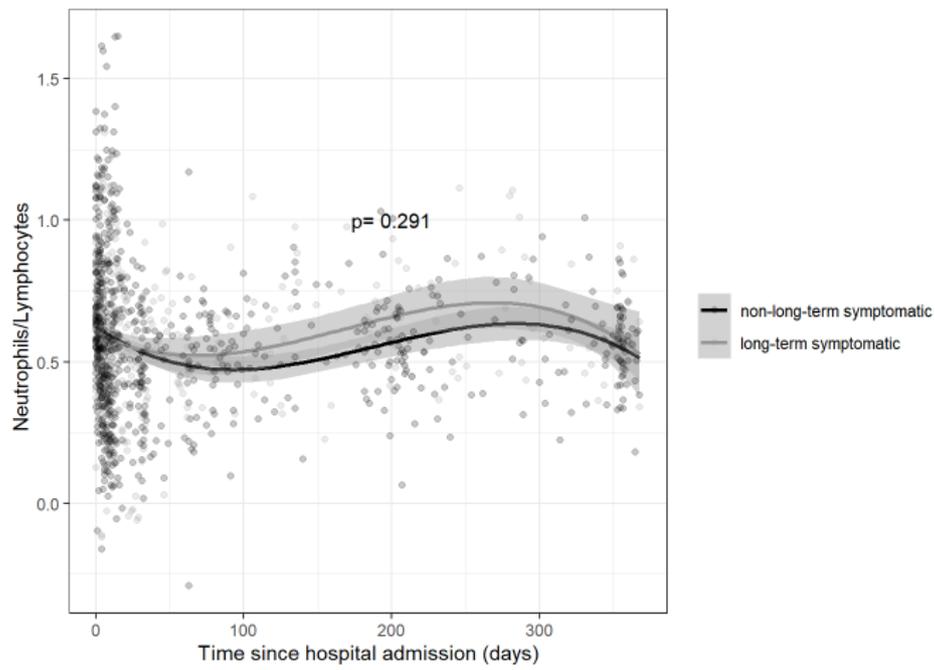
Proteína C reactiva (PCR)



Dímero D



Cociente neutrófilos/linfocitos



Linfocitos

