



Universidad Miguel Hernández de Elche

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO PRECOZ CON
INHIBIDORES DE INTERLEUCINA-6 EN PACIENTES CON COVID-19 Y
PREDICTORES DE RESPUESTA FAVORABLE.**

Realizada por:

LUCIA GUILLÉN ZAFRA

Tesis presentada por compendio de publicaciones

Directora de la Tesis:

DRA. MAR MASIÁ CANUTO

Co-Director de la tesis:

DR. FÉLIX GUTIÉRREZ RODERO



La presente Tesis Doctoral con título “**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO PRECOZ CON INHIBIDORES DE INTERLEUCINA-6 EN PACIENTES CON NEUMONÍA COVID-19 Y PREDICTORES DE RESPUESTA FAVORABLE**” se presenta en modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas indexadas:

- **Guillén L**, Padilla S, Fernández M, Agulló V, García JA, Telenti G, García-Abellán J, Botella Á, Gutiérrez F, Masiá M. **Preemptive interleukin-6 blockade in patients with COVID-19.** Sci Rep. 2020 Oct 8;10(1):16826. doi: 10.1038/s41598-020-74001-3. PMID: 33033405; PMCID: PMC7545205.
- Masiá M, Fernández-González M, Padilla S, Ortega P, García JA, Agulló V, García-Abellán J, Telenti G, **Guillén L**, Gutiérrez F. **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 Oct;60:102999. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102999. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32950003; PMCID: PMC7492814.



La Dra. Dña. *Mar Masiá Canuto* directora, y el Dr. D. *Félix Gutiérrez Rodero*, codirector/a de la tesis doctoral titulada **“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO PRECOZ CON INHIBIDORES DE INTERLEUCINA-6 EN PACIENTES CON COVID-19 Y PREDICTORES DE RESPUESTA FAVORABLE”**

INFORMAN:

Que la Dra./Dña. Lucía Guillén Zafra ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO PRECOZ CON INHIBIDORES DE INTERLEUCINA-6 EN PACIENTES CON COVID-19 Y PREDICTORES DE RESPUESTA FAVORABLE”** 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 San Juan de Alicante 23 de enero de 2023.

Directora de la tesis

Dra. Dña. *Mar Masiá Canuto*

Codirector de la tesis

Dr. D. *Félix Gutiérrez Rodero*





La Dra. Dña. Mar Masiá Canuto, Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

INFORMA:

Que D./Dña. *Lucía Guillén Zafra* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO PRECOZ CON INHIBIDORES DE INTERLEUCINA-6 EN PACIENTES CON COVID-19 Y PREDICTORES DE RESPUESTA FAVORABLE”** 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 San Juan de Alicante a 23 de enero de 2023.

Profa. Dra. Dña. *Mar Masiá Canuto*

Coordinadora del Programa de Doctorado 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
- CM 19/00160/ Instituto de Salud Carlos III
- COV20-00005/ Instituto de Salud Carlos III
- Concesión de la beca *“Ayudas para la realización de tesis doctorales”*. Convocatoria 2020. V convocatoria de ayudas para el fomento de la actividad Investigadora para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).
- Concesión de la beca *“Ayudas para el desarrollo de proyectos de investigación para grupos asociados”*. Convocatoria 2021. V convocatoria de ayudas para el fomento de la actividad Investigadora para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el trabajo y la colaboración de algunas personas que, de un modo u otro, han contribuido a su alumbramiento y desarrollo, y a las que quiero mencionar de una forma especial:

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Mar Masiá Canuto, ejemplo de dedicación y rigurosidad. Gracias por guiar este proyecto, orientarme en el proceso y depositar tu confianza en mí.

Al Dr. Félix Gutiérrez Rodero, codirector de esta tesis doctoral, por su inestimable labor en la elaboración del proyecto, por transmitirnos la pasión y la necesidad urgente de invertir tiempo y esfuerzo en investigación clínica.

A todas las personas que conforman el Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas y VIH/SIDA del Hospital General Universitario de Elche, gracias por ejemplificar el trabajo en equipo, por el apoyo y el cariño diario: José, Paula, Ángela, Rafa, Laura, María, Yolanda, Mar, Fina, Cati, Araceli, Jenny, Alba, Gabriel, Susi, Amalia. Y, especialmente, a Sergio, Javi, Marta y Vanesa, consejeros en la sombra, gracias por el aliento. A José Alberto, su aportación en este trabajo ha sido estadísticamente significativa, gracias por tu paciencia y disponibilidad. A mi compañero, Guillermo Telenti, gracias por acompañarme en esta misteriosa travesía, por acorrallar mis nervios, apagar algunos fuegos y obsequiarme con tu fidelidad.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia, anclaje cuántico, abrigo infinito. Y a Pedro, mi centinela.



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	15
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	21
SUMMARY	23
1. INTRODUCCIÓN	25
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1 Características del SARS-CoV-2	27
1.2 Epidemiología del SARS-CoV-2	28
1.3 Espectro clínico de la infección por SARS-CoV-2	28
1.4 Factores pronósticos de enfermedad grave por SARS-CoV-2.....	30
1.5 Patogénesis del síndrome de liberación de citocinas en la COVID-19.....	32
1.6 Opciones terapéuticas para frenar el síndrome de liberación de citocinas en la COVID-19	36
1.6.1 Corticoides	36
1.6.2 Tocilizumab	37
1.6.3 Inhibidores de JAK.....	41
1.7 Aclaramiento viral y respuesta humoral en la infección por SARS-CoV-2	42
1.7.1 Bloqueo anti-IL6: repercusiones en la cinética viral y respuesta inmunitaria del SARS-CoV-2.....	45
2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA.....	47
2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA.....	49
3. HIPÓTESIS	51
3. HIPÓTESIS	53
4. OBJETIVOS	55
4. OBJETIVOS	57
5. MATERIAL Y MÉTODOS	59
5. MATERIAL Y MÉTODOS	61
5.1 Diseño	61
5.2 Sujetos y ámbito de estudio.....	61
5.3 Protocolo de actuación	62
5.4 Análisis microbiológicos	63

5.4.1 Medición del ARN del SARS-CoV-2	63
5.4.2 Medición de anticuerpos frente al SARS-CoV-2	64
5.5 Variables	64
5.6 Análisis estadístico	66
6. RESULTADOS	69
6. RESULTADOS	71
6.1 Características basales de los pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19	71
6.2 Efectos de tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19	73
6.3 Evaluación de la seguridad del tratamiento con tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19	74
6.3 Predictores de respuesta al tratamiento con tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19	74
6.4 Comportamiento de los biomarcadores de inflamación en pacientes hospitalizados por neumonía COVID-19 tratados con tocilizumab	75
6.5 Predictores clínicos y biológicos precoces de respuesta a tocilizumab (evaluados a las 48h de su administración) en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19	76
6.6 Dinámica viral del SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 en relación al tratamiento con tocilizumab	78
6.7 Respuesta de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 en relación al tratamiento con tocilizumab	81
7. DISCUSIÓN	85
7. DISCUSIÓN	86
8. CONCLUSIONES	97
8. CONCLUSIONES	99
9. BIBLIOGRAFÍA	101
9. BIBLIOGRAFIA	103
ANEXOS	115
ANEXO I: TABLAS Y FIGURAS	117
ANEXO II. PROTOCOLO HOSPITALARIO	123
ANEXO III. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hallazgos demográficos, clínicos y de laboratorio al ingreso

Tabla 2. Predictores de resultado desfavorable tras inicio de tocilizumab en análisis de regresión logística multivariable.

Tabla 3. Análisis ROC del rendimiento de los biomarcadores séricos y variables clínicas a las 48 horas del inicio de tocilizumab sobre el resultado clínico.

Tabla 1 complementaria. Criterios de tratamiento con tocilizumab

Tabla 2 complementaria Criterios de tratamiento con tocilizumab y de respuesta al mismo.

Tabla 3 complementaria. Hallazgos demográficos, clínicos y de laboratorio al ingreso en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.

Table 4 complementaria. Predictores de evolución desfavorable tras inicio de tocilizumab en análisis de regresión logística multivariable en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.

Tabla 5 complementaria. Análisis ROC de la evolución de biomarcadores séricos y variables clínicas a las 48 horas del inicio de tocilizumab sobre el resultado clínico en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de los niveles de varios biomarcadores en respondedores y no respondedores a tocilizumab analizados mediante regresión polinomial local.

Figura 2. Curva de Kaplan Meier para estimar la proporción acumulada de pacientes con ARN viral detectable según el tratamiento con tocilizumab. (a) Sin ajustar. (b) Ajustada.

Figura 3. Mediana de tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la seropositividad en pacientes tratados y no tratados con tocilizumab (a) S-IgG. (b) N-IgG.

Figura 4. Títulos de IgG según el tratamiento con tocilizumab. (a) Pico de IgG. (b) Pico de N-IgG. (c) Pico de S-IgG tras excluir a los no seroconvertidores. (d) Pico de N-IgG tras excluir a los no seroconvertidores.

Figura 5. Curvas de Kaplan Meier para estimar la proporción acumulada de pacientes con títulos negativos de IgG según la terapia con tocilizumab. (a) S-IgG (sin ajustar). (b) N-IgG (sin ajustar). (c) S-IgG (ajustada). (d) N-IgG (ajustada)

Figura suplementaria 1. Diagrama de flujo de pacientes con pruebas serológicas disponibles



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACE-2: Enzima convertora de angiotensina II

ALT: Alanina aminotransferasa

AR: Artritis reumatoide

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aspartato aminotransferasa

AUC: Área bajo la curva ROC

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019

Ct: Mediana de umbral de ciclo, del inglés "*cycle threshold*"

CV: Carga viral

DM: Diabetes mellitus

E: Especificidad

ECA: Ensayo clínico aleatorizado

ECG: Electrocardiograma

ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

HR: Hazard Ratio

HTA: Hipertensión arterial

IC: Intervalo de confianza

ICC: Índice de comorbilidad de Charlson

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

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

IFI: Infección fúngica invasiva

IL: Interleucina

IL-6: Interleucina-6

Índice PAFI: Presión arterial de oxígeno/Fracción inspirada de oxígeno

Índice SAFI: cociente de saturación de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno

IP-10: Proteína-10 inducida por interferón

LDH: Lactato deshidrogenasa

MERS: Síndrome respiratorio de Oriente Medio

MIP-1: Proteína inflamatoria de macrófagos-1

NIH: *National Institutes of Health*

NK: *Natural Killers*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

PCR: Proteína C Reactiva

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PCT: Procalcitonina

RIQ: Rango intercuartílico

S: Sensibilidad

SARS-CoV: coronavirus tipo 1 responsable del síndrome respiratorio agudo severo

SARS-CoV-2: coronavirus tipo 2 responsable del síndrome respiratorio agudo severo

SOFA: *Sepsis related Organ Failure Assessment*

SpO₂: Saturación periférica de oxígeno

SRDA: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

SLC: Síndrome de liberación de citocinas

TC: Tomografía computarizada

TCZ: Tocilizumab

TNF α : Factor de necrosis tumoral- α

Tp I: Troponina I cardíaca de alta sensibilidad

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VMI: Ventilación mecánica invasiva

VMNI: Ventilación mecánica no invasiva

RESUMEN

Objetivos: La señalización excesiva de la interleucina-6 (IL-6) es un factor clave en la respuesta inmunitaria y contribuye al síndrome de liberación de citocinas implicado en las manifestaciones clínicas graves de la COVID-19. La evidencia científica disponible sugiere que el tocilizumab (TCZ), un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de la IL-6, es beneficioso en pacientes graves, pero no se dispone de datos sobre su efecto en estadios más tempranos de la enfermedad. Un bloqueo anticipado de la IL-6 podría prevenir hipotéticamente las consecuencias catastróficas de la tormenta de citoquinas. Por tanto, analizamos los resultados de la administración precoz de TCZ en pacientes con neumonía COVID-19 e identificamos los predictores de respuesta favorable. Como objetivo adicional, analizamos el impacto del bloqueo de IL-6 con TCZ en la cinética viral SARS-CoV-2 y la respuesta de anticuerpos en pacientes con COVID-19.

Metodología: Estudio de cohortes prospectivo y longitudinal en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 entre el 10 de marzo y el 17 de abril de 2020 en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche. Se trató con TCZ a pacientes con una puntuación inicial de la escala de SOFA < 3 que cumplieran unos criterios predefinidos. Se obtuvieron muestras nasofaríngeas y de plasma seriadas para cuantificar los niveles de ARN del SARS-CoV-2 y de S-IgG/N-IgG y biomarcadores plasmáticos, respectivamente, tanto en pacientes tratados con TCZ como aquellos que recibieron otras terapias.

Resultados: Para evaluar el primer objetivo, se analizó la cohorte de 193 pacientes ingresados con COVID-19 confirmado y probable durante el periodo de estudio, de los que 64 cumplieron los criterios de inclusión. Tras la administración de TCZ, 49 (76,6%) tuvieron una respuesta clínica favorable. Los predictores de respuesta desfavorable al tratamiento con anti-IL-6 analizados mediante regresión multivariante ajustada de Cox fueron el sexo masculino, mayor puntuación SOFA, un índice neutrófilos/linfocitos superior, mayor número de comorbilidades en el ICC y una cifra de presión arterial sistólica más elevada. Los perfiles evolutivos de los biomarcadores plasmáticos difirieron en relación con la respuesta a TCZ y predijeron la evolución clínica durante el ingreso.

No se observaron muertes ni recidivas de la enfermedad en los pacientes tratados con TCZ.

Para evaluar la respuesta humoral y la cinética viral, se incluyeron 138 pacientes con infección confirmada; 76 (55%) fueron tratados con TCZ. La puntuación SOFA inicial y la carga viral fueron significativamente más altas entre los pacientes tratados con anti-IL-6 y éstos, mostraron un aclaramiento viral retardado en las curvas de Kaplan-Meier (HR 0,35 [IC 95%] [0,15–0,81], log-rank $p = 0,014$). Tras la aplicación de un *propensity score* no se demostró una asociación significativa entre el bloqueo de IL-6 y el aclaramiento viral (HR 1,63 [0,35–7,7]). La regresión de Cox evidenció una asociación inversa entre la eliminación del ARN del SARS-CoV-2 y la carga viral inicial (HR 0,35 [0,11–0,89]). Los pacientes tratados con TCZ, mostraron una mediana de tiempo más corto hasta la seropositividad, títulos pico de anticuerpos más altos y una proporción acumulada más alta de seropositividad en las curvas de Kaplan Meier (HR 3,1 [1,9–5] para S-IgG; y HR 3,0 [1,9–4,9] para N-IgG; log-rank $p < 0,001$ para ambos). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las respuestas de S-IgG (HR 1,56 [0,41–6,0]) ni N-IgG (HR 0,96 [0,26–3,5]) en un análisis por *propensity score*.

Conclusiones: El tratamiento precoz con TCZ es seguro a corto plazo y se asoció con resultados favorables en la mayoría de nuestros pacientes. Los marcadores clínicos y biológicos predijeron los resultados clínicos. Además, nuestros resultados también sugieren que el bloqueo de IL-6 con TCZ, no afecta a la respuesta de anticuerpos específicos frente al virus. Aunque se observó un aclaramiento viral retardado, este hallazgo estuvo relacionado con una carga viral inicial más alta.

SUMMARY

Objectives: Excessive interleukin-6 (IL-6) signaling is a key factor in the immune response and contributes to the cytokine release syndrome implicated in the severe clinical manifestations of COVID-19. Available scientific evidence suggests that tocilizumab (TCZ), a humanized monoclonal antibody against the IL-6 receptor, is beneficial in severe patients, but no data are available on its effect in earlier stages of the disease. An early blockade of IL-6 could hypothetically prevent the catastrophic consequences of the cytokine storm. Therefore, we analyzed the results of early administration of TCZ in patients with COVID-19 pneumonia and identified predictors of favorable response. As an additional objective, we analyzed the impact of IL-6 blockade with TCZ on SARS-CoV-2 viral kinetics and antibody response in patients with COVID-19.

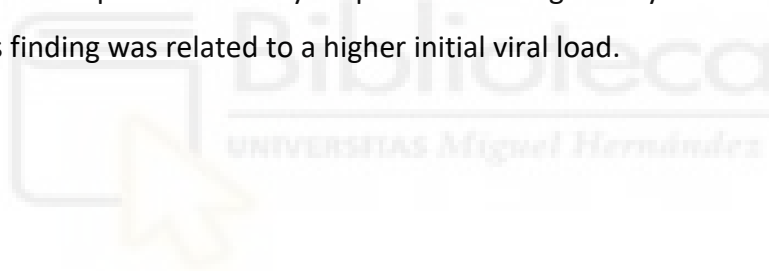
Methodology: Prospective and longitudinal cohort study in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia between March 10 and April 17, 2020 in the Infectious Diseases Unit of the Hospital General Universitario de Elche. Patients with an initial SOFA scale score < 3 who met predefined criteria were treated with TCZ. Serial nasopharyngeal and plasma samples were obtained to quantify SARS-CoV-2 RNA and S-IgG/N-IgG levels and plasma biomarkers, respectively, both in patients treated with TCZ and those who received other therapies.

Results: To evaluate the first objective, the cohort of 193 patients admitted with confirmed and probable COVID-19 during the study period was analyzed, of whom 64 met the inclusion criteria. After TCZ administration, 49 (76.6%) had a favorable clinical response. Predictors of unfavorable response to anti-IL-6 treatment analyzed by multivariate adjusted Cox regression were male sex, higher SOFA score, higher neutrophil/lymphocyte ratio, higher number of comorbidities in CHF, and higher systolic blood pressure. Plasma biomarker profiles differed in relation to the response to TCZ and predicted clinical outcome during admission. No deaths or disease recurrences were observed in patients treated with TCZ.

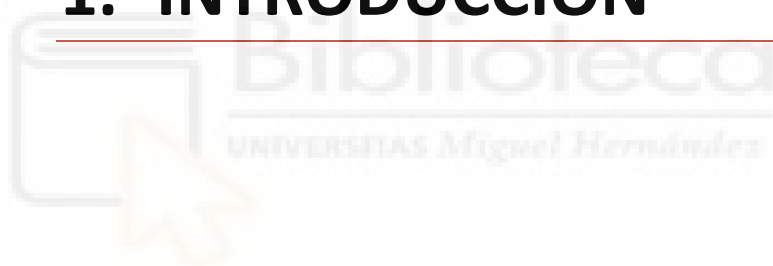
To evaluate humoral response and viral kinetics, 138 patients with confirmed infection were included; 76 (55%) were treated with TCZ. Baseline SOFA score and viral load were significantly higher among patients treated with anti-IL-6 and these patients showed

delayed viral clearance on Kaplan-Meier curves (HR 0.35 [95% CI] [0.15-0.81], log-rank p = 0.014). After application of a propensity score, no significant association between IL-6 blockade and viral clearance was demonstrated (HR 1.63 [0.35-7.7]). Cox regression evidenced an inverse association between SARS-CoV-2 RNA clearance and baseline viral load (HR 0.35 [0.11-0.89]). Patients treated with TCZ, showed a shorter median time to seropositivity, higher peak antibody titers, and a higher cumulative proportion of seropositivity on Kaplan Meier curves (HR 3.1 [1.9-5] for S-IgG; and HR 3.0 [1.9-4.9] for N-IgG; log-rank p <0.001 for both). However, no significant differences were found between groups in S-IgG (HR 1.56 [0.41-6.0]) or N-IgG (HR 0.96 [0.26-3.5]) responses in an analysis by propensity score.

Conclusions: Early treatment with TCZ is safe in the short term and was associated with favorable outcomes in most of our patients. Clinical and biological markers predicted clinical outcomes. In addition, our results also suggest that IL-6 blockade with TCZ does not affect the virus-specific antibody response. Although delayed viral clearance was observed, this finding was related to a higher initial viral load.



1. INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características del SARS-CoV-2

En diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan (China), a raíz de varios casos de neumonía de etiología desconocida, se identificó un nuevo coronavirus, denominado coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, (SARS-CoV-2, del *inglés severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Se propagó rápidamente, lo que provocó una epidemia en toda China, seguida de un número creciente de casos en otros países del mundo. En febrero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) designó la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19, del inglés, *CoronaVirus Disease 2019*) y el 11 de marzo de 2020 la reconoció como pandemia.

El SARS-CoV-2 pertenece taxonómicamente a la familia de los coronavirus (*Coronaviridae*) y al género *Betacoronavirus*. Los coronavirus son patógenos bien conocidos que causan un gran espectro de enfermedades tanto en humanos como en el reino animal. Se han descrito seis coronavirus previos al SARS-CoV-2 que pueden generar patología infecciosa en humanos; SARS-CoV, MERS-CoV, OC43, 229E, NL63 y el HKU1. El virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) son los más conocidos y los que han tenido mayor impacto y repercusión sociosanitaria, caracterizándose por un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda severa de rápida progresión. El resto de coronavirus suelen desarrollar enfermedad leve de vía aérea superior.

El SARS-CoV-2 contiene ARN monocatenario de aproximadamente 30 kb de longitud siendo genéticamente similar al SARS-CoV. De hecho, utiliza el mismo receptor, la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE-2), para la entrada a la célula huésped (1). El genoma del virus codifica cuatro proteínas estructurales; la proteína S (glicoproteína de la espícula, del inglés *spike protein*), la proteína E (proteína de la envoltura), la proteína M (proteína de membrana) y la proteína N (proteína de nucleocápside). La proteína S se ensambla en homotrímeros y forma estructuras que sobresalen de la envuelta del virus adquiriendo una forma que recuerda a una corona, de ahí su denominación. Además, contiene el dominio de unión al receptor celular por lo tanto es la que va a determinar el tropismo viral (2).

1.2 Epidemiología del SARS-CoV-2

Desde los primeros casos notificados en la provincia china de Hubei, el virus se ha extendido a los cinco continentes detectándose más de 500 millones de casos confirmados y más de 6 millones de muertes a nivel mundial (3). La crisis social, sanitaria y económica derivada de la pandemia no tiene precedentes y constituye un desafío para la salud pública mundial.

El principal medio de transmisión del SARS-CoV-2 se produce a través de la inhalación de secreciones respiratorias de una persona infectada. La transmisión a través del contacto de secreciones respiratorias y/o superficies infectadas con las mucosas es anecdótica y no ha tenido repercusión en la propagación de la pandemia. El SARS-CoV-2, aunque es menos virulento que sus predecesores MERS-CoV y SARS-CoV, ha causado un mayor número de infecciones y muertes debido a su mayor transmisibilidad (4–6).

La infección por SARS-CoV-2, en la mayoría de los casos, se produce en los 14 primeros días tras la exposición al virus, siendo el periodo de incubación medio de 4-5 días (7). El potencial de transmisión del virus comienza en el periodo presintomático y es más elevado al inicio de la infección ya que existe mayor cantidad de ARN viral en muestras respiratorias (8). La transmisión a partir del día 10 del diagnóstico es poco probable, particularmente en pacientes que presentan una enfermedad leve. La variante ómicron presenta periodos de incubación más cortos, apareciendo síntomas en el día 3 tras la exposición.

1.3 Espectro clínico de la infección por SARS-CoV-2

La presentación clínica de la COVID-19 es muy variable e incluye desde individuos asintomáticos a pacientes con enfermedad grave. Sin embargo, en la mayoría de los casos nos encontramos frente a infecciones de carácter leve. En un informe del Centro Chino para el Control y Prevención de Enfermedades en el que se incluyeron 44.500 pacientes con COVID-19 confirmado se determinó que el 81% fueron infecciones leves, el 14% infecciones graves y el 5% infecciones críticas con presencia de insuficiencia respiratoria severa o fallo multiorgánico (9).

En la infección por SARS-CoV-2 no existen síntomas específicos o signos patognomónicos, no obstante, cabe señalar que los trastornos del gusto y del olfato son más frecuentes en la COVID-19 que en otras infecciones virales (10). Varios estudios de cohortes han recogido un espectro de síntomas similar coincidiendo en aparición y frecuencia con cierta variabilidad. Un informe de 370.000 casos notificados por el *Center of Disease Control and Prevention* informó de la aparición de tos en el 50% de los casos, distermia o fiebre $>38^{\circ}\text{C}$ en el 43%, mialgias generalizadas en el 36%, cefalea en el 34%, disnea en el 29%, odinofagia en el 20%, diarrea en el 19%, náuseas y vómitos en un 12% y anosmia, disgeusia, dolor abdominal y rinorrea en menos de 10% de los casos (11).

Se diferencian por un lado, las infecciones del tracto respiratorio superior que, se pueden manifestar con intensa cefalea holocraneal, astenia, anosmia, disgeusia, odinofagia y rinitis, afectando por lo general a población joven y teniendo en la mayoría de los casos buen pronóstico; e infecciones del tracto respiratorio inferior con presencia de neumonía bilateral, que incluyen síntomas como fiebre, tos y disnea, que se observan predominantemente en pacientes de mediana o avanzada edad con diversas comorbilidades y que conllevan, por tanto, peor pronóstico.

La particularidad de la infección por SARS-CoV-2 es que, en un subgrupo de pacientes, aproximadamente entre el día 8 y el 10 desde el inicio de la sintomatología (12), se puede desarrollar una neumonía intersticial bilateral con lesión alveolar difusa y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que conlleva una mortalidad superior al 50% y constituye la principal causa de muerte (9,13). El SDRA es la complicación más temible en estos pacientes, pero también se han descrito complicaciones cardiovasculares que incluyen arritmias, infartos y shock; complicaciones tromboembólicas; tromboembolismos pulmonares y trombosis venosas profundas especialmente en aquellos pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), con tasas de incidencia que oscilan entre un 10 y un 40% (14); complicaciones neurológicas, siendo la más frecuente la encefalopatía secundaria al propio SARS-CoV-2, accidentes cerebrovasculares y trastornos del movimiento; enfermedades mediadas por autoanticuerpos como Guillain Barré o el síndrome multiinflamatorio multisistémico (15) y, complicaciones de índole infeccioso derivadas de la coinfección o sobreinfección bacteriana y/o fúngica concomitante a la infección por SARS-CoV-2 o debido a la

inmunosupresión derivada de los tratamientos inmunomoduladores empleados en la COVID-19 (16).

Una vez superada la fase aguda existen individuos que presentan secuelas y/o complicaciones derivadas de la infección por SARS-CoV-2, es lo que se ha denominado *long COVID* o COVID persistente cuyas manifestaciones principales son astenia, fatiga, disnea, tos residual, y déficits cognitivos (17).

1.4 Factores pronósticos de enfermedad grave por SARS-CoV-2

En la primera ola de la pandemia se describieron tasas de mortalidad elevadas, que variaron según la localización geográfica, lo que traduce un perfil poblacional diferente entre ellas. En España fue 28%, seguida por Reino Unido con un 26% y de China con 3.2% (18). La enfermedad grave puede desarrollarse en personas sanas de cualquier rango etario, aunque es notablemente más frecuente en varones de avanzada edad con comorbilidades subyacentes: La edad avanzada es un factor de riesgo de enfermedad grave y conlleva indiscutiblemente un aumento de mortalidad en estos pacientes (9,19). En un análisis realizado en el Reino Unido, el riesgo de muerte entre las personas de 80 años fue 20 veces mayor que entre las personas de 50 a 59 años (19). Las comorbilidades que se han asociado con enfermedad grave y por tanto con peor pronóstico son: Obesidad, tabaquismo, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cirrosis hepática, enfermedad renal crónica (20,21) y procesos oncológicos subyacentes, especialmente las hemopatías malignas, el cáncer de pulmón y la enfermedad metastásica (18,21).

Varios estudios han señalado diversas alteraciones analíticas que se comportan como factores de riesgo de mal pronóstico en el desarrollo de COVID-19 grave, convirtiéndose en herramientas imprescindibles en el manejo de esta enfermedad. Se han detectado niveles plasmáticos elevados de lactato deshidrogenasa (LDH), creatinina fosfoquinasa, aspartato y alanina aminotransferasas (GOT y GPT respectivamente). En cuanto a los biomarcadores inflamatorios, se ha observado cifras elevadas de velocidad de sedimentación globular (VSG), ferritina y proteína C reactiva (PCR), sin embargo, los niveles de procalcitonina (PCT) se mantienen dentro de la normalidad, y su elevación debería hacernos sospechar una posible sobreinfección bacteriana. También existe un

aumento trascendente de un amplio abanico de citocinas proinflamatorias, especialmente de IL-6, que comentaremos detalladamente más adelante.

Los niveles elevados de troponina I cardíaca de alta sensibilidad (Tp I) y la aparición de coagulopatía, evidenciada por la alteración de las pruebas de coagulación y los niveles elevados de fibrinógeno y dímero-D, se ha relacionado con enfermedad grave (22), lo que refuerza la idea del papel central que desempeña el daño endotelial en la fisiopatología de la COVID-19. Las complicaciones cardíacas, como por ejemplo el síndrome coronario agudo, son relativamente frecuentes en pacientes con neumonía vírica o bacteriana, y se han reportado en contexto de infecciones por otros virus respiratorios tales como la influenza. En el caso del SARS-CoV-2, Zhou et al evidenciaron elevación de Tp I en más de la mitad de los casos de pacientes fallecidos (20). El dímero D es un indicador analítico de trombosis, pudiendo alterarse en condiciones fisiológicas tales como el embarazo, o en condiciones patológicas como en los estados inflamatorios, procesos oncológicos, traumatismos o cirugías mayores. Más del 90% de pacientes hospitalizados por un cuadro infeccioso mantienen niveles de dímero D >1 ug/ml y su elevación constituye un predictor de mortalidad a corto plazo en pacientes con diagnóstico de sepsis (23). Sin embargo, la mayoría de eventos tromboembólicos graves muestran concentraciones significativas de dímero D. En el caso de la infección por SARS-CoV-2, existe un estado protrombótico de etiología multifactorial, cuyos mecanismos subyacentes incluyen respuestas de citocinas proinflamatorias mediadoras de la aterosclerosis que contribuyen directamente a la ruptura de la placa a través de la inflamación local, la inducción de factores procoagulantes y determinados cambios hemodinámicos que predisponen a isquemia y trombosis. Los pacientes con neumonía COVID-19 grave tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad tromboembólica (24), por lo que el dímero D constituye un biomarcador imprescindible en la evaluación de los pacientes COVID-19.

Es frecuente la linfopenia, la trombocitopenia y la lesión renal aguda (25,26). La linfopenia con o sin leucopenia, está presente en más del 80% de los pacientes críticos, por lo que un recuento de linfocitos $<1,0 \times 10^9/L$ se ha asociado con enfermedad grave (26). Se hipotetiza que el mecanismo subyacente es el daño ocasionado por partículas virales en el citoplasma del linfocito (27). Además, se ha observado que los

casos graves, presentan una proporción mayor de neutrófilos que de linfocitos. El índice de neutrófilos/linfocitos (INL) traduce el estado inflamatorio del paciente y se ha considerado un factor de riesgo en diversas enfermedades oncológicas y autoinmunes (28).

Zhou F et al llevaron a cabo un estudio de cohortes multicéntrico en el que se objetivó que, la edad avanzada, mayor puntuación de la escala SOFA (del inglés *Sepsis related Organ Failure Assessment*) al ingreso y los niveles plasmáticos de dímero D >1 ug/ml se asociaban a mayor mortalidad intrahospitalaria (20). La escala SOFA es un buen marcador diagnóstico y pronóstico de disfunción multiorgánica y, aunque la etiología bacteriana suele ser la principal causa de sepsis, la infección viral también puede actuar como desencadenante de fracaso multiorgánico. En este trabajo los autores observaron un cuadro clínico de sepsis en más de la mitad de los casos, proponiendo como causa directa la acción del SARS-CoV-2.

1.5 Patogénesis del síndrome de liberación de citocinas en la COVID-19

La inflamación implica un entramado de mecanismos biológicos complejos que se ejecutan mediante la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa ante la exposición a un patógeno extraño. Para el desarrollo de una respuesta inmune proporcionada, se necesita el equilibrio entre la producción de biomarcadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Las citocinas son imprescindibles para la coordinación, la regulación y la amplificación de la respuesta inmune, pero su sobreproducción e hiperactivación puede causar lesiones colaterales en diferentes órganos vitales.

El mecanismo patogénico principal implicado en las manifestaciones clínicas graves de la COVID-19 es una respuesta inmune aberrante del huésped que da como resultado una liberación excesiva y descontrolada de citocinas y quimiocinas e hiperactivación del sistema inmune conocida como "tormenta de citocinas" o "síndrome de liberación de citocinas" (SLC). La primera descripción de una tormenta de citocinas fue observada tras la administración de terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (29) y, la primera vez que se acuñó el término de SLC, fue para describir un síndrome similar al anterior tras la infusión de muromonab-CD3 (30). Desde entonces, se ha observado que

dicho trastorno inflamatorio puede desencadenarse por diversas terapias biológicas, patógenos, enfermedades neoplásicas y autoinmunes. También se ha descrito en el seno de otras infecciones virales como la influenza o en algunas cohortes de pacientes con infección por SARS-CoV y MERS-CoV (31,32). Se proponen tres criterios clasificatorios para definir un cuadro de SLC: niveles plasmáticos elevados de citocinas circulantes, síntomas inflamatorios sistémicos y disfunción orgánica secundaria debido a una respuesta fisiológica anómala frente a un patógeno determinado o impulsada por citocinas sin evidencia de un microorganismo específico. La mejoría del cuadro clínico tras la instauración de terapia inmunomoduladora apoyaría el diagnóstico (aunque la falta de respuesta al mismo no descarta dicha entidad) (33). El SLC descrito en el seno de otras entidades se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, citopenias, adenomegalias generalizadas, hipertransaminemia y coagulopatía, pudiendo producirse un cuadro de neumonitis, aunque no es lo más frecuente. A nivel plasmático, se detectan niveles elevados de diferentes citocinas, responsables en parte de dichos hallazgos clínicos y analíticos. Sin embargo, el SLC secundario a la COVID-19 grave tiene como peculiaridad la afectación pulmonar de forma predominante, y la alteración de las pruebas de coagulación, destacando la elevación de los marcadores de trombosis, principalmente del dímero D y el fibrinógeno, frente a la coagulación vascular diseminada objetivada en otros SLC secundarios (34). Estos hallazgos ponen el foco una vez más en la importancia del daño endotelial y la microtrombosis pulmonar extensa que subyacen al SDRA que se desarrolla en la infección por SARS-CoV-2 grave.

En la tormenta citoquímica relacionada con COVID-19 se han detectado niveles plasmáticos elevados de interleucina-1 (IL-1), IL-6, proteína-10 (IP-10), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón- γ (IFN γ), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α y 1 β (MIP 1 α - β) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (12,35), aunque con niveles sustancialmente más bajos de los observados en otros tipos de SLC y en la sepsis. Estas citocinas activan la respuesta mediada por células T colaboradoras tipo 1 promoviendo la inmunidad específica, no obstante, también se han detectado niveles plasmáticos elevados de interleucina-2 y 10, estimuladas por las células T colaboradoras tipo 2 y que tienen un efecto antiinflamatorio (36).

Varios estudios señalan y correlacionan el aumento marcado de citocinas con la lesión pulmonar observada en pacientes críticos (37–39), que se traduce clínicamente como una neumonía intersticial bilateral con diferentes grados de severidad, que puede derivar en SDRA con insuficiencia respiratoria hipoxémica severa y fallo multiorgánico y que constituye la principal causa de muerte de estos pacientes.

Las alteraciones anatomopatológicas que se han observado a nivel local y que, en parte, son derivadas de la tormenta de citocinas incluyen: edema pulmonar, lesión alveolar difusa con presencia de membranas hialinas, hiperplasia reactiva de los neumocitos tipo 2 e infiltración inflamatoria alveolar e intersticial de predominio mononuclear (40). Además, gracias a la microscopia electrónica, se han identificado inclusiones virales de SARS-CoV-2 en el epitelio bronquial y alveolar, independientemente de la presencia de ARN viral en exudado nasofaríngeo. Por tanto, aunque la patogenia del SDRA en la COVID-19 no se comprende completamente, se infiere que las manifestaciones en el tejido pulmonar se deben a la combinación del efecto citopático directo del virus y la inflamación excesiva derivada del mismo.

Entre las moléculas que contribuyen al daño y la inflamación mediada por citocinas, la IL-6 es uno de los factores clave, y su sobreexpresión se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad, el fallo multiorgánico y una menor supervivencia (41). La IL-6 es una citoquina pleiotrópica sintetizada por fagocitos mononucleares, células T activadas, células endoteliales vasculares, fibroblastos y otros tipos celulares en respuesta a microorganismos y a algunas citocinas, fundamentalmente IL-1 y TNF α . Para ejecutar sus funciones, la IL-6 se une a su receptor de membrana (IL-6R) a través de la subunidad B del IL-6R, también denominada gp130, induciendo la dimerización del complejo e iniciándose la señalización intracelular. Sólo las células epiteliales, los leucocitos y los hepatocitos son capaces de expresar IL-6R y activarse mediante esta vía, denominada vía clásica de señalización de IL-6. De forma alternativa, IL-6 también puede unirse a su receptor soluble (sIL-6R) formando un complejo que se unirá a la proteína gp130 transmembrana expresada por todos los tipos celulares, es lo que se denomina vía de trans-señalización de IL-6 (42). El papel de la IL-6 y su efecto en la activación y regulación del sistema inmune es ampliamente conocido, constituyendo un elemento común de varias entidades de etiología inflamatoria. En la inmunidad innata, estimula la síntesis

de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo a la denominada respuesta de fase aguda. En la inmunidad adaptativa, IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B diferenciados en células productoras de anticuerpos. La señalización excesiva de IL-6 induce diferentes efectos biológicos que, además del sistema inmunológico y los mediadores de la inflamación, también involucra a los vasos sanguíneos y al miocardio a través del daño endotelial, contribuyendo al estado protrombótico de estos pacientes. De hecho, los trastornos tromboembólicos son mucho más frecuentes en el SLC en contexto de infección por SARS-CoV-2 que en otros SLC secundarios a otras etiologías (14).

La desregulación del sistema inmune en los casos de COVID-19 severo no corresponde únicamente a la hiperactividad inmunitaria, sino que parece que la persistencia del SARS-CoV-2 y la replicación viral podrían ser un factor clave y contribuir al desarrollo de las manifestaciones graves. Existe correlación entre el ARN viral en exudado nasofaríngeo y los niveles elevados de citocinas plasmáticas, especialmente de IFN α , IFN γ y TNF, lo que sugiere que la carga viral está implicada en el mantenimiento de la inflamación mediante la producción de citocinas y que, la respuesta inmune dependiente de interferones, especialmente la mediada por IFN tipo 1 y 3, pudiera ser insuficiente para el control del virus (43,44).

Por último, cabe mencionar que la variabilidad en la respuesta inmune del huésped frente a la infección depende de varios factores y a menudo es impredecible. La respuesta inmunitaria de los pacientes asintomáticos, que presentan un control efectivo de la enfermedad, es notablemente diferente de los pacientes con COVID-19 grave, en los que se exhibe un fracaso de la misma. Por un lado, probablemente exista una susceptibilidad genética individual que predisponga al desarrollo de enfermedad grave (45) y, por otro lado, sabemos que los factores de riesgo ambientales, sociales y clínicos inherentes al individuo también juegan un papel trascendente en la aparición de enfermedad grave. De hecho, el SLC es más frecuente en pacientes con comorbilidades tales como hipertensión, diabetes, obesidad, tabaquismo activo y enfermedades oncológicas, por lo que se postula que más allá de la enfermedad subyacente, un estado inflamatorio crónico puede contribuir a la desregulación inmune desencadenada por el SARS-CoV-2.

En resumen, la tormenta de citoquinas es una de las principales causas de morbimortalidad en la pandemia COVID-19, siendo de vital importancia la investigación de los mecanismos patogénicos subyacentes, así como nuevos horizontes terapéuticos para su manejo.

1.6 Opciones terapéuticas para frenar el síndrome de liberación de citocinas en la COVID-19

Debido a los diferentes mecanismos patogénicos implicados en la COVID-19, se han recomendado enfoques terapéuticos combinados que incluyen antivirales y fármacos que bloquean vías de señalización implicadas en la inflamación para un control óptimo de la enfermedad.

1.6.1 Corticoides

Los corticoides se han asentado como el tratamiento gold estándar en pacientes COVID-19 que desarrollan insuficiencia respiratoria y requieren soporte con oxígeno suplementario. Al inicio de la pandemia, ante la escasez de evidencia científica de calidad y la ausencia de tratamientos disponibles para la infección por SARS-CoV-2, se comenzaron a utilizar glucocorticoides en los pacientes con COVID-19 grave, con la sospecha de que la respuesta sistémica del huésped jugaba un papel fundamental en las manifestaciones graves y, con el antecedente de haberse utilizado en el pasado como arsenal terapéutico para el tratamiento de ciertas neumonías virales, como es el caso de la influenza, el SARS-CoV o el MERS. La información en cuanto a la eficacia de los esteroides en la infección por SARS-CoV-2, mayoritariamente se extrae de un gran ensayo clínico abierto y controlado, el estudio RECOVERY, en el que se aleatorizó a 6425 pacientes a recibir 6 mg de dexametasona cada 24h además de la terapia estándar durante 10 días frente al tratamiento médico habitual. Los investigadores evidenciaron que, en aquellos pacientes que requerían oxígeno suplementario y recibían dexametasona, la mortalidad a los 28 días fue significativamente menor en comparación con los que recibían otras terapias (46). Sin embargo, el uso de esteroides en pacientes hospitalizados con COVID-19 sin necesidad de oxígeno suplementario no ha demostrado ningún beneficio, incluso se ha asociado con peores resultados (47). No existe demasiada evidencia en cuanto a la utilidad de otros esteroides sistémicos diferentes a

la dexametasona, por lo que su uso, se establece como tratamiento alternativo a la dexametasona.

En aquel momento, los prometedores resultados respecto a la implementación del uso de corticoides abrieron nuevos horizontes, sugiriendo que otros agentes inmunomoduladores también podrían cambiar el rumbo de la COVID-19. La versión preliminar del estudio RECOVERY se publicó en *The New England Journal of Medicine* en julio de 2020 y los resultados finales, fueron publicados en febrero de 2021. Antes de la publicación de los resultados preliminares, nuestro grupo de trabajo ya había diseñado e implementado la metodología de esta investigación.

1.6.2 Tocilizumab

Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado anti-receptor de IL-6, que inhibe la acción de IL-6 mediante el antagonismo del receptor soluble y el receptor transmembrana de IL-6, bloqueando su señalización y reduciendo la inflamación. Existen otros bloqueadores del receptor de IL-6 como el sarilumab (no aprobado en ficha técnica como tratamiento del SLC) y satralizumab, así como inhibidores directos de la molécula IL-6 como siltuximab, sirukumab, clazakizumab y olokizumab.

Las indicaciones terapéuticas de TCZ según la ficha técnica de la Agencia Europea del Medicamento son: artritis reumatoide (AR) grave, activa y progresiva en adultos no tratados previamente con metotrexato; AR activa de moderada a grave en adultos con respuesta inadecuada o intolerancia a un tratamiento previo con uno o más fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o con Anti-TNF α ; artritis idiopática juvenil sistémica y poliarticular a partir de los 2 años de edad que no ha respondido adecuadamente a terapias inmunosupresoras previas; SLC grave o potencialmente mortal inducido en la terapia CAR-T en pacientes adultos y en población pediátrica desde los 2 años de edad. Desde diciembre de 2021, TCZ también está indicado para el tratamiento de la COVID-19 en adultos que reciben corticoides sistémicos y requieren suplemento de oxígeno o ventilación mecánica (48).

El tratamiento con TCZ está contraindicado en personas con hipersensibilidad al mismo, la presencia de una infección moderada o grave activa diferente del SARS-CoV-2, una cifra de neutrófilos <500 células/ul, un recuento plaquetar <50.000 plaquetas/ul,

hipertransaminemia >5 veces del límite superior de la normalidad y en aquellos pacientes que presenten riesgo de perforación gastrointestinal. TCZ tiene un inicio de acción rápido, que se puede objetivar por la rápida reducción de los marcadores inflamatorios, particularmente de los niveles de PCR en las primeras dos semanas de tratamiento. Durante este periodo existe riesgo de padecer infecciones bacterianas graves o complejas, que pueden resultar de difícil diagnóstico debido a la escasa expresividad clínica (ausencia de fiebre) y analítica (inhibición de la PCR), pudiendo retrasar el inicio de una antibioterapia precoz y, por tanto, teniendo un impacto negativo en la morbimortalidad de los pacientes (49).

Existe variabilidad en la práctica clínica habitual y las recomendaciones de los diferentes grupos de expertos, pero por lo general, se propone agregar TCZ al tratamiento habitual con corticoides en los pacientes hospitalizados con neumonía grave (definida por una SpO₂ <94% basal, elevados requerimientos de oxígeno en un corto intervalo de tiempo, uso de cánulas de alto flujo o ventilación mecánica no invasiva (VMNI)) junto con marcadores proinflamatorios elevados, o en las primeras 24h tras intubación orotraqueal y ventilación mecánica invasiva (VMI) o ventilación por membrana extracorpórea (ECMO) (50–52).

Debido a la función destacada de la IL-6 en la fisiopatología de la COVID-19, TCZ fue el primer fármaco propuesto para el tratamiento de las complicaciones inflamatorias en pacientes con enfermedad grave. Los datos preliminares de estudios observacionales realizados en China (53) y en Francia (54) sugirieron la posible eficacia de TCZ en la COVID-19, sin embargo, esta información se limitaba a un número escaso de estudios que incluían principalmente a pacientes gravemente enfermos. Posteriormente, se realizaron otros estudios en los que parecía que TCZ evitaba la progresión a enfermedad grave, implicaba una reducción del uso de VMI y disminuía el tiempo de estancia hospitalaria, pero sin objetivar una clara repercusión en la mortalidad: en un estudio italiano retrospectivo y multicéntrico que incluyó 544 pacientes, el tratamiento con TCZ se asoció con una reducción del 39% en la necesidad de VMI y en la mortalidad (55). En el proyecto EMPACTA, un ensayo clínico doble ciego realizado en 6 países de Europa, América del norte y África, se comparó el uso de TCZ frente al tratamiento estándar, observándose también una reducción del 44 % en el riesgo de progresión a VMI, ECMO

o muerte en el día 28 (56). Estos datos fueron apoyados por el ensayo clínico aleatorizado CORIMUNO, en el que se incluyeron 130 pacientes con neumonía COVID-19 moderada y grave, y en el que se objetivó que el 36% de los pacientes con tratamiento estándar en el día 14 progresaban a VMNI o muerte frente al 24% de los que fueron tratados con TCZ. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad en el día 28 (57).

Por otro lado, también se notificaron resultados contradictorios en cuanto a la eficacia de TCZ. En el BACC Bay, un estudio doble ciego que enfrentó la terapia con TCZ con la estándar, no se observaron beneficios en cuanto a la mejoría clínica, necesidad de VMNI, muerte o en el tiempo hasta retirada del oxígeno. Sin embargo, es cierto que al ser de los primeros ensayos clínicos con TCZ, publicado en diciembre de 2020, muy pocos pacientes se trataron de forma concomitante con esteroides o remdesivir (58). En el estudio COVACTA, ensayo clínico doble ciego en fase 3 realizado en 9 países de Europa y América del Norte, se comparó el tratamiento con TCZ frente a placebo con el objetivo primario de evaluar la mejoría clínica y la supervivencia en el día 28. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas, no obstante, se observó que la estancia hospitalaria en planta de hospitalización y en la UCI fue menor en el grupo de TCZ (59).

La evidencia científica actual sugiere que el tratamiento con TCZ aporta un claro beneficio en la mortalidad de los pacientes con neumonía COVID-19. En un metaanálisis que incluyó 27 ECAs con más de 10.000 pacientes hospitalizados con COVID-19, la mortalidad por todas las causas fue menor entre los que recibieron TCZ en comparación con el placebo o el tratamiento estándar (52,60). Esta información científica está extraída básicamente de dos grandes ensayos en pacientes con neumonía COVID-19 grave; en el estudio RECOVERY, un ensayo clínico doble ciego abierto que comparó el uso de TCZ en pacientes con SpO₂ <92% y niveles de PCR ≥75 mg/dl frente a la terapia estándar en pacientes de Reino Unido, se concluyó que el tratamiento combinado de glucocorticoides y TCZ mejora la supervivencia a los 28 días en comparación con la terapia estándar habitual, 31% frente a 35 % respectivamente, (Riesgo relativo (RR) 0,85, IC 95 % 0,76-0,94). Además, la mortalidad en el día 28 entre los pacientes que requirieron VMI fue de 49% en el brazo de TCZ frente al 51% en grupo con tratamiento habitual (RR 0,93; IC 95 %, 0,74–1,18), y necesitaron menor soporte ventilatorio, un 35%

frente al 42% (razón de tasas 0,84; IC del 95%, 0,77-0,92) respectivamente. También se evaluó la duración de la estancia hospitalaria, que fue de 19 días en el grupo de TCZ frente a 28 días en el otro brazo (61). El otro gran estudio sobre el que se basan las recomendaciones es el REMAP-CAP, ensayo clínico abierto y de plataforma adaptativa, realizado en 21 países de Europa y América del norte, en el que se evaluó la eficacia de TCZ y sarilumab en pacientes ingresados en UCI frente al tratamiento estándar. El uso de ambos anti-IL-6 en las primeras 24h de ingreso en UCI se asoció con tasas más altas de supervivencia y menor duración de soporte de órganos frente al tratamiento estándar, especialmente en el subgrupo de pacientes que mostraron niveles plasmáticos más elevados de PCR. No hubo diferencias en cuanto a eficacia entre TCZ y sarilumab (62). Paralelamente a la publicación de los datos de las terapias anti-IL-6 en el estudio REMAP-CAP, se publicó otro estudio internacional realizado en 11 países de Europa, América del Norte, América del Sur y Asia en el que se valoraba la eficacia de sarilumab y no se evidenció beneficio ni en la supervivencia ni en el tiempo hasta la mejoría clínica (63). Se propone el uso de sarilumab como segunda opción de tratamiento inmunomodulador si no hubiera disponibilidad de TCZ (64).

Cabe señalar que tanto en el REMAP-CAP como en el RECOVERY el tratamiento estándar incluía dexametasona y, sin embargo, en algunos ensayos disponemos de resultados mixtos, incluyendo la falta de beneficio de TCZ cuando el tratamiento estándar no engloba los glucocorticoides. Posiblemente la heterogeneidad de la población sea la responsable de la discordancia de resultados entre estudios, con gran variabilidad en la estratificación de riesgo de los pacientes y de las terapias concomitantes empleadas.

Los efectos adversos relacionados con TCZ reportados durante la pandemia, se han recogido en una base de datos mundial denominada Vigibase® perteneciente a la OMS (65). Charan et al analizaron los datos de farmacovigilancia extraídos de Vigibase® en un intervalo de 6 meses en el año 2020, y describieron un total de 1005 efectos adversos en 513 pacientes, apreciando que son más frecuentes en los varones menores de 45 años. En términos generales concluyen que TCZ es un fármaco seguro y con pocos efectos secundarios; la neutropenia y la hipofibrinogenemia fueron las alteraciones hematológicas más frecuentes. La elevación de las enzimas hepáticas también es relativamente frecuente, pero se trata de una alteración dosis dependiente y transitoria.

La hepatitis y la perforación gastrointestinal son eventos muy poco comunes. También se observaron alteraciones en el intervalo QT. Las sobreinfecciones y coinfecciones bacterianas y/o víricas, así como la reactivación de infecciones latentes fueron efectos adversos comunes encontrados en los pacientes COVID-19 tratados con TCZ (66).

Tras la publicación y lectura del estudio de Xu et al y previo al conocimiento de los datos de mortalidad de los ensayos clínicos anteriormente descritos, ante la ausencia de un tratamiento eficaz para la COVID-19 y la necesidad de abrir nuevos horizontes terapéuticos en un momento de gran incertidumbre, planteamos esta investigación. En marzo de 2020, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios otorgó una autorización de uso de emergencia para el uso de TCZ en el contexto de COVID-19, y nuestro centro desarrolló pautas específicas para el tratamiento de pacientes que requieren ingreso hospitalario. Las guías institucionales incluyeron el uso de TCZ en una etapa temprana de la enfermedad, según criterios predefinidos, evaluando resultados clínicos, biológicos y virológicos.

1.6.3 Inhibidores de JAK

Baricitinib, un inhibidor de la Janus quinasa, clásicamente utilizado en el tratamiento de la AR, es un fármaco que combina el efecto inmunomodulador y antiviral frente al SARS-CoV-2; A través de la inhibición de esta vía de señalización, interviene en la activación de múltiples citocinas proinflamatorias, entre las que se incluye la IL-6. Por otro lado, el efecto antiviral, se produce a través de la inhibición de la quinasa 1 asociada a AP2 (AAK1) y la quinasa asociada a ciclina G (GAK), que participan en la endocitosis del SARS-CoV-2 (67). En el ensayo clínico RECOVERY, se evidenció un claro beneficio en la supervivencia en los pacientes que recibieron tratamiento con dexametasona y baricitinib (68). Además, baricitinib demostró ser eficaz en combinación con la terapia estándar en pacientes graves que requieren soporte con oxígeno suplementario, VMNI, VMI u ECMO (69). Los resultados del ensayo ACTT-2 sugieren que el uso combinado de baricitinib y remdesivir aceleraría la recuperación de los pacientes con COVID-19 en comparación con remdesivir en monoterapia, y los del ensayo COV-BARRIER sugieren un beneficio en cuanto a supervivencia, ambos particularmente evidentes entre los pacientes que reciben oxigenoterapia de alto flujo o VMNI (70). No debe administrarse

de forma concomitante con un antagonista de IL-6, dado que no disponemos de ECAs que incluyan ambas terapias (aunque hubo algunos pacientes en el estudio RECOVERY que recibieron triple terapia con baricitinib, TCZ y dexametasona). Tofacitinib, un fármaco miembro de la misma familia que podría utilizarse en caso de que baricitinib no estuviera disponible.

1.7 Aclaramiento viral y respuesta humoral en la infección por SARS-CoV-2

Las infecciones virales agudas se caracterizan por aumentos rápidos de la carga viral (CV) que provocan daño celular y el desarrollo de la respuesta inmune antiviral innata y adaptativa que originan tanto inflamación local como sistémica. Por lo general, las infecciones virales requieren de la integridad de la respuesta inmune celular para su eliminación, sin embargo, la respuesta humoral también es crucial, ya que a través de la producción de anticuerpos específicos frente al virus se desarrollará la inmunidad protectora para prevenir la reinfección. Además de la actividad antimicrobiana, los anticuerpos modulan la respuesta inmune a través de la activación del complemento, los receptores *toll-like* y Fc-gamma (71). Los anticuerpos neutralizantes generados en la infección por SARS-CoV-2, aquellos que van a desempeñar la principal función defensiva, suelen dirigirse mayoritariamente al dominio de la subunidad S1 que contiene el RBD (del inglés *Receptor Binding Domain*) de la proteína S.

En la COVID-19, IgM e IgA específicas contra la proteína de espiga (S) están presentes en la mayoría de los casos en las primeras dos semanas de infección, detectándose la IgG aproximadamente a partir del día 14. La variabilidad de la respuesta humoral es muy heterogénea entre individuos, aunque en la mayoría de ellos se despliega a lo largo de los dos primeros meses (72). Generalmente, acorde con lo ocurrido en otras infecciones virales, los niveles de anticuerpos neutralizantes disminuyen en los meses consecutivos a la infección, de hecho, las cifras de estos se ven reducidas entre 5 y 10 veces a los cinco meses desde su título máximo (73). Los primeros estudios publicados sugerían que la actividad neutralizante se mantenía al menos de seis a ocho meses tras el diagnóstico (74,75). En trabajos posteriores se han detectado títulos de anticuerpos hasta los 18 o 20 meses tras la infección en ausencia de vacunación o evidencia de reinfección por SARS-CoV-2 (76). En brotes anteriores por otros coronavirus, se objetivó que la

respuesta de anticuerpos en pacientes con infección por MERS-CoV podía durar más allá de 34 meses tras el inicio de síntomas (77) y, en el caso del SARS-CoV, podían detectarse anticuerpos en el 89% de los pacientes a los 36 meses desde el diagnóstico (78).

La respuesta inmunitaria protectora frente a SARS-CoV-2 requiere una función sincronizada de las células específicas T CD4+ y CD8+ así como de las células B contra las proteínas virales. Los pacientes COVID-19 con infección grave tienen más probabilidades de tener respuestas inmunitarias desreguladas. Tanto si tienen una respuesta inmunitaria sincronizada o desincronizada, existe una correlación clara entre la intensidad de la enfermedad y la producción de anticuerpos, tanto IgG como IgM e IgA (aunque estos últimos tengan una naturaleza transitoria), observándose niveles más elevados y precoces en aquellos pacientes con manifestaciones clínicas graves (79,80). Otro dato a favor de esta observación es que, en un 20-30% de los pacientes con infección leve no se evidencia producción de anticuerpos más allá de la segunda semana de infección (79,80). La hipótesis que se plantea para explicar este hallazgo es que el estado de hiperinflamación desencadenado en la infección grave, podría producir una respuesta inmune más robusta con hiperproducción de anticuerpos por parte del linfocito B. Valores elevados de citocinas plasmáticas, especialmente IL-6, no solo se relacionan con enfermedad grave, sino que también se asocian con un título de anticuerpos mayor. Algunos expertos especulan que títulos de anticuerpos tan desmesurados pueden relacionarse con una baja potencia neutralizadora como consecuencia de la desregulación inmune. De hecho, los niveles de IL-6 en pacientes con enfermedad grave se han asociado con un menor potencial de neutralización (81).

Sin embargo, además de la gravedad de la infección, existen otros factores de riesgo, que podrían afectar a la respuesta de anticuerpos frente al SARS-CoV-2, como son las comorbilidades del paciente, el sexo masculino, los tratamientos previos, así como las terapias inmunomoduladoras empleadas frente al propio COVID-19 (82–84). Se han detectado niveles superiores de IgG en pacientes varones con enfermedad grave. Las implicaciones biológicas que tiene el sexo en la inmunidad son todavía desconocidas, pero una posibilidad que explique este fenómeno podría ser la mayor expresión del receptor ACE 2 (79). También se ha relacionado de forma directa el grado de afectación pulmonar en la TC torácica con la tasa y el nivel de respuesta de anticuerpos, sugiriendo

que la extensión de las lesiones pulmonares podría predecir la respuesta humoral incluso en pacientes con PCR de SARS-CoV-2 negativa (85).

El comportamiento de la carga viral del SARS-CoV-2 es similar al de la influenza, alcanzando su punto álgido en el momento de aparición de los síntomas, contrastando con el del SARS-CoV, que se produce en el día 10 desde el inicio de los síntomas (86) y con el MERS-CoV, cuyo cenit es a partir de la segunda semana del inicio de la clínica (87). La CV elevada en el momento de presentación de la infección sugiere que la transmisibilidad máxima se produce al inicio de los síntomas o incluso en el período presintomático. Dicho hallazgo, combinado con el aislamiento de virus viables en muestras del tracto respiratorio en la primera semana de la infección, asegura una elevada contagiosidad, y enfatiza la importancia del aislamiento respiratorio en etapas precoces. Una revisión sistemática y metaanálisis realizada por Cevik M et al, concluyó que, es posible detectar ARN viral en los pacientes con infección por SARS-CoV-2 hasta el día 83 desde el inicio de los síntomas, no obstante, dicho hallazgo no es sinónimo de viabilidad, ya que no se aisló ningún virus vivo más allá del día 9 a pesar de la detección de ARN viral persistentemente positiva. Al igual que lo ocurre con otros virus respiratorios, la carga viral puede ser similar entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, pero la mayoría de publicaciones recogen que la eliminación viral es más rápida en los asintomáticos. La eliminación viral prolongada se relaciona con la edad avanzada (88).

Los pacientes graves presentan una CV más elevada que los enfermos con infección leve por SARS-CoV-2, lo que podría tener implicaciones en el desarrollo de las manifestaciones clínicas y, a su vez, una CV elevada también se relaciona con una producción precoz de anticuerpos (20). Se ha detectado ARN viral en suero de pacientes críticos, aunque con niveles menos elevados que en el tracto respiratorio (89).

La persistencia del virus en determinados reservorios tisulares y la ineficacia del sistema inmune para eliminarlo es una de las hipótesis empleadas para explicar la patogenia del *long-COVID* (73).

1.7.1 Bloqueo anti-IL6: repercusiones en la cinética viral y respuesta inmunitaria del SARS-CoV-2

Los efectos del bloqueo de la IL-6 sobre la cinética viral y la respuesta humoral del SARS-CoV-2 son prácticamente desconocidos. Debido a que se han utilizado múltiples estrategias terapéuticas que afectan a diferentes vías del sistema inmune en pacientes con perfiles clínicos variados y con tratamiento antiviral coadyuvante, es difícil extraer información individualizada sobre el impacto de la terapia anti-IL-6, en concreto con TCZ, en pacientes con neumonía COVID-19.

Como se ha señalado con anterioridad, IL-6 es una molécula multifuncional que se encarga de regular la inmunidad innata y adaptativa, destacando la estimulación y la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos y las funciones de los macrófagos/monocitos (90). Este hecho es particularmente preocupante debido a la estrecha correlación que existe entre la gravedad de la enfermedad, los niveles plasmáticos de IL-6 y la carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 (89). Además, IL-6 también juega un papel importante en la diferenciación de las células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en la secreción de inmunoglobulinas, por tanto, la terapia anti-IL-6 podría afectar a la respuesta de anticuerpos específicos contra el virus, pudiendo comprometer la eliminación viral y la protección contra futuras reinfecciones. Se han notificado infecciones virales graves causadas por citomegalovirus y varicela zoster en pacientes con AR y tratamiento con TCZ (91), y también infecciones bacterianas, fúngicas y oportunistas en pacientes COVID-19 tratados con TCZ, lo que justifica la incertidumbre existente en el impacto de este tratamiento en la inmunidad y la precaución a la hora de implementarlo.



2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA





2. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

La IL-6, junto a otras citocinas proinflamatorias, es imprescindible en la respuesta inmune frente al SARS-CoV-2 y, paradójicamente, su sobreexpresión desencadena un estado hiperinflamatorio, que es el responsable de las manifestaciones graves de la COVID-19.

En el periodo que se planteó este proyecto de investigación, todavía no disponíamos de la información y de los resultados en cuanto a mortalidad del tratamiento con TCZ en pacientes con neumonía COVID-19 obtenidos en los grandes ensayos clínicos RECOVERY y REMAP-CAP anteriormente citados (61,62). En nuestra investigación, planteamos que, la administración precoz de tocilizumab en pacientes seleccionados antes de que la desregulación inmune y la trombo-inflamación características de la COVID-19 sean irreversibles es segura, y puede tener un impacto positivo en la morbimortalidad de los pacientes, disminuyendo el riesgo de desarrollar enfermedad grave.

A pesar del extenso conocimiento científico que se ha desarrollado en los últimos tiempos sobre la COVID-19 y la terapia inmunomoduladora, todavía quedan por dilucidar varias cuestiones. En primer lugar, si efectivamente la administración de TCZ en una etapa más temprana de la enfermedad podría prevenir el síndrome de liberación de citocinas sin efectos adversos para el paciente. Una segunda pregunta que nos planteamos e intentamos responder con este proyecto es, si podría haber predictores de una mayor probabilidad de respuesta a TCZ para seleccionar los candidatos más adecuados para dicha terapia y diseñar estrategias alternativas para los no respondedores de manera anticipada. En tercer lugar, conocemos el papel que juega la IL-6 en la diferenciación de la célula B en célula plasmática productora de anticuerpos, por lo que el bloqueo de IL-6 podría afectar a la respuesta humoral contra el virus y comprometer la eliminación viral. Actualmente apenas existe bibliografía sobre el efecto y la repercusión del TCZ en la respuesta inmune humoral y el aclaramiento viral en la infección por SARS-CoV-2.



3. HIPÓTESIS





3. HIPÓTESIS

La instauración precoz del tratamiento con tocilizumab en pacientes con neumonía COVID-19 es segura y beneficiosa para prevenir el desarrollo de SDRA, teniendo un impacto favorable en la morbimortalidad de los pacientes y ausencia de impacto negativo en el aclaramiento viral y la respuesta humoral.





4. OBJETIVOS





4. OBJETIVOS

El objetivo general será evaluar los efectos del tratamiento precoz con TCZ en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.

Los objetivos específicos serán:

- Evaluar la seguridad del tratamiento precoz con TCZ en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.
- Analizar los predictores de respuesta al tratamiento precoz con TCZ en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.
- Analizar la dinámica viral del SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 tratados y no tratados con TCZ.
- Analizar la respuesta de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 tratados y no tratados con TCZ.





5. MATERIAL Y MÉTODOS





5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño

Estudio de cohortes prospectivo y longitudinal en pacientes hospitalizados entre el 10 de marzo y el 17 de abril de 2020 con neumonía COVID-19 en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche (Alicante).

5.2 Sujetos y ámbito de estudio

De todos los ingresos hospitalarios por COVID-19, se incluyeron aquellos pacientes con COVID-19 confirmado y probable según los criterios del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>). La confirmación microbiológica se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) a partir de un frotis nasofaríngeo o un aspirado bronquial.

Criterios de inclusión:

- Todos los pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía COVID-19 que cumplan 1 criterio clínico y/o radiológico y/o biológico:
- Criterios clínicos: CURB-65 > 2 o SpO₂ < 93% o frecuencia respiratoria (FR) > 30 por minuto.
- Criterios radiológicos: infiltrados intersticiales bilaterales multilobares de predominio bibasal y distribución periférica, infiltrados reticulares o lobares.
- Criterios biológicos: Dímero D ≥ 0.7 μg/L, IL-6 ≥ 40 pg/ml, Linfocitos < 800 x 10⁹ x L, Ferritina ≥ 700 μg/L, PCR > 25 mg/L o fibrinógeno > 700 mg/dl.

Criterios de exclusión:

- AST/ALT valores superiores a 5 veces el valor normal.
- Cifra de neutrófilos inferior a 500 cel/μL.
- Cifra de plaquetas inferior a 50.000 cel/μL.
- Sepsis documentada por otros patógenos diferentes de SARS-CoV-2.
- Diverticulitis complicada o perforación intestinal.
- Hipersensibilidad al principio activo o alguno de sus excipientes

- Negación a la administración del tratamiento
- Limitación del esfuerzo terapéutico.

5.3 Protocolo de actuación

Los pacientes fueron tratados de acuerdo con un protocolo predefinido que consistía en la recopilación de datos epidemiológicos, demográficos y clínicos, así como la recogida de muestras nasofaríngeas seriadas para el SARS-CoV-2, radiografía de tórax y análisis de sangre de rutina, que incluía niveles de IL-6, ferritina, LDH, magnesio, PCT, PCR, pro-hormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP), T_p I, dímero D y pruebas de coagulación. Se recopilaron al ingreso las comorbilidades y la puntuación en el índice de comorbilidad de Charlson (ICC). Las muestras de sangre para los análisis de laboratorio, electrocardiograma, radiografía de tórax y muestras nasofaríngeas para SARS-CoV-2 se obtuvieron en diferentes momentos durante la hospitalización, y posteriormente, al mes, a los seis meses y a los 12 meses tras al alta hospitalaria. Además del SARS-CoV-2, también se realizaron análisis de PCR en exudado nasofaríngeo para los virus de la influenza A, B y para el virus respiratorio sincitial, antígenos en orina de neumococo y legionela, pruebas serológicas para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C y B y realización de QuantiFERON-TB[®]. Se recogieron muestras de suero para la medición de niveles de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 y se congelaron a -80°C.

La terapia para la COVID-19 se administró siguiendo las pautas institucionales. Los pacientes recibieron terapia antimicrobiana y / o inmunomoduladora en relación con el protocolo de nuestro centro hospitalario (ver anexo 2). De acuerdo con este, se agregó TCZ 600 mg por vía intravenosa si el peso era ≥ 75 kg o 400 mg si el peso era < 75 kg, al tratamiento inicial si se cumplía alguno de los criterios de inclusión mencionados anteriormente.

Se calificó el tratamiento con tocilizumab como precoz porque los sujetos necesitaban cumplir tan sólo 1 de los criterios clínicos, radiológicos o biológicos para el inicio del tratamiento. Los pacientes fueron reevaluados en las siguientes 24 horas y recibieron una segunda dosis de 400 mg de TCZ o bolus de corticosteroides intravenosos en caso

de que no se hubiese logrado una respuesta clínica, definida como ausencia de fiebre, desaparición de la taquipnea, mejoría de la SpO₂ al menos un 5%, mantenimiento de la fracción de oxígeno inspirado (FiO₂), descenso de la PCR de al menos un 25% o ausencia de progresión radiológica (ver tabla 1 complementaria).

Una vez dados de alta, el seguimiento de los pacientes se centralizó a nivel ambulatorio en las consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Se programaron visitas presenciales durante el período agudo de la COVID-19, es decir a las 4 semanas-primer mes tras el alta y, posteriormente, visitas presenciales a medio y largo plazo, es decir a los 6 y 12 meses respectivamente. En cada una de estas visitas, se obtuvieron muestras de sangre para mediciones bioquímicas y seroviológicas.

5.4 Análisis microbiológicos

5.4.1 Medición del ARN del SARS-CoV-2

Para la extracción de ARN y el análisis de RT-PCR para SARS-CoV-2, se utilizaron hisopos de exudado nasofaríngeo en 3 mL de medio de transporte (VICUM[®], Deltalab, Rubí, España). Se extrajo ARN viral de 350 µl del medio usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), obteniendo una muestra final de elución de ácido nucleico de 50 µl. Se utilizaron ocho µl de ARN para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, con un kit comercial disponible (Allplex[™] 2019-nCoV Assay, Seegene, Seúl, Corea) para la detección de los genes E, RdRP y N. Se realizaron mediciones de carga viral de muestras nasofaríngeas (log₁₀ copias/muestra) con una curva estándar de diluciones seriadas diez veces mayores a partir de una transcripción de ARN in vitro (Macrogen, Seúl, Corea). El procedimiento de ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante, en un termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, California, EE. UU.). El éxito de la extracción de ARN y la PCR se evaluó mediante el control interno incluido en el kit y se utilizaron controles negativos y positivos en cada ensayo.

5.4.2 Medición de anticuerpos frente al SARS-CoV-2

Se detectaron tanto los anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) contra el dominio S1 de la proteína S como los anticuerpos IgG-N e IgG-S en muestras de plasma con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) utilizando técnicas comerciales habituales. Los anticuerpos totales se detectaron mediante una técnica inmunométrica (VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack usado en combinación con el VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Calibrator, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, EE. UU.) en un sistema automatizado (VITROS XT 7600 Integrated System) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detectaron IgG-N (ELISA Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG, Euroimmun, Lubeck, Alemania) e IgG-S (ELISA Anti-SARS-CoV-2 IgG, Euroimmun, Lubeck, Alemania) mediante inmunoensayo enzimático semicuantitativo comercial en un sistema automatizado (sistema Dynex DS2 ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de anticuerpos se evaluaron calculando la relación de la densidad óptica (DO) de la muestra del paciente sobre la DO del calibrador ($DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del calibrador} = S / CO$ [absorbancia/punto de corte]). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: el cociente $\leq 1,1$ se definió como negativo y el cociente $> 1,1$ como positivo.

5.5 Variables

Variables de resultado principal:

Variables de respuesta clínica a tocilizumab:

- Mortalidad global durante el ingreso
- Ingreso en UCI
- Aumento de la escala SOFA >2 respecto a la que presentaba al ingreso.

Variables para la evaluación de la dinámica viral del SARS-CoV-2:

- Cuantificación del ARN de SARS-CoV-2 10 log copias/muestra en exudado nasofaríngeo, esputo, tracto respiratorio inferior o heces.

- Umbral de ciclo categorizado en: <36; 36-38; > 38.
- Tiempo hasta el aclaramiento viral

Variables para la evaluación de la respuesta de anticuerpos del SARS-CoV-2:

- Medición del título de anticuerpos IgG frente SARS-CoV-2.
- Pico de anticuerpos S-IgG, S/CO
- Pico de anticuerpos N-IgG, S/CO
- Tiempo hasta la seroconversión

Variables predictoras:

Variables demográficas: Edad, Sexo.

Variables clínicas:

Comorbilidades: HTA, DM, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria previa, EPOC, enfermedad renal previa, Infarto agudo de miocardio (IAM), Accidente cerebrovascular (ACV), enfermedad arterial periférica, Insuficiencia cardíaca congestiva.

Índice de Comorbilidad de Charlson.

Tabaquismo activo

Días desde el inicio de los síntomas.

Puntuación de la escala SOFA al ingreso

Puntuación de la escala SOFA previa administración de TCZ

Constantes vitales:

- Tensión arterial sistólica, diastólica y media
- Temperatura
- SpO2
- Saturación periférica de oxígeno/Fracción de oxígeno inspirado (PaFI)

Necesidad de oxigenoterapia suplementaria al ingreso

Estudios analíticos en sangre: Se realizaron determinaciones de los siguientes parámetros analíticos de forma seriada cada 48h según el protocolo.

- Linfocitos
- Índice neutrófilos/linfocitos
- LDH
- PCR
- Ferritina
- IL-6
- Dímero D
- NT proBNP
- Tp I

Infiltrados pulmonares bilaterales: Evidenciados mediante radiografía de tórax y/o tomografía computarizada.

Tratamiento antimicrobiano y/o inmunomodulador:

- Lopinavir/ritonavir
- Interferón B1b
- Metilprednisolona
- Azitromicina
- Hidroxicloroquina
- Remdesivir

Días de estancia hospitalaria

5.6 Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como mediana \pm percentiles 25 y 75 (Q1, Q3), y las variables categóricas como porcentajes. Para la comparación de grupos en las variables continuas se utilizó la prueba de Wilcoxon o la t de Student, y la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para la comparación de grupos en las variables categóricas. La normalidad de las muestras de datos se evaluó mediante la prueba de

Shapiro-Wilk. Las razones de probabilidad (OR) se estimaron a través de modelos lineales generalizados con respuesta binaria y función de enlace logit. Para representar los cambios temporales de los niveles de los biomarcadores, se emplearon modelos de regresión polinómica local utilizando mínimos cuadrados ponderados para estimar el rendimiento de cada biomarcador según el día desde que se inició TCZ. Las diferencias en las tendencias temporales entre los biomarcadores se analizaron a través de modelos mixtos lineales en los que se incluyó un término de interacción del día desde el inicio y la respuesta de TCZ. Los intervalos de confianza (IC) para el área bajo la curva característica operativa del receptor (AUC de la curva ROC) se calcularon a través de réplicas de arranque estratificadas con 2000 intentos. Se seleccionaron los valores de corte de los biomarcadores plasmáticos medidos a las 48h después del inicio de TCZ con mejor sensibilidad (S) y especificidad (E) para discriminar la evolución clínica favorable o desfavorable de los pacientes.

Se utilizaron las curvas de Kaplan Meier y la prueba de rango logarítmico bilateral para evaluar las diferencias en la duración de la excreción viral y la positividad de anticuerpos entre los pacientes que recibieron y los que no recibieron terapia anti-citocinas. Para equilibrar los grupos de tratamiento, se ajustó mediante un *propensity score* con una proporción de 1:1 entre los grupos. Las covariables con un valor de $p < 0,05$ en la comparación bruta entre los grupos de tratamiento se usaron para el emparejamiento. Para ajustar aún más las covariables que permanecieron desequilibradas entre los grupos de tratamiento después del emparejamiento, se realizó una regresión de riesgos proporcionales de Cox que incluía las variables estadísticamente diferentes.

El análisis estadístico se realizó utilizando R-project versión 3.6.2 (2019-12-12) y las bibliotecas ggplot2 para las figuras.



6. RESULTADOS





6. RESULTADOS

6.1 Características basales de los pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19

Durante el periodo de estudio, 193 pacientes adultos fueron ingresados con neumonía COVID-19. De ellos, 89 recibieron TCZ, y 64 cumplieron los criterios de inclusión siendo seleccionados para el análisis; 55 de ellos tenían infección por SARS-CoV-2 confirmada por RT-PCR. La mortalidad global de la cohorte (IC del 95%) fue del 5,6 (3-10) %; 4,5 (1,5-11,7) % en los pacientes que recibieron TCZ, y no se produjo ninguna muerte en los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión.

Las características basales de los pacientes incluidos se muestran en la Tabla 1. La mediana (Q1-Q3) de edad fue de 62 (56-74) años, y 47 (73%) eran hombres. La mayoría (61%) de los pacientes tenían comorbilidades, principalmente HTA (34%), enfermedad cardiovascular (14%), DM (14%) y EPOC (5%), con una mediana (Q1-Q3) de puntuación en el ICC de 2 (1-4). La mediana (Q1-Q3) de la puntuación SOFA fue de 1,5 (1-2), y la mediana (Q1-Q3) del número de días desde el inicio de la enfermedad hasta el ingreso hospitalario fue de 10 (7-14). El tratamiento antimicrobiano y/o inmunomodulador administrado durante la estancia hospitalaria se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Hallazgos demográficos, clínicos y de laboratorio al ingreso de los pacientes incluidos

Variables&	Todos		Muerte, ingreso en UCI o SOFA≥3				OR (IC 95%)	P valor§
			Sí		No			
Pacientes, n.	64		15		49		-	-
Hombre, n. (%)	47	(73)	13	(86)	2	(13)	2.86 (0.57-14.31)	0.317
Edad, años	62	(56-74)	77	(68-85)	60	(53-69)	1.10 (1.04-1.16)	0.002
Condiciones coexistentes								
Charlson-CCI	2	(1-4)	3	(1-3)	1	(1-2)	1.51 (1.13-2.01)	0.005
Ninguna#, n. (%)	39	(61)	11	(73)	28	(57)	2.06 (0.57-7.39)	0.266
Hipertensión, n. (%)	22	(34)	7	(47)	15	(31)	1.98 (0.61-6.47)	0.256
Diabetes, n. (%)	9	(14)	5	(33)	4	(8)	5.62 (1.27-24.76)	0.022
Enfermedad cardiovascular*, n. (%)	9	(14)	3	(20)	6	(12)	1.79 (0.38-6.33)	0.454
EPOC, n. (%)	3	(5)	2	(13)	1	(2)	0.13 (0.01-1.61)	0.072

Días desde el inicio de los síntomas	10	(7-14)	9	(4-15)	11	(8-14)	0.94 (0.84-1.06)	0.337
Signos vitales								
Temperatura corporal, °C	36.5	(36.1-36.9)	36.9	(36.4-37.3)	36.4	(36.1-36.7)	4.64 (1.14-15.23)	0.011
Presión arterial sistólica, mmHg	120	(113-134)	135	(123-148)	120	(112-129)	1.06 (1.02-1.11)	0.003
Presión arterial diastólica, mmHg	74	(70-81)	80	(67-87)	74	(70-80)	1.02 (0.97-1.07)	0.419
Presión arterial media \bar{E}	92	(86-99)	99	(90-104)	91	(83-96)	1.08 (1.01-1.15)	0.032
Oxígeno Suplementario, n. (%)	54	(84)	14	(93)	40	(82)	3.15 (0.36-27.14)	0.296
SpO2, porcentaje.	96	(95-97)	95	(94-96)	96	(95-97)	0.64 (0.42-0.98)	0.040
SpO2/FIO2	346	(337-365)	342	(339-360)	346	(335-365)	0.99 (0.98-1.01)	0.281
Escala SOFA	1.5	(1-2)	2	(2-2)	1	(1-2)	16.2 (1.99-131.74)	0.009
Infiltrados pulmonares bilaterales n. (%)	47	(73)	11	(73)	36	(73)	0.76 (0.19-2.92)	0.695
Hallazgos de laboratorio								
Linfocitos, x103/ μ L	1.06	(0.82-1.57)	0.99	(0.71-1.29)	1.12	(0.83-1.61)	1.26 (0.84-1.87)	0.250
Índice neutrófilos/linfocitos	2.5	(1.8-5.3)	8.1	(3.7-11.2)	2.4	(1.4-3.3)	1.21 (1.05-1.40)	0.009
Proteína C-reactiva, mg/L	50	(18-91)	85	(52-148)	45	(18-76)	1.01 (0.99-1.01)	0.126
IL-6, pg/ml	85	(39-181)	108	(45-241)	84	(23-159)	1.01 (0.99-1.01)	0.507
Dímero D, μ g/MI	0.83	(0.46-1.73)	1.36	(0.7-2.13)	0.61	(0.46-1.19)	0.98 (0.77-1.23)	0.875
Lactato deshidrogenasa, U/L	243	(193-297)	280	(232-329)	240	(188-278)	1.01 (1.01-1.01)	0.041
Ferritina, ng/mL	439	(307-634)	448	(323-596)	438	(301-648)	0.99 (0.99-1.01)	0.674
Troponina I cardíaca-HS, n. (%) \forall	10	(18)	4	(31)	6	(14)	2.81 (0.65-12.10)	0.164
NT-proBNP, pg/mL	82	(36-188)	85	(10-303)	80	(41-171)	1.00 (0.99-1.01)	0.777
Tratamiento coadyuvante antimicrobiano/inmunomodulador, n. (%)								
Combinaciones basadas en HDQ	64	(100)	15	(100)	49	(100)	-	-
Azitromicina	60	(94)	14	(93)	46	(94)	1.09 (0.10-11.3)	0.938
Lopinavir/ritonavir	63	(98)	14	(93)	49	(100)	10.2 (0.39-256.1)	0.091
Remdesivir	0	-	-	-	-	-	-	-
Interferón- β -1b	11	(17)	4	(27)	7	(14)	0.16 (0.03-0.82)	0.019
Metilprednisolona $\&$	11	(17)	2	(13)	9	(18)	1.46 (0.28-7.65)	0.653
Seguimiento								

SpO ₂ /FIO ₂ (48 horas)	346	(323-359)	312	(273-354)	350	(339-358)	0.98 (0.97-0.99)	0.032
Proteína C-reactiva (48 horas), mg/L	22	(8-44)	46	(32-81)	16	(7-37)	1.02 (1.01-1.03)	0.011
Oxígeno suplementario (48 horas), n. (%)	50	(78)	14	(93)	36	(74)	5.05 (0.60-42.3)	0.135
Oxígeno suplementario (7 días), n. (%)	43	(67)	14	(93)	29	(59)	9.65 (1.17-79.4)	0.035
Progresión radiológica	13	(20)	3	(20)	10	(20)	0.97 (0.23-4.19)	0.973
SOFA ≥3 durante el seguimiento, n. (%)	12		12		-		-	-
Ingreso en UCI	3		3		-		-	-
Muerte	0		-		-		-	-

&Valores expresados como mediana (rango intercuartílico) a menos que se indique lo contrario. §P valor obtenido a partir de modelos de regresión logística univariados. #Cardiovascular (i.e., hipertensión, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad cardiovascular y enfermedad arterial periférica), respiratorio (i.e., enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], asma), insuficiencia renal crónica, inmunosupresión, malignidad, cirrosis hepática, enfermedad sistémica autoinmune o diabetes mellitus. *Enfermedad cardiovascular distinta de la hipertensión. & Ciclos cortos de metilprednisolona 0.5-1 mg/kg/día dividido en dos dosis intravenosas durante 3 días. †La presión arterial media se calculó como (2/3-presión arterial diastólica) + (1/3-presión arterial sistólica). ‡ Los valores de troponina I cardíaca- HS estaban disponibles en 57 pacientes (44 y 13 en grupos favorables y desfavorables, respectivamente). Debido a que estaban desviados a la izquierda, resultaron muy pocos casos con valores por encima del límite superior de la normalidad e impidió el cálculo de los índices de probabilidad informativos y los intervalos de confianza del 95 %, la variable se clasificó con un punto de corte de 0,2 ng/mL. UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; Charlson-CCI, Índice de Comorbilidad de Charlson; SpO₂, saturación por oximetría de pulso; FIO₂, fracción de oxígeno inspirado; SOFA, Evaluación Secuencial de Fallo Orgánico; HCQ, hidroxiquinona; IL-6, interleucina- 6; NT-proBNP, péptido natriurético tipo B N-terminal Pro.

6.2 Efectos de tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19

Después de la administración del tratamiento con TCZ, 49 (76,6%) pacientes tuvieron una respuesta favorable y 15 (23,4%) desfavorable o un resultado adverso, definido como un aumento en la puntuación SOFA > 2 puntos respecto a la puntuación inicial medida a las 48-72 h o en el día 7 (12 pacientes; 18,8%), ingreso en UCI (3 pacientes, 4,7%) o muerte (0 pacientes).

Los pacientes con respuesta favorable a TCZ eran más jóvenes (60 [53-69] vs 77 [68-85] años, $p = 0,002$), tenían un ICC significativamente más bajo (1 [1, 2] vs 3 [1, 3], $p = 0,005$), menor frecuencia de DM (4 [8%] frente a 5 [33%], $p = 0,022$), menor presión arterial media (91 [83-96] frente a 99 [90-104] mmHg, $p = 0,032$) y presión arterial sistólica (120 [112-129] frente a 135 [123-148] mmHg, $p = 0,003$), menos grados de temperatura axilar, mayor SpO₂ (96 [95-97] % frente a 95 [94-96], $p = 0,040$), una puntuación SOFA más baja (1 [1, 2] vs 2 [2-2], $p = 0,009$), un INL inferior (2,4 [1,4-3. 3] vs 8,1 [3,7-11,2], $p = 0,009$), y niveles más bajos de LDH (240 [188-278] vs 280 [232-329] U/L, $p = 0,041$).

Los respondedores a TCZ habían recibido con menor frecuencia interferón-β-1b (7 [14%] vs 4 [27%], $p = 0,019$), sin diferencias entre los grupos en cuanto a la frecuencia de tratamiento con metilprednisolona. Entre los 55 pacientes que cumplían los criterios de

inclusión con infección por SARS-CoV-2 confirmada por RT-PCR, hubo 43 (78,18%) respondedores y 12 (21,82%) no respondedores. Cuando se compararon ambos grupos, los resultados fueron similares a los observados en los 64 pacientes que componían la muestra completa del estudio (Tabla 1 complementaria).

6.3 Evaluación de la seguridad del tratamiento con tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19

No hubo recurrencias de la enfermedad después de la interrupción de TCZ en el periodo estudiado. Tampoco se observó ningún efecto adverso relacionado con la administración de TCZ durante la hospitalización ni en la visita de seguimiento a las 4 semanas. No se produjo trombopenia, neutropenia o hepatitis severa, tampoco se describió ningún evento de tipo perforación intestinal o sepsis documentada por otros patógeno diferentes del SARS-CoV-2, que condicionaran la interrupción del tratamiento con TCZ. Se describió un solo caso de coinfección bacteriana demostrada microbiológicamente (traqueobronquitis purulenta por *Pseudomonas aeruginosa* asociada a VMI y bacteriemia por *Enterococcus faecalis* de origen urinario) en el seno del tratamiento con TCZ en un paciente con diagnóstico de adenocarcinoma de colon en tratamiento quimioterápico activo, ingresado por neumonía COVID-19 grave con necesidad de VMI, estancia prolongada en la UCI y tratamiento concomitante con bolus de metilprednisolona además del anti-IL-6.

6.3 Predictores de respuesta al tratamiento con tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19

La Tabla 2 muestra el análisis de regresión logística multivariante para identificar predictores independientes de respuesta a TCZ.

El modelo mostró que el sexo masculino (OR 6,70; IC 95 % 1,05–42,96), un INL > 2,55 (OR 4,55; IC 95 % 1,03–20), mayor puntuación en la escala SOFA (OR 6,05; IC 95 % 1,27–28,8 por unidad de aumento), una presión arterial sistólica más alta (OR 1,07; IC 95 % 1,01–1,14 por mmHg) y mayor puntuación en el ICC (OR 1,35; IC 95 % 1,03–1,79 por

unidad de aumento), se asociaron con un resultado desfavorable tras la administración de TCZ. En un análisis de sensibilidad que incluyó solo a los 55 pacientes con infección por SARS-CoV-2 confirmada por RT-PCR, las variables significativas en el modelo multivariante ajustado fueron un INL > 2,55 (OR 5,26; IC 95% 1,02-25), mayor puntuación en el ICC (OR 1,56; IC 95 % 1,04–2,34) por unidad, y una puntuación SOFA más alta (OR 5,05; IC 95 % 1,10–23,24) (Tabla complementaria 2).

Tabla 2. Predictores de resultado desfavorable tras inicio de tocilizumab en análisis de regresión logística multivariable.

Variable	OR (IC 95%)	P valor
Sexo masculino	6.70 (1.05-42.96)	0.045
Charlson-ICC, por unidad	1.35 (1.03-1.79)	0.032
Presión arterial sistólica, por mmHg	1.07 (1.01-1.14)	0.027
Escala SOFA, por unidad	6.05 (1.27-28.8)	0.024
Índice Neutrófilos/linfocitos >2.55	4.55 (1.03-20)	0.045
Índice plaquetas/Dímero D <200	3.05 (0.81-11.45)	0.098

La respuesta desfavorable se definió como alcanzar una puntuación SOFA > 2 durante la estancia hospitalaria, el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos o la muerte. Charlson-ICC, Índice de Comorbilidad de Charlson; SOFA, Evaluación Secuencial de Fallo Orgánico.

6.4 Comportamiento de los biomarcadores de inflamación en pacientes hospitalizados por neumonía COVID-19 tratados con tocilizumab

La Figura 1 muestra los cambios a lo largo del tiempo de varios biomarcadores plasmáticos en respondedores y no respondedores a TCZ analizados mediante regresión polinomial local. La no respuesta a TCZ se asoció con un aumento de IL-6 no observado en los respondedores ($p < 0,001$), y lo mismo ocurrió con los niveles de dímero D ($p = 0,003$), INL ($p < 0,001$) y del NT-proBNP ($p = 0,02$). Para la relación plaquetas/ dímero D, los niveles iniciales fueron significativamente más bajos en los que no respondieron ($p = 0,005$), aunque las tendencias no fueron significativamente diferentes entre los grupos. Los niveles de PCR disminuyeron en ambos grupos, y la disminución tendió a ser más rápida en los que respondieron a TCZ ($p = 0,07$).

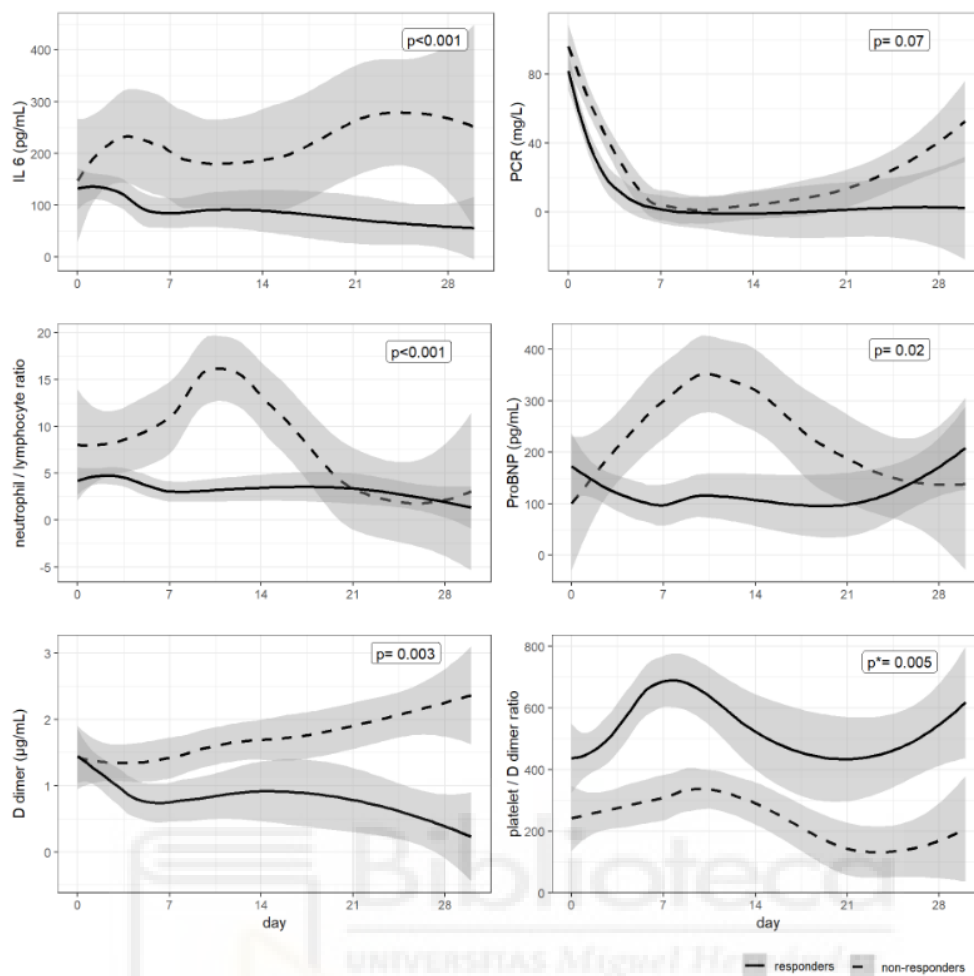


Figura 1. Evolución temporal en los niveles de varios biomarcadores en respondedores y no respondedores a tocilizumab analizados mediante regresión polinomial local. Valores de p para la comparación de las tendencias temporales entre respondedores y no respondedores. *Valor de p para la comparación de los niveles basales del biomarcador entre respondedores y no respondedores. No se observaron diferencias significativas en las tendencias temporales entre los grupos. Límite LOD de detección.

6.5 Predictores clínicos y biológicos precoces de respuesta a tocilizumab (evaluados a las 48h de su administración) en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19

La tabla 3 muestra el análisis ROC para identificar biomarcadores plasmáticos y variables clínicas que, medidas a las 48 h después del inicio de TCZ, discriminaron mejor entre una evolución clínica posterior favorable o desfavorable.

Los mejores predictores entre los biomarcadores fueron la PCR, el cociente plaquetas/ dímerno D y la Tp I. A las 48 h del inicio de TCZ, un valor de PCR superior a 25 mg/dL (E, 86 %; S, 68 %; AUC [IC 95 %] 0,78 [0,63-0,92]), un índice plaquetas/ dímerno D superior a 343 (E, 92; S, 61 %; AUC [IC 95 %] 0,73 [0,59–0,87]) y una Tp I superior a 0,02 ng/ml (E,

82 %; S, 58 %; AUC [IC 95%] 0,74 [0,57–0,91]) predijeron significativamente una respuesta al tratamiento posterior desfavorable.

Un valor de corte > 5 de una puntuación compuesta que incluyó 10 variables clínicas y biológicas (tabla 3) mostró una E del 90 % y una S del 91 % para predecir resultados adversos, con un AUC [IC del 95 %] de 0,96 (0,91–1,00). Un análisis de sensibilidad que incluyó solo a los 55 pacientes con infección microbiológicamente confirmada mostró un AUC [IC del 95 %] significativo para la PCR (0,80 [0,65–0,96]), el cociente plaquetas/dímero D (0,73 [0,59–0,87]), el INL (0,71 [0,52–0,86]) y la LDH plasmática (0,73 [0,55–0,90]) (Tabla complementaria 3).

Tabla 3. Análisis ROC del rendimiento de los biomarcadores séricos y variables clínicas a las 48 horas del inicio de tocilizumab sobre la evolución de los pacientes.

Variable	Valor absoluto a las 48 horas			
	AUC (IC 95%)	Valor Punto de corte	E	S
Proteína C-Reactiva	0.78 (0.63-0.92)	25 mg/L	86	68
IL-6	0.65 (0.42-0.88)	177 pg/mL	63	79
Índice neutrófilo/linfocito	0.67 (0.48-0.86)	5.3	64	79
Lactato deshidrogenasa	0.66 (0.47-0.84)	307 U/L	50	89
Troponina I cardíaca HS	0.74 (0.57-0.91)	0.02 ng/mL	82	58
Plaquetas	0.68 (0.49-0.86)	182 x103/ μ L	50	92
Índice plaquetas/dímero D	0.73 (0.59-0.87)	343	92	61
SpO2	0.81 (0.69-0.93)	96 %	93	69
SpO2/FiO2	0.70 (0.53-0.88)	334	67	79
Presión arterial sistólica	0.69 (0.54-0.84)	120 mmHg	88	50
Resultado compuesto*	0.96 (0.91-1.00)	5.5	90	91
Resultado compuesto simplificado**	0.91 (0.91-0.82)	1.5	83	99

La respuesta desfavorable se definió como alcanzar una puntuación SOFA > 2 durante la estancia hospitalaria, el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos o la muerte. IL-6, Interleucina 6; Tp I HS, alta sensibilidad; AUC, Área bajo la curva ROC; IC, Intervalo de confianza; E, Especificidad (%); S, Sensibilidad (%). *Puntuación compuesta utilizando las variables PCR, IL-6, INL, LDH, Tp I cardíaca HS, plaquetas, Índice plaquetas/Dímero D, SpO2, SpO2/FiO2 y presión arterial sistólica. ** Puntuación compuesta utilizando las variables IL-6, plaquetas, SpO2 y SpO2/FiO2.

6.6 Dinámica viral del SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 en relación al tratamiento con tocilizumab

Para analizar la implicación del TCZ en la dinámica del ARN viral y la respuesta humoral del organismo frente al SARS-CoV-2 se seleccionaron 210 pacientes ingresados en el hospital por neumonía COVID-19 en el periodo anteriormente citado. Un total de 138 (65,7%) pacientes tenían infección confirmada con RT-PCR en una muestra distinta de las heces; 133 (96,4%) en muestras nasofaríngeas (6 pacientes con resultado también positivo en esputo y 4 en aspirado bronquial), y 5 (3,6%) en esputo. De ellos, a 76 (55%) se les administró tratamiento con TCZ.

Los pacientes sometidos a bloqueo de la IL-6 mostraron valores iniciales de umbral de ciclo (Ct) significativamente más bajos y una mediana de CV más alta. En una visita de seguimiento después del alta, tras una mediana (Q1-Q3) de 39 (31-62) días y 31 (30-44) días desde el ingreso en los pacientes con y sin bloqueo de la IL-6 respectivamente, 43 (57,3%) y 44 (78,6%) mostraron niveles indetectables de ARN de SARS-CoV-2 ($p = 0,015$), y el número de pacientes con dos resultados negativos consecutivos fue de 23 (30,7%) y 32 (57,1%) respectivamente ($p = 0,004$). En el caso de los pacientes que habían logrado el aclaramiento viral, la mediana (Q1-Q3) de tiempo hasta que la CV se negativizó fue de 39,0 (18,0 a 40,0) días frente a 35,0 (10,8-45,0) días en los pacientes con y sin tratamiento con anticitocinas respectivamente ($p = 0,734$).

Las curvas de Kaplan Meier mostraron una mayor probabilidad de desaparición del SARS-CoV-2 durante el seguimiento entre los no usuarios de anticitocinas: HR 0,35 [IC 95%, 0,15-0,81], log-rank $p = 0,013$ para la eliminación del virus (Figura 2a).

El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox ajustado por la carga viral inicial y la puntuación SOFA mostró que la relación del bloqueo de la IL-6 con la eliminación del virus se debilitó significativamente (HR 0,60 [IC 95%, 0,21-1,70], $p = 0,34$). También objetivó que los niveles iniciales de CV (HR 0,56 [IC 95%: 0,36-0,87], $p = 0,01$), pero no la puntuación SOFA (HR 1,28 [IC 95%: 0,00-1,26], $p = 0,20$) se asociaban con el aclaramiento viral. Estos resultados se ajustaron mediante un *propensity score*, con el objetivo de examinar más a fondo el efecto del bloqueo de IL-6 en la eliminación del virus después de equilibrar los grupos de tratamiento. Se incluyeron en el ajuste las

covariables con un valor $p < 0,05$ en la comparación entre los grupos de tratamiento con anticitocinas. El modelo seleccionó un total de 58 participantes (29 en cada grupo) con diferencias residuales, por lo que se ajustó, además, por las covariables que seguían sin estar equilibradas entre los grupos con un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox, concretamente con los niveles al ingreso de IL-6, ferritina, PCR, linfocitos y de la carga viral. También se incluyó el tratamiento con metilprednisolona para evaluar su efecto en la eliminación del virus. En el modelo ajustado, la asociación del bloqueo de la IL-6 con la eliminación del virus siguió siendo no significativa: HR 1,68 (0,36-7,81), $p = 0,510$) (Figura 2b). En un análisis de no inferioridad, el tratamiento con TCZ demostró no ser inferior a no recibirlo para lograr la eliminación del virus ($p = 0,018$), considerando que el tratamiento con TCZ era no inferior si la HR del modelo ajustado era mayor de 0,33.



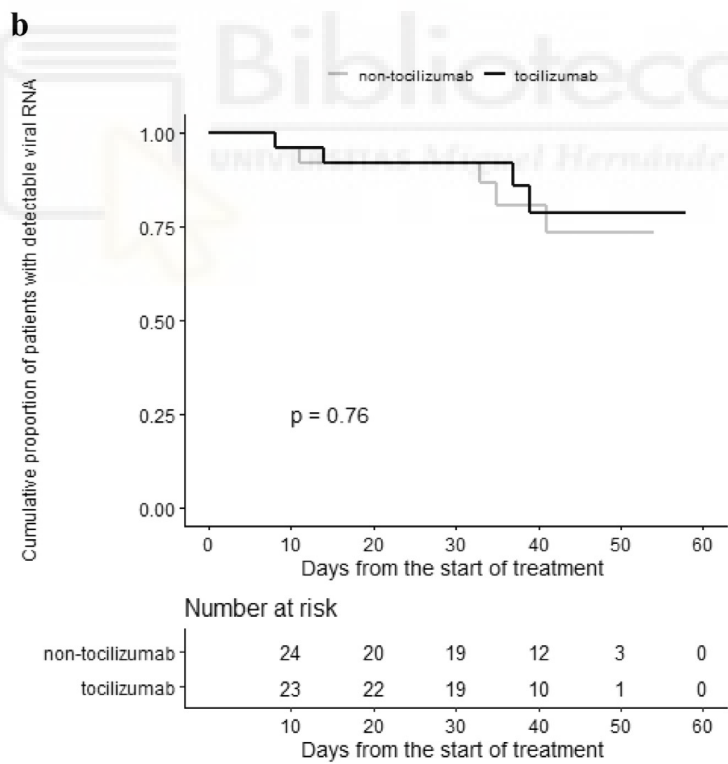
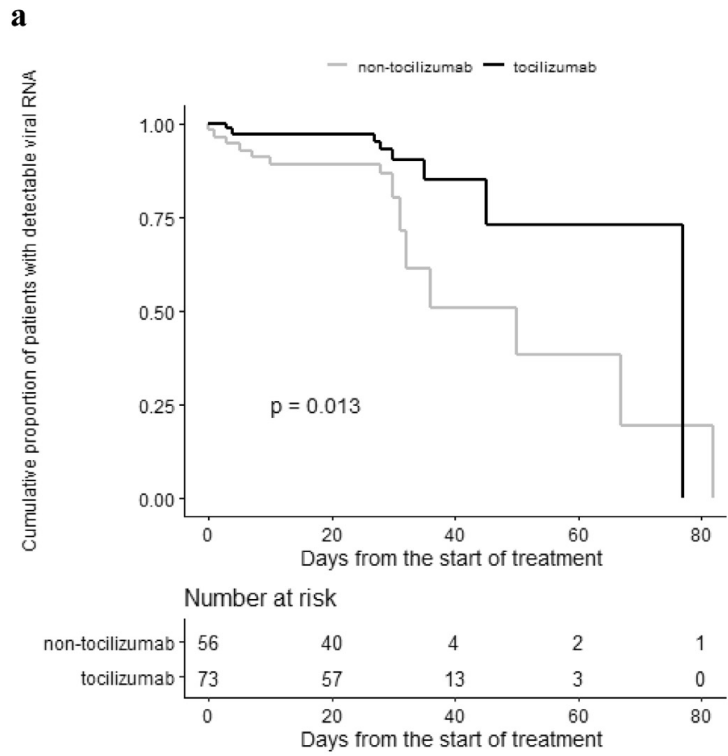


Figura 2. Curva de Kaplan Meier para estimar la proporción acumulada de pacientes con ARN viral detectable según el tratamiento con tocilizumab. (a) Sin ajustar. (b) Ajustada (test de Wald).

6.7 Respuesta de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 en relación al tratamiento con tocilizumab

De los 181 pacientes con muestras serológicas disponibles, finalmente se incluyeron para el análisis 120 con muestras de seguimiento (Figura suplementaria 1). De ellos, 73 (60,8%) pacientes fueron sometidos a bloqueo de la IL-6. La proporción de pacientes que recibieron tratamiento inmunomodulador con anticuerpos S-IgG y N-IgG positivos fue del 94,5% (n = 69) tras una mediana (Q1-Q3) de 35 (28-60) días desde el inicio de los síntomas frente al 55,3% (n = 26) ($p < 0,001$) tras 31 (29-42,5) días en los pacientes no tratados. La mediana (Q1-Q3) del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la seropositividad para la S-IgG en los pacientes que recibían el tratamiento anti-IL-6 fue de 14 (11-17) días frente a 17 (15-24) días ($p = 0,014$) en los pacientes no tratados (Figura 3a); y 12 (9-14) y 15 (11,2-20,2) días, respectivamente, para la N-IgG ($p = 0-017$) (Figura 3b).

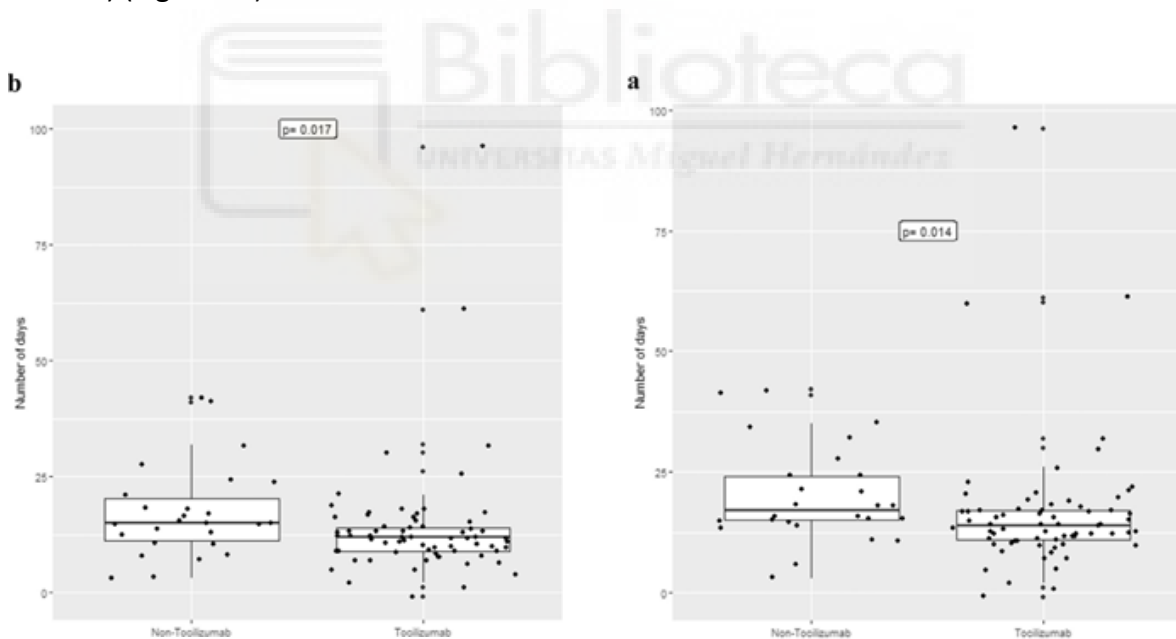


Figura 3. Mediana de tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la seropositividad en pacientes tratados y no tratados con tocilizumab (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon). (a) S-IgG. (b) N-IgG.

Los títulos máximos de S-IgG entre los pacientes con o sin terapia anticitocínica fueron de 6,4 (5,9-7,1) frente a 2,7 (0,1-6,3) S/CO ($p < 0,001$) (Figura 4a); y los títulos máximos de N-IgG fueron de 4,5 (3,7-5,0) y 2,8 (0,1-4,7) S/CO, respectivamente ($p < 0,001$) (Figura 4b).

Cuando se excluyeron los pacientes que no habían alcanzado niveles detectables de anticuerpos, los títulos máximos de S-IgG en los pacientes tratados y no tratados con anti-IL-6 fueron de 6,4 (5,8-7) frente a 6,1 (5-6,6) S/CO ($p = 0,037$) (Figura 4c); y los títulos máximos de N-IgG fueron de 4,6 (4,0-5,0) frente a 4,6 (4-5,0) S/CO, respectivamente ($p = 0,877$) (Figura 4d).

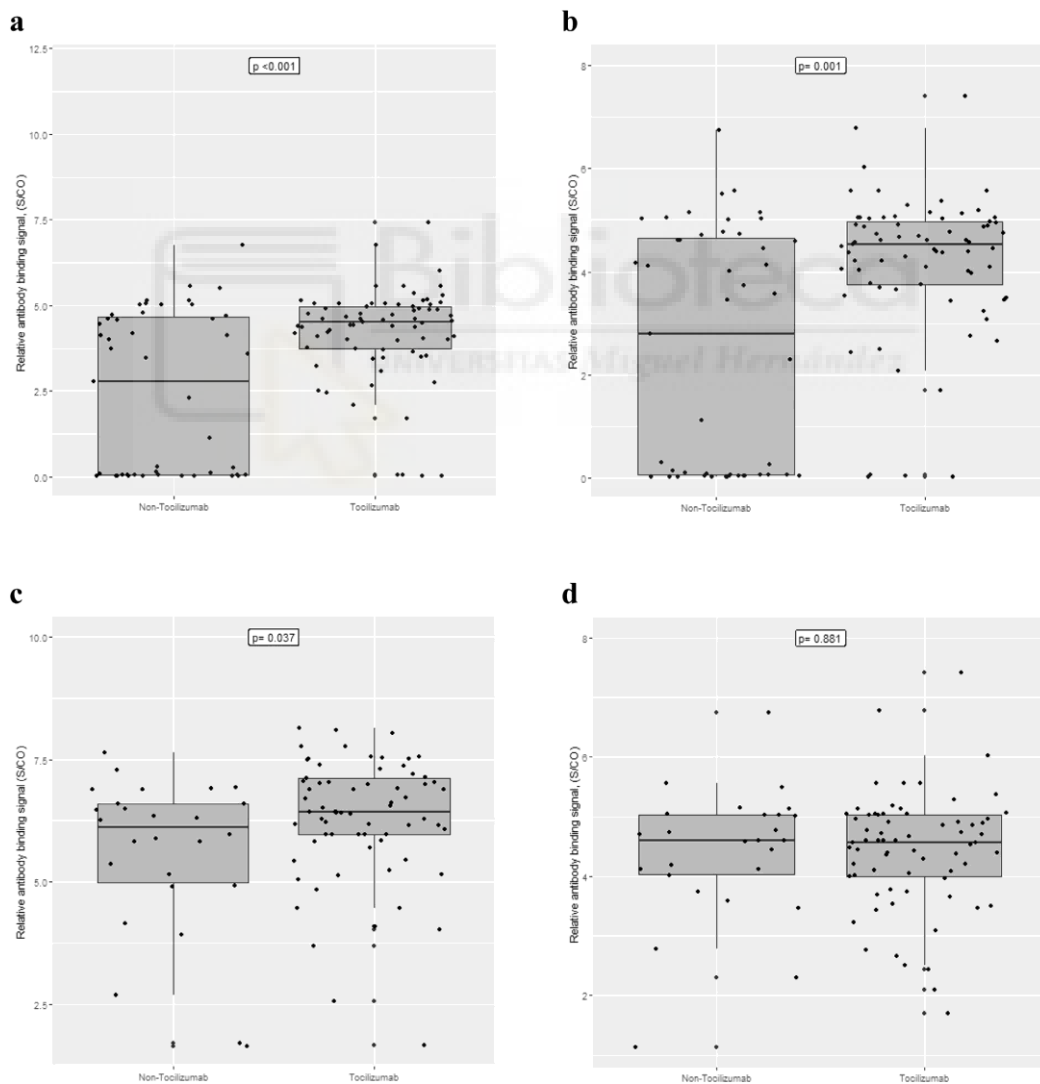


Figura 4. Títulos de IgG según el tratamiento con tocilizumab (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon). (a) Pico de IgG. (b) Pico de N-IgG. (c) Pico de S-IgG tras excluir a los no seroconvertidores. (d) Pico de N-IgG tras excluir a los no seroconvertidores.

Las curvas de Kaplan Meier mostraron una mayor proporción acumulativa de pacientes con niveles detectables de anticuerpos entre los que recibían tratamiento con anticitocinas (HR [IC 95%] 3,1 [1,9-5], $p < 0,001$ para S-IgG y HR 3 [1,9-4,9], log-rank $p < 0,001$ para N-IgG) (Figuras. 5a y 5b). Se reajustó realizando un *propensity score* que seleccionó 46 participantes (23 en cada grupo). En la muestra final ajustada mediante el sexo, la carga viral, el índice SAFI, la puntuación SOFA al ingreso, los niveles de IL-6, ferritina y linfocitos, el ICC y el tratamiento con metilprednisolona, para evaluar su efecto sobre la producción de anticuerpos, no se encontró una asociación significativa del bloqueo de la IL-6 con la respuesta de la S-IgG o la N-IgG: el HR para la seropositividad de S-IgG con el uso de anti-IL-6 fue 1,66 (0,45-6,12) ($p = 0,444$) y de 1,05 (0,30-3,70) para la N-IgG ($p = 0,939$) (Figuras. 5c y 5d). En un análisis de no inferioridad, el tratamiento con TCZ demostró ser no inferior a no recibirlo para la respuesta de S-IgG ($p = 0,007$) y de N-IgG ($p = 0,049$), considerando que el tratamiento con TCZ era no inferior si el HR del modelo ajustado era mayor de 0,33.



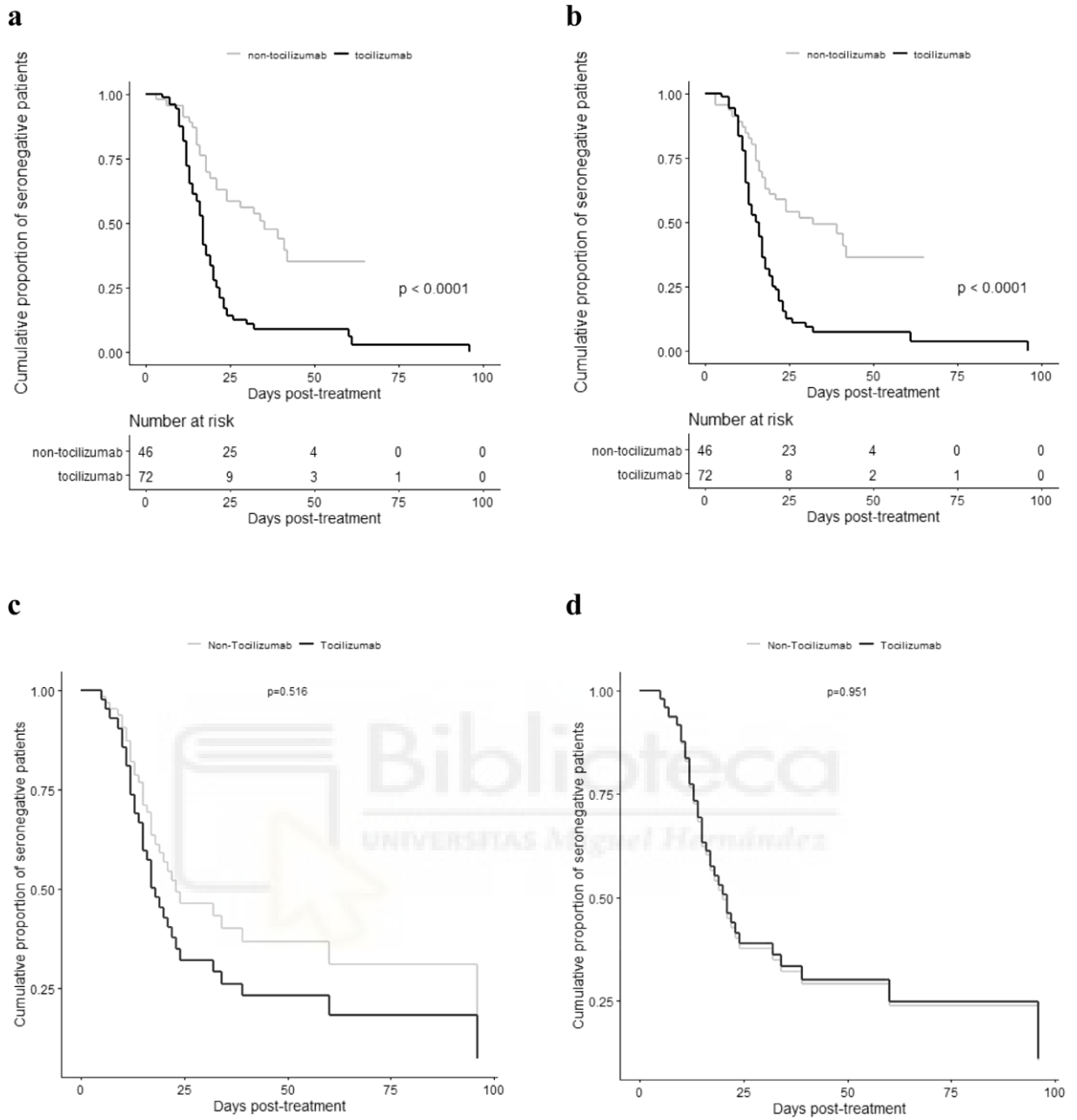
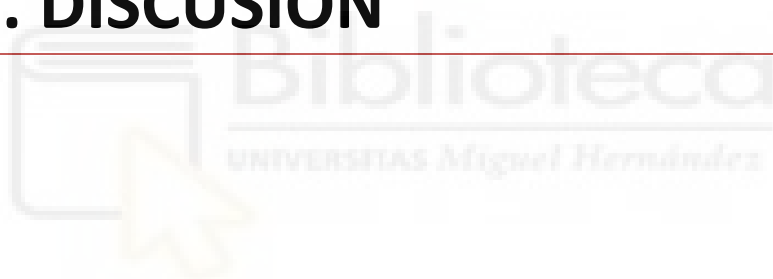


Figura 5. Curva de Kaplan Meier para estimar la proporción acumulada de pacientes con títulos negativos de IgG según la terapia con tocilizumab. (a) S-IgG (sin ajustar). (b) N-IgG (sin ajustar). (c) S-IgG (ajustada) (test de log-rank). (d) N-IgG (ajustada) (prueba de rango logarítmico)

7. DISCUSIÓN



7. DISCUSIÓN

En esta cohorte de pacientes ingresados con COVID-19 en los que se utilizó TCZ en una etapa temprana de la enfermedad, la tasa de mortalidad fue baja. En los estudios previos se incluyeron pacientes graves, con tasas de mortalidad que oscilaban entre el 10 y el 20% (92–94), con la excepción de un estudio que incluyó 20 pacientes, donde no hubo ninguna muerte (53). Nuestros resultados respaldan que el inicio precoz del tratamiento con TCZ es seguro a corto y medio plazo, y podría estar asociado con un resultado favorable en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19, como lo refleja la baja mortalidad general observada en toda nuestra cohorte, inferior al 21,8% de la mortalidad descrita en pacientes hospitalizados en España <https://www.mscbs.gob.es/es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/situacionActual.html> (95) .

Identificamos predictores clínicos y biológicos tempranos de respuesta a TCZ, que podrían contribuir a seleccionar estrategias alternativas para los individuos no respondedores de forma anticipada. Encontramos que la falta de respuesta a TCZ se asoció con una puntuación SOFA y una presión arterial sistólica más elevadas al ingreso, así como con mayor puntuación en la escala de Charlson. La respuesta inicial tras la administración de TCZ y los niveles plasmáticos basales de algunos biomarcadores también fueron útiles para predecir el resultado clínico; un INL inferior al ingreso, una proporción más baja de plaquetas/dímero D y niveles séricos más bajos de Tp I a las 48 horas de TCZ, se asociaron con una respuesta favorable al anti-IL-6. Asimismo, el rendimiento de varios biomarcadores después de la administración de TCZ se reveló útil para discriminar entre los individuos respondedores y no respondedores. Específicamente, los niveles de IL-6, el INL, dímero D y el NT-proBNP, así como la relación plaquetas/ dímero D, mostrando un aumento en los no respondedores que no se observó en los respondedores.

Analizamos los niveles basales y seriados a lo largo del tiempo, de los biomarcadores de inflamación, coagulación y función miocárdica, en un protocolo de días alternos durante la estancia hospitalaria y a los 30 días tras el ingreso. Descubrimos que los niveles iniciales de diferentes biomarcadores permitían la predicción de la respuesta ulterior a

TCZ. Un INL más bajo al ingreso se asoció con una respuesta favorable a TCZ después de ajustar por otras covariables de predicción. Este biomarcador, tal y como se ha comentado con anterioridad, es un reflejo la inflamación excesiva y la desregulación de las células inmunitarias que desempeñan un papel central en el control de la infección viral, (96) y se ha asociado con mayor mortalidad en pacientes hospitalizados con COVID-19 (28). El INL ha demostrado ser un factor importante en la predicción temprana de progresión a enfermedad grave y una herramienta útil para la estratificación del riesgo de gravedad (97). Nuestros hallazgos apoyan el papel central del INL en la predicción de la respuesta a TCZ, y también sugieren que el inicio anticipado de la terapia con TCZ, antes de que se desencadene una tormenta de citocinas catastrófica, podría mejorar el pronóstico de los pacientes con neumonía COVID-19.

Además de los niveles basales al ingreso, encontramos que la respuesta inicial de algunos biomarcadores después de la administración de TCZ también predijo el resultado clínico de la enfermedad. A las 48h de la infusión, un valor de PCR con un punto de corte de 25 mg/dl, mostró una elevada especificidad y una sensibilidad de moderada a alta para predecir una respuesta posterior favorable, acorde con lo expuesto concomitantemente en otros trabajos (98). Lo mismo se observó para la proporción plaquetas/ dímero D y el valor de T_p I, con un punto de corte de 343 y de 0,02 ng/ml, respectivamente, aunque en este caso la sensibilidad fue justa. La alteración de biomarcadores de coagulación y daño miocárdico refleja la patogenia multifactorial de la COVID-19, y su potencial reversibilidad con la terapia anti-IL-6 ofrece la posibilidad de frenar el desarrollo de enfermedad. La evolución de varios biomarcadores después de la administración del fármaco fue otro factor que contribuyó a caracterizar al grupo de pacientes respondedores a TCZ. Los niveles de la IL-6 y de INL mostraron una tendencia creciente durante los días posteriores al inicio del tratamiento en el grupo de los no respondedores, y alcanzaron su punto álgido varios días después de su administración; por el contrario, su valor permaneció relativamente estable en aquellos pacientes con evolución favorable. Estos hallazgos nos indican que, probablemente, en pacientes seleccionados (la mayoría con enfermedad grave), TCZ no sería capaz de inhibir la tormenta de citoquinas una vez se ha establecido, y esto se convertiría a su vez, en un predictor de mala respuesta. La IL-6 mostró un segundo pico en la cuarta semana tras la administración de TCZ, y lo mismo se observó en los niveles de PCR.

Dichos hallazgos nuevamente se observaron en los no respondedores, lo que probablemente refleje más de un brote de enfermedad en este subgrupo de pacientes. El NT-proBNP también mostró una tendencia al alza en el grupo de los no respondedores, sugiriendo que la disfunción miocárdica también puede contribuir a las complicaciones pulmonares y, por tanto, colaborar en la aparición de un resultado adverso. Lo mismo ocurrió con el dímero D, predictor independiente establecido de muerte hospitalaria en pacientes COVID-19 (20), que refleja un estado procoagulante y un aumento del riesgo trombótico asociado a enfermedad grave (99) y que, en nuestra cohorte, también mostró una tendencia decreciente solo en aquellos pacientes que respondieron a TCZ. El descenso progresivo de los valores de dímero D post-TCZ se ha constatado en otros estudios, sin embargo, en el caso de pacientes críticos con SDRA establecido puede no haber mejoría significativa a pesar del tratamiento inmunomodulador con un anti-IL-6 (92), lo que refuerza la hipótesis de que la administración precoz de TCZ puede tener un papel central en el freno de la coagulopatía, el daño endotelial y la trombo-inflamación pulmonar observadas en pacientes COVID-19, asociando, por supuesto, tratamiento anticoagulante coadyuvante (100).

La evidencia científica publicada posteriormente a esta investigación refuerza nuestra hipótesis de que la respuesta a TCZ está asociada con la restauración de marcadores de coagulación tras su administración, mientras que la persistencia de biomarcadores inflamatorios elevados después de su infusión se asocia con mal pronóstico (101). En febrero de 2021 (varios meses después de nuestra publicación), sale a la luz un análisis secundario de la cohorte TESEO, convirtiéndose en el primer score de riesgo diseñado para predecir una mala respuesta a la terapia con TCZ (basada en mortalidad y/o necesidad de VMI), con la intención de estratificar pacientes y seleccionar la estrategia terapéutica más adecuada. Los predictores de peor respuesta que compusieron el score fueron el sexo masculino y la medición de los siguientes marcadores en el día 4 después de la administración de TCZ; PaO₂ /FiO₂ <210 mmHg, PCR >1,23 mg/dl y plaquetas <333 células/mm³ (102). Posteriormente, otro estudio de cohortes retrospectivo publicado en septiembre de 2021 propuso otra escala de puntuación para predecir la supervivencia a los 28 días en pacientes COVID-19 tratados con TCZ (score Cerrahpaşa-PREDICT), en el cual se evalúan los valores de PCT, dímero D, plaquetas, SpO₂ y el tiempo

hasta la administración de TCZ (103). En este trabajo abogan, al igual que nosotros, que la administración precoz de TCZ en algunos pacientes seleccionados condiciona el pronóstico a corto plazo y que, el empleo de dicho score puede ayudar al clínico para estratificar a los pacientes y decidir la indicación terapéutica más adecuada. No obstante, el impacto en la mortalidad en los pacientes tratados con TCZ fue similar a otras series y, a diferencia de nuestro proyecto, no valoraron los niveles plasmáticos de IL-6, cuya implicación en la patogenia del SLC y como marcador de respuesta a TCZ es en estos momentos indiscutible. Ambas escalas pronósticas se sometieron a validación externa obteniendo un poder predictivo bajo, resultando muy inferior al obtenido únicamente con las variables INL y dímero D (104), datos que concuerdan con los resultados de nuestra cohorte.

Actualmente, el conocimiento global sobre el SARS-CoV-2 ha proliferado de forma exponencial y disponemos de mucha literatura relacionada con los biomarcadores inflamatorios, ya que son el factor clave para ofrecer herramientas terapéuticas certeras e individualizadas a los pacientes. Nuestros resultados, junto a numerosas publicaciones científicas valiosas, apuntan hacia la estratificación del riesgo individual de los pacientes. Si conocemos que los niveles iniciales de determinados biomarcadores pueden orientar o predecir una peor respuesta a TCZ, deberíamos considerar la posibilidad de emplear otras terapias inmunosupresoras y/o antivirales adicionales con el fin de optimizar los resultados terapéuticos.

El ICC fue un predictor de respuesta a TCZ. La comorbilidad más frecuente en nuestros pacientes fue la HTA, seguida de enfermedades cardiovasculares, diabetes y EPOC, tal y como se describe en otras series (105). Estas cuatro comorbilidades están incluidas en el ICC y se han asociado con mayor gravedad de la enfermedad en pacientes COVID-19 (106). Aunque no se han caracterizado los mecanismos patogénicos implicados, en pacientes con DM o enfermedad cardiovascular subyacente, la infección podría inducir un daño adicional por los efectos directos o indirectos relacionados con la inflamación, el estado de hipercoagulabilidad y la hipoxia (107), lo que podría tener implicaciones en el desarrollo del SDRA. La asociación inversa observada entre el ICC y la respuesta a TCZ respalda los resultados recientes obtenidos de una cohorte nacional de pacientes

hospitalizados con COVID-19, donde un mayor número de comorbilidades se asoció con un peor resultado (108).

La presión arterial se mostró como un predictor independiente de respuesta a TCZ, y los valores más bajos al ingreso se asociaron con una mejor respuesta a este. El SARS-CoV-2 se une al receptor ACE-2, y se ha constatado que dicho receptor se sobreexpresa en pacientes tratados con inhibidores de la ECA y bloqueadores del receptor de angiotensina II tipo I (109,110). Esta condición, puede facilitar la infección con el SARS-CoV-2 y también podría conducir a una mayor gravedad de la enfermedad y tener repercusiones en la mortalidad. La presión arterial sistólica más alta en nuestro estudio podría ser un marcador indirecto de hipertensión y también podría estar asociada con presiones de llenado elevadas y contribuir al edema pulmonar en pacientes con SDRA. Curiosamente, los niveles elevados de TnI y de NT-proBNP se asociaron con falta de respuesta a TCZ, lo que podría sugerir que la miocardiopatía por estrés relacionada con la tormenta citoquímica podría no revertirse con TCZ si no se inicia de inmediato. La disfunción miocárdica puede agravarse en pacientes con presión arterial alta y/o cardiopatía hipertensiva.

Cuando diseñamos este estudio, apenas había datos disponibles sobre TCZ en la COVID-19. A pesar de ello, presumimos que el bloqueo precoz de IL-6 podía evitar el desarrollo de SLC y que, adelantarnos en el momento de su administración podía condicionar el pronóstico de los pacientes. Broman et al diseñaron un ensayo prospectivo aleatorizado y abierto 2:1, en el que comparaban el efecto precoz del TCZ junto con tratamiento estándar (sin incluir remdesivir) frente al uso de terapia estándar en solitario. Impusieron unos criterios de inclusión muy parecidos a los nuestros; para justificar la indicación de TCZ los pacientes tenían que cumplir dos criterios analíticos alterados y el punto de corte establecido de PCR fue de 40 mg/dl. Encontraron mejores resultados clínicos en el grupo de TCZ y menor estancia hospitalaria (111).

Una de las preocupaciones con respecto al empleo de terapia anti-IL-6 es el riesgo potencial de un control deficiente de la infección viral. La IL-6 regula la respuesta inmune a través de la diferenciación de células T CD4 y CD8 para inducir una actividad citotóxica y citolítica contra patógenos (112). En estudios experimentales, se ha demostrado que la IL-6 induce respuestas de células T y células B contra agentes virales para su

eliminación, la actividad fagocítica de los macrófagos y la remodelación de tejidos (113,114), y para suprimir la replicación de virus como el de la hepatitis B o el VIH (112,115). Por lo tanto, la terapia anti-IL-6 podría tener consecuencias potencialmente perjudiciales en pacientes con COVID-19 si se administra demasiado pronto antes de que sea efectivo el tratamiento antiviral. Sin embargo, también existen datos que sostienen que el impacto negativo de la IL-6 en el aclaramiento viral es secundario a la inhibición de la respuesta de las células T CD8, favoreciendo la persistencia viral a través de una interacción sinérgica con la IL-17 (116) o que conduciría a una mayor replicación viral (117) y una mayor virulencia (112,118).

Nos planteamos cual era el impacto virológico e inmunológico que podía tener TCZ en los pacientes COVID-19. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de la IL-6 no perjudica la respuesta de los anticuerpos frente al SARS-CoV-2. Aunque la excreción viral fue más prolongada en los pacientes sometidos a un tratamiento con anticitocinas, este efecto dependió en gran medida de la carga viral inicial. En el momento que realizamos esta investigación, y hasta donde sabemos, no se habían evaluado previamente los efectos de los fármacos inmunomoduladores utilizados en la infección por SARS-CoV-2 sobre la cinética viral y la respuesta inmunitaria humoral inducida por el virus.

En nuestra cohorte, los pacientes con COVID-19 y bloqueo de la IL-6, mostraron una excreción viral prolongada. Como se ha señalado reiteradamente, IL-6 desempeña un papel central en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa integrada contra los patógenos. En modelos experimentales, la deficiencia de IL-6 se asoció con una mayor susceptibilidad a ciertas infecciones víricas, lo que se atribuyó a una menor actividad de las células T citotóxicas y a la respuesta IgG neutralizadora del virus dependiente de T-helper (119,120). Los datos clínicos sobre el riesgo de infecciones víricas tras el bloqueo de la IL-6 son discordantes, y aunque se han notificado algunos casos de reactivación vírica en pacientes con AR (121–123), no se ha evidenciado aumento de la carga viral de Epstein-Barr, citomegalovirus, varicela zoster o virus de la hepatitis C durante el seguimiento longitudinal (124,125). En nuestra cohorte, los pacientes sometidos a bloqueo de la IL-6 tenían una CV inicial más elevada, junto con datos clínicos y biológicos que reflejaban mayor gravedad de la enfermedad. Esto concuerda con una mayor CV y diseminación viral descritas en los pacientes gravemente enfermos en comparación con

los casos más leves (20,28,126,127). El ajuste por la CV dio lugar a una atenuación significativa de la relación entre el bloqueo de la IL-6 y la eliminación viral, lo que sugiere que la CV era un factor central implicado en la persistencia viral. El mismo efecto se observó con el ajuste por las variables relacionadas con el estado de gravedad de la enfermedad. Trabajos posteriores han asociado TCZ con duración más prolongada de la carga viral, pero no han encontrado asociación con la gravedad de la enfermedad (valorada por traslado a UCI), sin embargo, no tuvieron en cuenta los valores iniciales de CV (128).

En contraste con la duración de la excreción viral, nuestros resultados muestran que el bloqueo de la actividad de la IL-6 no atenuó la respuesta de los anticuerpos al SARS-CoV-2. Encontramos una respuesta humoral rápida y robusta en el grupo sometido al bloqueo de IL-6, y ni la proporción de pacientes con títulos de anticuerpos positivos, ni el tiempo de producción de anticuerpos ni la intensidad de respuesta de éstos, fueron peores que los observados en los pacientes sin tratamiento con anticitocinas. Nuestros hallazgos son coherentes con la inmunogenicidad conservada tras la vacunación notificada en pacientes con AR que reciben TCZ (129–131). Una de las razones que se aducen para explicar la respuesta humoral aparentemente inalterada con el tratamiento con anti-IL-6 es que no induce el agotamiento de los linfocitos B y, en consecuencia, otras citocinas producidas por los linfocitos T auxiliares también podrían estimular los linfocitos B para inducir la producción de anticuerpos (130). TCZ no se dirige específicamente a la célula B, por lo que la producción de anticuerpos puede no depender únicamente de IL-6 o IL-1, de hecho, no se requirió IL-6 para la respuesta de anticuerpos específicos de la influenza por parte de las células mononucleares amigdalinas en un estudio in vitro (132). El ambiente proinflamatorio observado en el SLC descrito en los pacientes con COVID-19 grave, produce un agotamiento de los linfocitos, por lo que la mejoría del estado inflamatorio mediante terapias inmunomoduladoras se podría asociar con mejoría de la respuesta inmune humoral y celular frente al SARS-CoV-2 (133). Además, hay que tener en cuenta que algunos de los efectos secundarios de los fármacos inmunomoduladores se relacionan con la duración y la dosis acumulada (134) y, en el caso de la COVID-19, estos tratamientos tienen una

trayectoria muy recortada, con dosis máximas distribuidas a lo sumo en dos dosis, por lo que la repercusión en el sistema inmune podría no ser evidente.

Se ha informado de respuestas tempranas y potentes de anticuerpos en pacientes gravemente enfermos con COVID-19 (135), y de una correlación independiente entre la gravedad de la enfermedad y niveles más altos de anticuerpos (135–137). Nuestros pacientes con bloqueo de la IL-6 tenían mayor gravedad de la enfermedad, una CV inicial más alta y una excreción viral más prolongada, lo que probablemente tenga implicaciones en el desarrollo de una respuesta humoral más potente. En realidad, aunque los pacientes sometidos a bloqueo de la IL-6 mostraron con mayor frecuencia títulos de anticuerpos detectables, y más precozmente que el grupo de tratamiento sin anticitocinas, no se encontró una asociación significativa entre la seropositividad y el bloqueo de la IL-6 tras ajustar por la gravedad de la enfermedad y los niveles de carga viral. Una carga viral elevada podría inducir una activación inmediata de los linfocitos B extrafoliculares, dando lugar a una producción temprana e intensa de anticuerpos, aunque con menor afinidad que los inducidos por los linfocitos B específicos del antígeno en el centro germinal (137,138). En nuestra cohorte, la precocidad y la intensidad de la respuesta de anticuerpos observada en los pacientes que recibieron tratamiento anti-IL-6 incluyó también niveles elevados de anticuerpos S-IgG potencialmente neutralizantes (139), lo que podría haber contribuido a una evolución favorable, a pesar de que este grupo contenía una mayor proporción de pacientes gravemente enfermos.

Los estudios realizados posteriormente son escasos, pero refuerzan nuestros resultados. En uno de ellos postulan que no únicamente el bloqueo con tocilizumab no interviene negativamente en la producción de anticuerpos, sino que, la respuesta humoral tampoco estaría menguada con el uso de otros inmunomoduladores utilizados en la pandemia tales como la interleucina-1 (anakinra) o con el tratamiento con esteroides (85). En otro trabajo en el que se evaluó la terapia con TCZ frente a baricitinib tampoco se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a resultados clínicos ni microbiológicos; la producción de anticuerpos no se vio afectada por el uso de ninguno de los inmunomoduladores y el tiempo hasta la negativización de la CV fue ligeramente

menor en los tratados con TCZ (140). El estudio COVACTA publicado posteriormente al nuestro, en mayo de 2022, constituye el primer ensayo clínico que arroja datos sobre comportamiento viral y la producción de anticuerpos. De acuerdo con nosotros, concluyeron que el tratamiento con TCZ no afecta al aclaramiento viral en el epitelio respiratorio ni en plasma y que, la respuesta de anticuerpos tampoco se modifica con su uso (59)

Tan solo observamos una complicación de índole infecciosa (bacteriemia por *E. faecalis*) en un paciente con neumonía COVID-19 tratado con TCZ. La información disponible respecto al riesgo infeccioso secundario al bloqueo IL-6, se extrae de pacientes con diferentes afecciones reumatológicas, especialmente AR. Los datos pre-pandémicos sugerían que el uso de TCZ aumentaba el riesgo de infecciones graves, mayoritariamente neumonías, infecciones del tracto urinario y celulitis, así como de infecciones oportunistas, entre las que se incluyen tuberculosis, infecciones fúngicas y reactivaciones virales, de una forma similar a otros fármacos biológicos (42,141) En una revisión sistemática y metaanálisis no se encontró una asociación significativa entre el empleo de TCZ y la aparición de complicaciones infecciosas secundarias. Sin embargo, fue más frecuente la infección fúngica invasiva (IFI) tanto en el análisis general como por subgrupos (142). Se han comunicado casos de aspergilosis pulmonar invasiva, mucormicosis, candidiasis sistémica y neumonía por *pneumocystis jirovecii* en el seno del tratamiento de TCZ. (143–145). También, la Infección por *aspergillus* es una causa relativamente frecuente de morbimortalidad en pacientes con influenza ingresados en la UCI (146). El riesgo infeccioso derivado de la utilización de TCZ como herramienta terapéutica en estos pacientes, no depende únicamente del antagonismo de IL-6, ya que estos individuos seleccionados van a ser pacientes que presentan otros factores de riesgo de inmunodepresión, con enfermedad grave, más comorbilidades, tratamiento esteroideo concomitante, estancias hospitalarias prolongadas e ingreso UCI con uso de VMI. El riesgo de IFI probablemente se pueda explicar por todas estas condiciones, aunque existe evidencia al respecto, hay que interpretarlas con precaución ya que parte de series de casos y estudios observacionales.

Esta investigación tiene varias limitaciones que hay que tener presentes. En primer lugar, se trata de un estudio unicéntrico y, por tanto, los resultados pueden no ser

generalizables al resto de la población. Por otro lado, debido a la naturaleza observacional del estudio, no dispusimos de un grupo de control comparable y cabe la posibilidad de haber incurrido en un sesgo de selección en los pacientes que recibieron TCZ, ya que presentaban mayor gravedad de la enfermedad, lo que podría haber confundido algunos de los resultados en las comparaciones con los grupos no tratados. El pequeño número de no respondedores a TCZ no permite excluir el papel de la carga viral como factor predictivo, además, otros potenciales contribuyentes como la respuesta inmune del huésped, no se exploraron en el estudio. También consideramos una limitación que, las mediciones del ARN del SARS-CoV-2 se realizaron en muestras del tracto respiratorio superior, que pueden presentar en algunos casos una sensibilidad menor que las muestras del tracto respiratorio inferior. Además, todos los pacientes recibieron combinaciones de agentes antivirales con efectos potenciales sobre la dinámica viral, que diferían entre los grupos de tratamiento con anticitocinas, especialmente en lo que respecta a lopinavir/ritonavir y los esteroides. Hubo una alta proporción de pacientes con títulos de anticuerpos indetectables entre el grupo no tratado con anticitocinas. Uno de los factores que podrían contribuir a este hecho son las diferencias en la carga viral y los valores de Ct entre los grupos, aunque ello justificaría la realización de más investigaciones al respecto.

Las fortalezas de nuestro proyecto son las características distintivas de la población incluida, y el exhaustivo análisis secuencial de un elevado número de biomarcadores tras la administración de TCZ que, además de los factores clínicos, permitieron caracterizar a los pacientes con mayor probabilidad de respuesta. Otros puntos fuertes consisten en la disponibilidad de mediciones seriadas de muestras respiratorias y séricas para la novedosa evaluación de los efectos del bloqueo de la IL-6 en la dinámica viral y la respuesta de los anticuerpos en un elevado número de pacientes en condiciones reales.

En conclusión, la terapia temprana con TCZ es segura y se asocia con una mortalidad baja. Nuestros resultados sugieren que el uso precoz de TCZ antes de que se produzca la activación descontrolada de citocinas y su repercusión en el sistema inmune, podría conducir a mejores resultados clínicos. A pesar del extenso conocimiento actual sobre la infección por SARS-CoV-2 y TCZ en pacientes graves, la implementación del bloqueo

IL-6 en otros escenarios no está tan explorada. Esta investigación sirve de precedente para respaldar ensayos clínicos confirmatorios que evalúen el papel del tratamiento inmunomodulador anticipado en la COVID-19. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que el tratamiento basado en el bloqueo de la IL-6 en pacientes con infección por SARS-CoV-2, no perjudica la respuesta de anticuerpos específicos. Aunque el aclaramiento viral se retrasó, este efecto fue impulsado principalmente por un valor inicial de la carga viral más alto. Estos hallazgos, contribuyen a ampliar el conocimiento científico sobre los efectos del tratamiento con anticitocinas en la cinética viral y en la respuesta inmunitaria humoral del SARS-CoV-2, y refuerzan la información actual de que es una herramienta terapéutica segura en la COVID-19. No obstante, se necesitan más estudios cuidadosamente diseñados para confirmar que tocilizumab no afecta a la replicación viral ni a la respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2.



8. CONCLUSIONES





8. CONCLUSIONES

- La terapia con tocilizumab es segura a corto plazo en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.
- El sexo masculino, un mayor número de comorbilidades, unos mayores valores de presión arterial sistólica, un índice neutrófilo/linfocito >2.55 y una puntuación superior en la escala SOFA, constituyen predictores de mala respuesta al tratamiento con tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.
- La ausencia de respuesta favorable a tocilizumab en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 se asocia con un aumento progresivo de los valores plasmáticos de IL-6, dímero D, del índice de neutrófilo/linfocito y del NT-proBNP tras el tratamiento que no se observa en los respondedores.
- Los valores plasmáticos de PCR <25 mg/dl, Tp I < 0.02 y de la relación plaquetas/dímero D < 343 medidos a las 48h de la administración de TCZ se comportan como predictores precoces de una respuesta favorable al tratamiento en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.
- El tiempo hasta el aclaramiento viral es más prolongado en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 tratados con tocilizumab, pero este efecto está asociado con el valor inicial más elevado de la carga viral.
- La respuesta de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 no se modifica con el bloqueo anti-IL-6 en pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19.



9. BIBLIOGRAFÍA





9. BIBLIOGRAFIA

1. Zhou P, Yang X lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar 12;579(7798):270–3.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):565–74.
3. John Hopkins University of Medicine. John Hopkins Coronavirus Resource. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
4. Cheng VCC, Lau SKP, Woo PCY, Kwok YY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. Vol. 20, *Clinical Microbiology Reviews*. 2007. p. 660–94.
5. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):465–522.
6. 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. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 26;382(13):1199–207.
7. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):514–23.
8. Layden JE, Ghinai I, Pray I, Kimball A, Layer M, Tenforde MW, et al. Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin — Final Report. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 5;382(10):903–16.
9. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. Vol. 323, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2020. p. 1239–42.
10. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Leeflang MMG, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. Vol. 2020, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2020.
11. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El S, et al. MMWR - Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reporting-pui.html>.
12. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497–506.
13. Fu B, Xu X, Wei H. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19? Vol. 18, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2020.

14. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res.* 2020 Jul 1;191:148–50.
15. Patel P, Decuir J, Abrams J, Campbell AP, Godfred-Cato S, Belay ED. Clinical Characteristics of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults: A Systematic Review. Vol. 4, *JAMA Network Open.* American Medical Association; 2021.
16. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review to Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clinical Infectious Diseases.* 2020 Nov 1;71(9):2459–68.
17. Centers For Diseases Control and Prevention - CDC. Post-COVID conditions . <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/long-term-effects/index.html>.
18. Berenguer J, Ryan P, Rodríguez-Baño J, Jarrín I, Carratalà J, Pachón J, et al. Characteristics and predictors of death among 4035 consecutively hospitalized patients with COVID-19 in Spain. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020 Nov 1;26(11):1525–36.
19. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020 Aug 20;584(7821):430–6.
20. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1054–62.
21. Dai M, Liu D, Liu M, Zhou F, Li G, Chen Z, et al. Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-CoV-2: A multicenter study during the COVID-19 outbreak. *Cancer Discov.* 2020 Jun 1;10(6):783.
22. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2020 Apr 1;18(4):844–7.
23. Rodelo JR, de La Rosa G, Valencia ML, Ospina S, Arango CM, Gómez CI, et al. D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis. *American Journal of Emergency Medicine.* 2012 Nov;30(9):1991–9.
24. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020 Jul 1;191:145–7.
25. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):507–13.
26. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). Vol. 87, *Indian Journal of Pediatrics.* Springer; 2020. p. 281–6.
27. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020 May 1;8(5):475–81.

28. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Infection*. 2020 Jul 1;81(1):e6–12.
29. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*. 2010 Apr;18(4):843–51.
30. L Chatenoud JFB. Anti-CD3 Antibodies. *Inmunology series*. 1993;59:175–91.
31. Huang KJ, Su IJ, Theron M, Wu YC, Lai SK, Liu CC, et al. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol*. 2005;75(2):185–94.
32. Zhou J, Chu H, Li C, Wong BHY, Cheng ZS, Poon VKM, et al. Active replication of middle east respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: Implications for pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(9):1331–42.
33. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *New England Journal of Medicine*. 2020 Dec 3;383(23):2255–73.
34. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2020.
35. Zhu Z, Cai T, Fan L, Lou K, Hua X, Huang Z, et al. Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020 Jun 1;95:332–9.
36. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19.' Vol. 80, *Journal of Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 607–13.
37. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. Vol. 46, *Intensive Care Medicine*. Springer; 2020. p. 846–8.
38. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 May 1;130(5):2620–9.
39. Gao Y, Li T, Han M, Li X, Wu D, Xu Y, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol*. 2020 Jul 1;92(7):791–6.
40. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020 Apr 1;8(4):420–2.
41. del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020 Oct 1;26(10):1636–43.
42. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. Vol. 13, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 399–409.

43. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020 Aug 20;584(7821):463–9.
44. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9.
45. Niemi MEK, Karjalainen J, Liao RG, Neale BM, Daly M, Ganna A, et al. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature* [Internet]. 2021 Dec 16;600(7889):472–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03767-x>
46. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Feb 25;384(8):693–704. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021436>
47. Crothers K, DeFaccio R, Tate J, Alba PR, Goetz MB, Jones B, et al. Dexamethasone in hospitalised COVID-19 patients not on intensive respiratory support. *European Respiratory Journal*. 2022 Jul 1;60(1).
48. Agencia Europea del Medicamento (EMA). RoActemra-INN, tocilizumab. ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/RoActemra.
49. Jones G, Ding C. Tocilizumab: A review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. Vol. 3, *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*. Libertas Academica Ltd.; 2010. p. 81–9.
50. Bhimraj A, Morgan RL, Hirsch Shumaker A, Baden L, Chi-Chung Cheng V, Edwards KM, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19 [Internet]. Available from: www.idsociety.org/COVID19guidelines.
51. National Health Service. National Health Service of England . <https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/>.
52. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Manu Shankar-Hari, Claire L Vale, Peter J Godolphin, David Fisher, Julian P T Higgins, et al. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA* . 2021 Aug 10;326(6):1–20.
53. Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 19;117(20):10970–5.
54. Roumier M, Paule R, Groh M, Vallée A, Ackermann F. Interleukin-6 blockade for severe COVID-19. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.20.20061861>
55. Guaraldi G, Meschiari M, Cozzi-Lepri A, Milic J, Tonelli R, Menozzi M, et al. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2020 Aug 1;2(8):e474–84.
56. Salama C, Han J, Yau L, Reiss WG, Kramer B, Neidhart JD, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2021 Jan 7;384(1):20–30.

57. Hermine O, Mariette X, Tharaux PL, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized with COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2021 Jan 1;181(1):32–40.
58. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, Fernandes AD, Harvey L, Foulkes AS, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *New England Journal of Medicine.* 2020 Dec 10;383(24):2333–44.
59. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *New England Journal of Medicine.* 2021 Apr 22;384(16):1503–16.
60. Ghosn L, Chaimani A, Evrenoglou T, Davidson M, Graña C, Schmucker C, et al. Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2021 Mar 18;2021(3).
61. Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas M, Abbasi S, Abbass H, et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial RECOVERY Collaborative Group* [Internet]. Vol. 397, *The Lancet.* 2021. Available from: www.recoverytrial.net
62. The REMAP-CAP Investigators. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Apr 22;384(16):1491–502. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2100433>
63. Lescure FX, Honda H, Fowler RA, Lazar JS, Shi G, Wung P, et al. Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2021 May 1;9(5):522–32.
64. National Institutes of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. <https://covid19treatmentguidelines.nih.gov>.
65. The World Health Organisation. Uppsala Monitoring Centre. <https://who-umc.org/vigibase/>.
66. Charan J, Dutta S, Kaur R, Bhardwaj P, Sharma P, Ambwani S, et al. Tocilizumab in COVID-19: a study of adverse drug events reported in the WHO database. *Expert Opin Drug Saf.* 2021;20(9):1125–36.
67. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. Vol. 395, *The Lancet.* Lancet Publishing Group; 2020. p. e30–1.
68. Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas J, Abbas K, Abbas M, et al. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis [Internet]. Vol. 400, *The Lancet.* 2022. Available from: www.recoverytrial.net
69. Ely EW, Ramanan A v., Kartman CE, de Bono S, Liao R, Piruzeli MLB, et al. Efficacy and safety of baricitinib plus standard of care for the treatment of critically ill hospitalised adults with COVID-19 on invasive mechanical ventilation or extracorporeal membrane oxygenation: an exploratory, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2022 Apr 1;10(4):327–36.

70. Marconi VC, Ramanan A v., de Bono S, Kartman CE, Krishnan V, Liao R, et al. Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2021 Dec 1;9(12):1407–18.
71. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr*. 2014;
72. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (1979). 2021 Feb 5;371(6529).
73. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*. 2021 Mar 25;591(7851):639–44.
74. Crawford KHD, Dingens AS, Eguia R, Wolf CR, Wilcox N, Logue JK, et al. Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months after Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2021 Jan 15;223(2):197–205.
75. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (1979). 2021 Feb 5;371(6529).
76. Alejo JL, Mitchell J, Chang A, Chiang TPY, Massie AB, Segev DL, et al. Prevalence and Durability of SARS-CoV-2 Antibodies among Unvaccinated US Adults by History of COVID-19. Vol. 327, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2022. p. 1085–7.
77. Payne DC, Iblan I, Rha B, Alqasrawi S, Haddadin A, al Nsour M, et al. Persistence of antibodies against middle east respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2016 Oct 1;22(10):1824–6.
78. Wu-Chun Cao, Wei Liu, Pan-He Zhang, Fang Zhang, Jan H. Richardus. Disappearance of Antibodies to SARS-Associated Coronavirus after Recovery. *The new england journal of medicine* [Internet]. 2007; Available from: <http://authors.nejm.org>
79. Kowitdamrong E, Puthanakit T, Jantarabenjakul W, Prompetchara E, Suchartlikitwong P, Puthachoen O, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019. *PLoS One*. 2020 Oct 1;15(10 October).
80. Klein SL, Pekosz A, Park HS, Ursin RL, Shapiro JR, Benner SE, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Nov 2;130(11):6141–50.
81. 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 Jan 21;184(2):476-488.e11.
82. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Vol. 27, *Annual Review of Immunology*. 2009. p. 519–50.
83. Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4699–706.

84. Petra Roll, Khalid Muhammad, Mathias Schumann, Stefan Kleinert, Hermann Einsele, Thomas Dörner, et al. In vivo effects of the anti–interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment. *Arthritis And Rheumatism* . 2011;63(5):1225–64.
85. Başaran S, Şimşek-Yavuz S, Meşe S, Çağatay A, Medetalibeyoğlu A, Öncül O, et al. The effect of tocilizumab, anakinra and prednisolone on antibody response to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A prospective cohort study with multivariate analysis of factors affecting the antibody response. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021 Apr 1;105:756–62.
86. Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003 Apr 19;361(9366):1319–25.
87. Park WB, Perera RAPM, Choe PG, Lau EHY, Choi SJ, Chun JY, et al. Kinetics of serologic responses to mers coronavirus infection in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2015 Dec 1;21(12):2186–9.
88. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021 Jan 1;2(1):e13–22.
89. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated with Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020 Oct 15;71(8):1937–42.
90. Kishimoto T. Interleukin-6: From basic science to medicine - 40 Years in immunology. Vol. 23, *Annual Review of Immunology*. 2005. p. 1–21.
91. Kubandova Z, Mathieua S, Pourtier C, Soubrier M. rpes zoster in rheumatoid arthritis under antiinterleukin-6 receptor antibody. *Joint Bone Spine*. 2010;77:616–27.
92. Toniati P, Piva S, Cattalini M, Garrafa E, Regola F, Castelli F, et al. Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: A single center study of 100 patients in Brescia, Italy. Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2020.
93. Alattar R, Ibrahim TBH, Shaar SH, Abdalla S, Shukri K, Daghfal JN, et al. Tocilizumab for the treatment of severe coronavirus disease 2019. *J Med Virol*. 2020 Oct 1;92(10):2042–9.
94. Luo P, Liu Y, Qiu L, Liu X, Liu D, Li J. Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *J Med Virol*. 2020 Jul 1;92(7):814–8.
95. Ministerio de Sanidad. Ministerio de Sanidad del Gobierno de España. <https://www.mscbs.gob.es/es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/situacionActual.htm> .
96. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. Vol. 39, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2017. p. 529–39.
97. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J Transl Med*. 2020 May 20;18(1).

98. Campochiaro C, Della-Torre E, Cavalli G, de Luca G, Ripa M, Boffini N, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in severe COVID-19 patients: a single-centre retrospective cohort study. *Eur J Intern Med.* 2020 Jun 1;76:43–9.
99. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. Vol. 7, *The Lancet Haematology.* Elsevier Ltd; 2020. p. e438–40.
100. di Nisio M, Potere N, Candeloro M, Spacone A, Pieramati L, Ferrandu G, et al. Interleukin-6 receptor blockade with subcutaneous tocilizumab improves coagulation activity in patients with COVID-19. *Eur J Intern Med.* 2021 Jan 1;83:34–8.
101. Lakatos B, Szabo BG, Bobek I, Gopcsa L, Beko G, Kiss-Dala N, et al. Laboratory parameters predicting mortality of adult in-patients with COVID-19 associated cytokine release syndrome treated with high-dose tocilizumab. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2021;68(3):145–52.
102. Mussini C, Cozzi-Lepri A, Menozzi M, Meschiari M, Franceschini E, Milic J, et al. Development and validation of a prediction model for tocilizumab failure in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. *PLoS One.* 2021 Feb 1;16(2 February).
103. Eşkazan AE, Balkan İİ, Demirbaş KC, Ar MC, Karaali R, Sekibağ Y, et al. Tocilizumab in COVID-19: The Cerrahpaşa-PREDICT score. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2021 Sep 1;27(9):1329–35.
104. Masotti L, Cioni E, Grifoni E, Cei F, Tarquini R. Trends of thrombo-inflammation biomarkers after Tocilizumab predict treatment failure better than scores in patients with severe SARS-CoV2 related respiratory failure. Vol. 103, *European Journal of Internal Medicine.* Elsevier B.V.; 2022. p. 111–2.
105. Wang Z, Yang B, Li Q, Wen L, Zhang R. Clinical features of 69 cases with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases.* 2020 Aug 1;71(15):769–77.
106. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 May 1;20(5):565–74.
107. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020 Jul 1;5(7):811–8.
108. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine.* 2020 Apr 30;382(18):1708–20.
109. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? Vol. 8, *The Lancet Respiratory Medicine.* Lancet Publishing Group; 2020. p. e21.
110. Li XC, Zhang J, Zhuo JL. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. Vol. 125, *Pharmacological Research.* Academic Press; 2017. p. 21–38.
111. Broman N, Feuth T, Vuorinen T, Valtonen M, Hohenthal U, Löyttyniemi E, et al. Early administration of tocilizumab in hospitalized COVID-19 patients with elevated inflammatory

- markers; COVIDSTORM—a prospective, randomized, single-centre, open-label study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;
112. Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL, Borca M v. The role of interleukin 6 during viral infections. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 113. Yang ML, Wang CT, Yang SJ, Leu CH, Chen SH, Wu CL, et al. IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci Rep*. 2017 Mar 6;7.
 114. Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. Late Interleukin-6 Escalates T Follicular Helper Cell Responses and Controls a Chronic Viral Infection [Internet]. 2015. Available from: www.sciencemag.org/SCIENCEVOL33411NOVEMBER2011www.sciencemag.org
 115. Rogez-Kreuz C, Manéglier B, Martin M, Dereuddre-Bosquet N, Martal J, Dormont D, et al. Involvement of IL-6 in the anti-human immunodeficiency virus activity of IFN-tau; in human macrophages. *Int Immunol*. 2005 Aug;17(8):1047–57.
 116. Hou W, Jin YH, Kang HS, Kim BS. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 Synergistically Promote Viral Persistence by Inhibiting Cellular Apoptosis and Cytotoxic T Cell Function. *J Virol*. 2014 Aug;88(15):8479–89.
 117. Wu W, Dietze KK, Gibbert K, Lang KS, Trilling M, Yan H, et al. TLR ligand induced IL-6 counter-regulates the anti-viral CD8+ T cell response during an acute retrovirus infection. *Sci Rep*. 2015 May 21;5.
 118. Watrang E, Jessett DM, Yates P, Fuxler L, Hannant D. Experimental Infection of Ponies with Equine Influenza A2 (H3N8) Virus Strains of Different Pathogenicity Elicits Varying Interferon and Interleukin-6 Responses. Vol. 16, *VIRAL IMMUNOLOGY*. 2003.
 119. Ramshaw IA, Ramsay A, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC, et al. Cytokines and immunity to viral infections Authors' addresses. *immunologKal Reviews*. 1997;159:119–35.
 120. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368:339–42.
 121. Scherlinger M, Alain S, Richez C. Monitoring of Epstein–Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. Vol. 85, *Joint Bone Spine*. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 259–60.
 122. van Duin D, Miranda C, Husni E. Cytomegalovirus Viremia, Pneumonitis, and Tocilizumab Therapy. *Emerg Infect Dis*. 2011 Apr;17(4):754–6.
 123. Ansemant T, Celard M, Tavernier C, Maillefert JF, Delahaye F, Ornetti P. Whipple's disease endocarditis following anti-TNF therapy for atypical rheumatoid arthritis. Vol. 77, *Joint Bone Spine*. 2010. p. 622–3.
 124. Mourgues C, Henquell C, Tatar Z, Pereira B, Nourisson C, Tournadre A, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2016 Jul 1;83(4):412–5.
 125. Nagashima T, Maruyama A, Kamata Y, Minota S. Unchanged serum viral load and liver function during tocilizumab treatment in a patient with rheumatoid arthritis and hepatitis C virus infection. Vol. 32, *Rheumatology International*. 2012. p. 2231–2.

126. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: Retrospective cohort study. *The BMJ*. 2020 Apr 21;369.
127. Qian GQ, Chen XQ, Lv DF, Ma AHY, Wang LP, Yang N bin, et al. Duration of SARS-CoV-2 viral shedding during COVID-19 infection. Vol. 52, *Infectious Diseases*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 511–2.
128. Cogliati Dezza F, Oliva A, Cancelli F, Savelloni G, Valeri S, Mauro V, et al. Determinants of prolonged viral RNA shedding in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Jun 1;100(2).
129. Crnkic Kapetanovic M, Saxne T, Jönsson G, Truedsson L, Geborek P. Rituximab and abatacept but not tocilizumab impair antibody response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research therapy* [Internet]. 2013; Available from: <http://arthritis-research.com/content/15/5/R171>
130. Mori S, Ueki Y, Hirakata N, Oribe M, Hidaka T, Oishi K. Impact of tocilizumab therapy on antibody response to influenza vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Dec;71(12):2006–10.
131. Bingham CO, Rizzo W, Kivitz A, Hassanali A, Upmanyu R, Klearman M. Humoral immune response to vaccines in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: Results of a randomised controlled trial (VISARA). *Ann Rheum Dis*. 2015 May 1;74(5):818–22.
132. Costelloe K, Smith S, Callard Eur R, Costelloe KE, Smith SH, Callard RE. Interleukin 6 is not required for antigen-specific antibody responses by human B cells. Vol. 23, *J. Immunol*. 1993.
133. Riva G, Nasillo V, Tagliafico E, Trenti T, Luppi M. COVID-19: Room for treating T cell exhaustion? Vol. 24, *Critical Care*. BioMed Central Ltd.; 2020.
134. Slade JD, Hepburn B. Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets. *Journal of laboratory and clinical medicine* . 1983 Mar;101(3):479–87.
135. Yongchen Z, Shen H, Wang X, Shi X, Li Y, Yan J, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. Vol. 9, *Emerging Microbes and Infections*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 833–6.
136. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020 Oct 15;71(16):2027–34.
137. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jun 1;26(6):845–8.
138. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2011 Jul 4;208(7):1377–88.
139. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity [Internet]. National Institutes of Health. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403492101

140. Wong CKH, Lau KTK, Au ICH, Xiong X, Chung MSH, Leung BYC, et al. Initiation of Tocilizumab or Baricitinib Were Associated With Comparable Clinical Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19 and Treated With Dexamethasone. *Front Pharmacol.* 2022 May 30;13.
141. Strand V, Ahadieh S, French J, Geier J, Krishnaswami S, Menon S, et al. Systematic review and meta-analysis of serious infections with tofacitinib and biologic disease-modifying antirheumatic drug treatment in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther.* 2015 Dec 15;17(1).
142. Peng J, Fu M, Mei H, Zheng H, Liang G, She X, et al. Efficacy and secondary infection risk of tocilizumab, sarilumab and anakinra in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. Vol. 32, *Reviews in Medical Virology.* John Wiley and Sons Ltd; 2022.
143. Segrelles-Calvo G, de S Araújo GR, Llopis-Pastor E, Carrillo J, Hernández-Hernández M, Rey L, et al. *Candida* spp. co-infection in COVID-19 patients with severe pneumonia: Prevalence study and associated risk factors. *Respir Med.* 2021 Nov 1;188.
144. Machado M, Valerio M, Álvarez-Uría A, Olmedo M, Veintimilla C, Padilla B, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in the COVID-19 era: An expected new entity. Vol. 64, *Mycoses.* Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 132–43.
145. Garg D, Muthu V, Sehgal IS, Ramachandran R, Kaur H, Bhalla A, et al. Coronavirus Disease (Covid-19) Associated Mucormycosis (CAM): Case Report and Systematic Review of Literature. *Mycopathologia.* 2021 May 1;186(2):289–98.
146. Martin-Loeches I, Valles J. Overtreating or underdiagnosing invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in critically ill H1N1 patients: Who is right? Vol. 38, *Intensive Care Medicine.* 2012. p. 1733–5.



ANEXOS





ANEXO I: TABLAS Y FIGURAS

UNIVERSITAS Miguel Hernández



ANEXO 1: MATERIAL COMPLEMENTARIO; TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1 complementaria. Criterios de tratamiento con tocilizumab

Criterios de tratamiento con tocilizumab (cualquiera de ellos)
CURB-65 ≥ 2
Saturación de oxígeno $< 93\%$;
Frecuencia respiratoria > 30 por min
Radiografía de tórax con infiltrados bilaterales multilobares;
Dímero-D ≥ 0.7 $\mu\text{g/L}$
Interleucina-6 ≥ 40 , pg/ml,
Linfocitos $< 800 \times 10^9/\text{L}$
Ferritina ≥ 700 $\mu\text{g/L}$,
Fibrinogeno > 700 mg/dl
Proteína C Reactiva > 25 mg/L.
Criterios para administrar una segunda dosis de tocilizumab, 24h después de la primera (cualquiera de ellos)
Persistencia de la fiebre
No mejoría de la taquipnea
No mejoría de la saturación de oxígeno al menos un 5%
No disminución de la PCR al menos un 25%
Progresión radiológica

Figura suplementaria 1. Diagrama de flujo de pacientes con pruebas serológicas disponibles

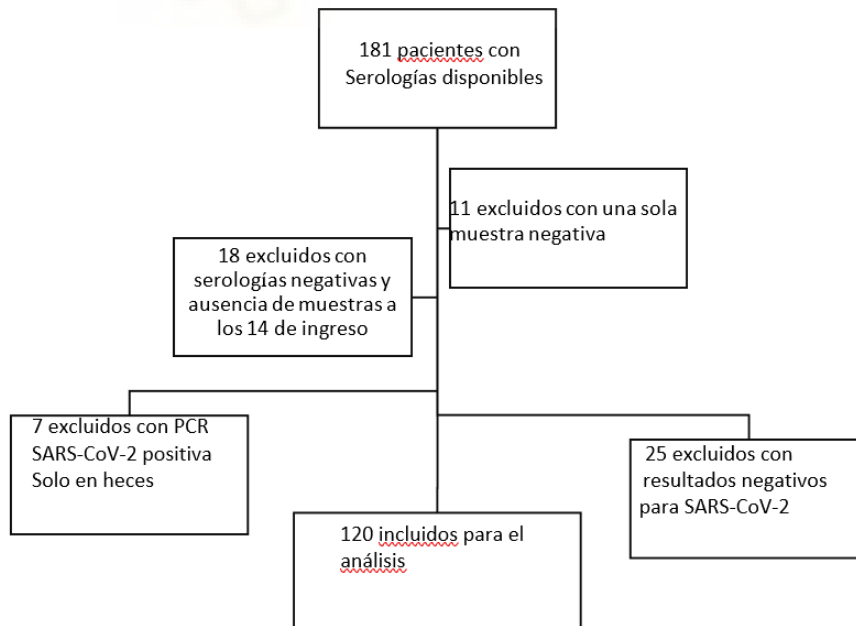


Tabla 2 complementaria. Hallazgos demográficos, clínicos y de laboratorio al ingreso en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.

Variables ^a	Todos		Muertes, admisiones en UCI o SOFA \geq 3		OR (IC 95%)	P valor ^b
			Sí	No		
Pacientes, n.	55		12	43	-	-
Hombre, n. (%)	40 (73)		10 (83)	30 (70)	2.17 (0.42-11.30)	0.359
Edad, años	62 (56-74)		76 (68-85)	60 (53-69)	1.10 (1.03-1.17)	0.004
Condiciones coexistentes						
Charlson-CCI	2 (1-4)		5 (2-5.5)	2 (0.5-3)	1.67 (1.16-2.41)	0.006
Ninguna [#] , n. (%)	33 (60)		25 (58)	8 (67)	1.44 (0.37-5.24)	0.595
Hipertensión, n. (%)	18 (33)		5 (41)	13 (30)	1.98 (0.61-6.47)	0.256
Diabetes, n. (%)	8 (15)		4 (33)	4 (9)	4.86 (1.01-26.70)	0.049
Enfermedad Cardiovascular*, n. (%)	9 (16)		3 (25)	6 (14)	2.06 (0.43-9.84)	0.367
EPOC, n. (%)	3 (6)		2 (17)	1 (2)	7.53 (0.55-252)	0.117
Días desde el inicio de enfermedad	11 (8-14)		9 (5-14)	11 (9-14)	0.95 (0.83-1.08)	0.401
Signos vitales						
Temperatura corporal, °C	36.5 (36.1-36.9)		37.0 (36.5-37.3)	36.4 (36.1-36.8)	3.80 (1.07-13.44)	0.039
Presión arterial sistólica, mmHg	120 (115-135)		135 (125-148)	120 (114-131)	1.06 (1.01-1.11)	0.012
Presión arterial diastólica, mmHg	75 (70-81)		81 (68-92)	75 (70-81)	1.03 (0.98-1.09)	0.266
Presión arterial media ^f	93 (88-99)		101 (88-104)	93 (88-97)	1.08 (0.99-1.16)	0.077
Oxígeno suplementario, n. (%)	45 (82)		11 (92)	34 (79)	2.91 (0.33-25.62)	0.340
SpO ₂ , porcentaje	97 (95-97)		95 (94-96)	97 (95-96)	0.61 (0.39-0.95)	0.028
SpO ₂ /FIO ₂	346 (337-365)		343 (333-344)	346 (338-367)	0.99 (0.98-1.01)	0.162
Escala SOFA	1 (1-2)		2 (2-2)	1 (1-2)	17.60 (2.10-147.8)	0.008
Infiltrados pulmonares bilaterales n. (%)	42 (76)		10 (83)	32 (74)	1.71 (0.32-9.09)	0.524
Hallazgos de laboratorio						
Linfocitos, x10 ³ /μL	1.04 (0.82-1.53)		0.86 (0.69-1.15)	1.12 (0.84-1.65)	0.67 (0.22-2.06)	0.485
Índice neutrófilos/linfocitos	2.51 (1.61-7.04)		8.25 (4.40-11.62)	2.39 (1.39-3.19)	1.27 (1.07-1.49)	0.006
Proteína C-reactiva, mg/L	46 (18-89)		105 (56-155)	30 (17-73)	1.01 (0.99-1.02)	0.075

IL-6, pg/mL	71	(26-159)	69	(43-202)	71	(19-155)	1.01 (0.99-1.01)	0.630
Dímero D, µg/mL	0.61	(0.45-1.52)	1.37	(0.78-2.14)	0.59	(0.45-1.14)	0.99 (0.78-1.24)	0.896
Lactato deshidrogenasa, U/L	238	(197-321)	306	(233-414)	234	(185-284)	1.01 (1.01-1.02)	0.012
Ferritina, ng/mL	448	(321-634)	523	(328-615)	438	(316-638)	1.00 (0.99-1.01)	0.981
Troponina I cardíaca-HS, ng/mL [‡]	7	(14)	3	(25)	4	(11)	3.18 (0.59-17.16)	0.177
NT-proBNP, pg/mL	79	(36-169)	35	(7-231)	80	(42-169)	1.00 (0.99-1.01)	0.862
Tratamiento coadyuvante antimicrobiano/inmunomodulador n. (%)								
Combinaciones basadas en HDQ	55	(100)	12	(100)	43	(100)	-	-
Azitromicina	53	(96)	12	(100)	41	(95)	1.56 (0.06-33.48)	0.450
Lopinavir/ritonavir	54	(98)	11	(92)	43	(100)	11.34 (0.43-297.36)	0.058
Remdesivir	0		-		-		-	-
Interferón-β-1b	10	(18)	3	(25)	7	(16)	1.71 (0.37-7.97)	0.490
Metilprednisolona [§]	12	(22)	5	(42)	7	(16)	0.27 (0.07-1.10)	0.062
Seguimiento								
SpO ₂ /FIO ₂ (48 horas)	97	(95-98)	95	(94-96)	98	(96-98)	0.61 (0.44-0.86)	0.004
Proteína C-reactiva (48 horas), mg/L	19	(7-39)	52	(29-86)	15	(7-36)	1.02 (1.01-1.04)	0.011
Oxígeno suplementario (48 horas), n. (%)	41	(75)	11	(92)	30	(70)	4.77 (0.56-40.84)	0.154
Oxígeno suplementario (7 días), n. (%)	36	(66)	11	(92)	25	(58)	7.92 (0.94-66.97)	0.057
Progresión radiológica	10	(18)	1	(8)	9	(21)	(0.34 0.04-3.02)	0.335
SOFA ≥3 durante el seguimiento, n. (%)	12		12		-		-	-
Ingreso en UCI	3		3		-		-	-
Muertes	0		-		-		-	-

[‡]Valores expresados como mediana (rango intercuartílico) a menos que se indique lo contrario. [§]P valor obtenido a partir de modelos de regresión logística univariados. #Cardiovascular (i.e., hipertensión, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad cardiovascular y enfermedad arterial periférica), respiratorio (i.e., enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], asma), insuficiencia renal crónica, inmunosupresión, malignidad, cirrosis hepática, enfermedad sistémica autoinmune o diabetes mellitus. *Enfermedad cardiovascular distinta de la hipertensión. [¶]Ciclos cortos de metilprednisolona 0.5-1 mg/kg/día dividido en dos dosis intravenosas durante 3 días. [†]La presión arterial media se calculó como (2/3-presión arterial diastólica) + (1/3-presión arterial sistólica). [‡] Los valores de troponina I cardíaca- HS estaban disponibles en 57 pacientes (44 y 13 en grupos favorables y desfavorables, respectivamente). Debido a que estaban desviados a la izquierda, resultaron muy pocos casos con valores por encima del límite superior de la normalidad e impidió el cálculo de los índices de probabilidad informativos y los intervalos de confianza del 95 %, la variable se clasificó con un punto de corte de 0,2 ng/mL. UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; Charlson-CCI, Índice de Comorbilidad de Charlson; SpO₂, saturación por oximetría de pulso; FIO₂, fracción de oxígeno inspirado; SOFA, Evaluación Secuencial de Fallo Orgánico; HCQ, hidroxiquina; IL-6, interleucina- 6; NT-proBNP, péptido natriurético tipo B N-terminal Pro, RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Tabla 3 complementaria. Predictores de evolución desfavorable tras inicio de tocilizumab en análisis de regresión logística multivariante en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.

Variables	OR (IC 95%)	P valor
Sexo masculino	3.62 (0.51-25.76)	0.199
Charlson-CCI, por unidad	1.56 (1.04-2.34)	0.034
Presión arterial sistólica, por mmHg	1.05 (0.99-1.12)	0.094
Escala SOFA, por unidad	5.05 (1.10-23.24)	0.038
Mayor ratio neutrófilos/linfocitos>2.55	5.26 (1.02-25)	0.039
Menor ratio plaquetas/Dímero D^{&}	2.51 (0.64-9.89)	0.188

La respuesta desfavorable se definió como alcanzar una puntuación SOFA > 2 durante la estancia hospitalaria, el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos o la muerte. Charlson-CCI, Índice de Comorbilidad de Charlson; SOFA, Evaluación Secuencial de Fallo Orgánico. RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Tabla complementaria 4. Análisis ROC de la evolución de biomarcadores séricos y variables clínicas a las 48 horas del inicio de tocilizumab sobre el resultado clínico en pacientes con infección confirmada por RT-PCR.

Variable	Valor absoluto a las 48h			
	AUC (IC 95%)	Valor punto de corte	Sp	Sn
Proteína C-Reactiva	0.80 (0.65-0.96)	26 mg/L	73	83
IL-6	0.63 (0.37-0.89)	175 pg/mL	79	67
Índice neutrófilo/linfocito	0.71 (0.52-0.86)	3.9	73	75
Lactato deshidrogenasa	0.73 (0.55-0.90)	307 U/L	87	58
Troponina I cardíaca-HS	0.69 (0.49-0.89)	0.02 ng/mL	53	78
Plaquetas	0.67 (0.46-0.87)	182 x10 ³ /μL	90	50
Índice plaquetas/Dímero D	0.77 (0.63-0.91)	343	68	92
SpO ₂	0.83 (0.71-0.96)	96.5 %	74	92
SpO ₂ /FIO ₂	0.79 (0.61-0.96)	334	81	83
Presión arterial sistólica	0.71 (0.55-0.86)	120 mmHg	48	92
Resultado compuesto*	0.96 (0.91-1.00)	3.5	82	100
Resultado compuesto simplificado**	0.93 (0.86-1.00)	1.5	85	100

La respuesta desfavorable se definió como alcanzar una puntuación SOFA > 2 durante la estancia hospitalaria, el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos o la muerte. IL-6, Interleucina 6; Tp I HS, alta sensibilidad; AUC, Área bajo la curva ROC; IC, Intervalo de confianza; Sp, Especificidad (%); Sn, Sensibilidad (%). (%). *Puntuación compuesta utilizando las variables PCR, IL-6, INL, LDH, Tp I cardíaca HS, plaquetas, Índice plaquetas/Dímero D, Sp O₂, SpO₂/FiO₂ y presión arterial sistólica. ** Puntuación compuesta utilizando las variables IL-6, plaquetas, SpO₂ y SpO₂/FIO₂. RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

ANEXO II. PROTOCOLO HOSPITALARIO



ANEXO2. PROTOCOLO TERAPÉUTICO PARA EL MANEJO DE LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 HGUE

RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO INFECCIÓN COVID-19

Hospital General Universitario de Elche

30 marzo 2020

1. RX TORAX o ECOGRAFIA PULMONAR NORMAL → AMBULATORIO

1. ASINTOMÁTICO / SÍNTOMAS LEVES (FIEBRE, TOS) y EDAD < 60 AÑOS

Realizar ecografía para comprobar ausencia de alteraciones

Tratamiento sintomático

2. ASINTOMÁTICO/ SÍNTOMAS LEVES y COMORBILIDAD (EPOC, CARDIOPATÍA, DM, CANCER, HEPATOPATÍA, INMUNODEPRESIÓN)

Hacer ECG previo a la dosis y a las 48h según protocolo (ver documento adjunto)¹

Hidroxiclороquina (HCQ) 200 mg/12h 5 días (tras dos dosis de carga de 400 mg/12h)

+

azitromicina (AZIT) 5 días

Seguimiento ecográfico

2. RX TÓRAX O ECOGRAFÍA PULMONAR PATOLÓGICA: → HOSPITALIZACIÓN

A) TRATAMIENTO ANTIVÍRICO Y/O INMUNOMODULADOR

3. NEUMONIA NO GRAVE (CURB65<2 y/o SatO2>93%) y ausencia de signos radiológicos, biológicos y ecográficos de gravedad (ver más abajo)

En todos los casos de tratamiento que incluya HCQ y azitromicina: hacer ECG previo a la dosis y cada 48h según protocolo¹

Remdesivir (RDV) 10 días + HCQ 5 d + AZIT 5 días

Alternativa hasta disponer de RDV: lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) 14 d+ HCQ 5 d + AZIT 5 d

Seguimiento ecográfico

* Añadir tocilizumab (TCZ) ± esteroides si signos de progresión (ver más abajo)

4. NEUMONIA GRAVE (CURB65≥2 , FR> 30 rpm, SatO2≤93%, PaO2<60, PaO2/FiO2≤300 mmHg, SatO2/FiO2≤315, presencia de signos radiológicos, biológicos o ecográficos de gravedad (ver más abajo), necesidad de soporte ventilatorio.

RDV 10 d + HCQ 5 d + AZIT 5 d + Tocilizumab 1 dosis (suspender IFN y LPV/r si lo llevaba)

Alternativa hasta disponer de RDV: LPV/RTV 14 d + HCQ 5 d + AZIT 5 d + TCZ 1 dosis (Suspender IFN)

Dosis extra de rescate de TCZ si:

1. No respuesta en 24 horas tras TCZ: persistencia de fiebre o no descenso PCR de 25%; o no mejoría taquipnea o en saturación O2; o progresión radiológica o ecográfica
2. No descenso de ferritina o de LDH o no aumento de linfocitos a las 48h

Alternativa a la 2ª dosis TCZ:

- 1-3 Bolus 250 mg metilprednisolona o

- Dexametasona 20mg/día x 5 días → 10 mg/día x 5 días

B) TRATAMIENTO ANTIBACTERIANO

3. Valorar antibioterapia si datos clínicos y/o analíticos de infección bacteriana (p.ej: neumonía lobar, antígenos positivos, esputo purulento o hemoptoico o con aislamiento bacteriano significativo, procalcitonina >0,5); Tratamiento de elección: azitromicina + ceftriaxona
4. Tratamiento alternativo: levofloxacino +/- betalactámico antipseudomónico (este último solamente cuando haya datos que sugieran *P. aeruginosa*).
5. En caso confección gripe: oseltamivir

MARCADORES BIOLÓGICOS Y ECOGRÁFICOS DE GRAVEDAD:

- 1) **Radiológicos:** infiltrados bilaterales multilobares
- 2) **Biológicos:**
 - Niveles elevados de uno o más de los siguientes marcadores:
 - a. Dímero D: $\geq 0,7 \mu\text{g/L}$
 - b. IL-6: $\geq 40 \text{ pg/ml}$
 - c. Linfocitos: $< 800 \times 10^9 \times \text{L}$
 - d. LDH $> 350 \text{ U/L}$
 - e. Ferritina: $\geq 700 \mu\text{g/L}$
 - f. Fibrinógeno $> 700 \text{ mg/dl}$ o PCR $> 25 \text{ mg/L}$
- 3) **Ecográficos:**
 - Presencia de uno o más de los siguientes signos:
 - a. Patrón de líneas B bilateral difuso con zona de “White lung”
 - b. Presencia de numerosas condensaciones periféricas bilaterales
 - c. Pérdida del deslizamiento pulmonar

MARCADORES CLÍNICOS, BIOLÓGICOS Y ECOGRÁFICOS DE PROGRESIÓN:

- 1) **Clínicos:** empeoramiento de la disnea, disminución saturación respecto a la previa $\geq 5\%$
- 2) **Biológicos:**
 - Niveles elevados o aumento de uno o más de los siguientes marcadores:
 - a. Dímero D: $\geq 0,7 \mu\text{g/L}$
 - b. IL-6: incremento $> 25\%$
 - c. Linfocitos: $< 800 \times 10^9 \times \text{L}$
 - d. LDH $> 350 \text{ U/L}$
 - e. Ferritina: $\geq 700 \mu\text{g/L}$
 - f. Fibrinógeno $> 700 \text{ mg/dl}$ o aumento PCR $> 25\%$

3) Radiológicos: progresión de los infiltrados o infiltrados bilaterales multilobares

4) Ecográficos:

- Presencia de uno o más de los siguientes signos:
 - a. Progresión del patrón de líneas B bilateral difuso con zona de “white lung”
 - b. Presencia de numerosas condensaciones periféricas bilaterales
 - c. Pérdida del deslizamiento pulmonar

Tabla 1. Principales opciones terapéuticas para infección por COVID19

FARMACO	DOSIS	DIAS	A TENER EN CUENTA
Lopinavir / Ritonavir (LPV/ RTV) (Kaletra® 200/50mg comp) Kaletra® 80/20 mg/ml sol. oral)	400 mg/100mg cada 12 horas. (2 comp/12 horas vo). Sol oral 5 ml/ 12 horas vo	14 días	Descartar VIH Inhibidor CYP3A (Ver interacciones) RAM: Diarrea, prolongación QT, vómitos. No en insuficiencia hepática severa. Ver recomendaciones SNG
Hidroxiclороquina (HQC) (Dolquine 200mg comp®) Cloroquina (CQ) (Resochin® 250mg comp)	D. carga 400/ 12 horas (1 día) y continuar 200/ 12 horas oral (2comp/12horas (día 1); seguido de 1 comp/12horas) 500 mg/ 12 horas oral (2comp/12 horas vo).	5 días	Controlar glucemias (RAM: hipoglucemia) Compatible con agua y leche
INTERFERON β 1b			

(Betaferon®, Extavia® 0.25mg jer sc)	0,25 mg/ 48 horas sc	14 días	Evitar enfermedad psiquiátrica o depresión grave. RAM: Cuadro pseudogripal, leucopenia.
Remdesivir (RDV) IV	200 mg iv 1 día y continuar con 100 mg iv x 9 días (Administrar en 30-60 min)	En total 10 días	SUSPENDER INTERFERON Y LPV/RTV Exclusión: Drogas vasoactivas, FG≤30 o HD, Transaminasas>5, otros antivirales (ver más abajo). Vigilar hipotensión infusional
Azitromicina (AZIT)	500 mg primer día VO ó IV si no tolera 250 mg a continuación	5 días	

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN TOCILIZUMAB:

- AST/ALT valores superiores a 5 veces el valor normal.
- Nivel de neutrófilos inferior a 500 cél/μL.
- Nivel de plaquetas inferior a 50.000 cél/μL.
- Sepsis documentada por otros patógenos que no sean COVID-19.
- Presencia de comorbilidad que puede llevar según juicio clínico a mal pronóstico.
- Diverticulitis complicada o perforación intestinal.
- Infección cutánea en curso (p.e piodermitis no controlada con tratamiento antibiótico).
- Terapia inmunosupresiva anti-rechazo.
- Terapia inmunosupresora: **SUSPENDER** interferón en estos pacientes antes de iniciar tocilizumab.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN REMDESIVIR: Necesidad de drogas vasoactivas para mantener presión arterial, enfermedad hepática grave (Child Pugh score \geq C, AST $>$ 5 veces el límite superior) y filtrado glomerular \leq 30 mL/min/1.73 m² o pacientes en hemodiálisis

RECOMENDACIONES PARA LA ADMINISTRACIÓN POR SNG

Adaptación de las recomendaciones de la Universidad de Liverpool publicadas el 13/03/2020.

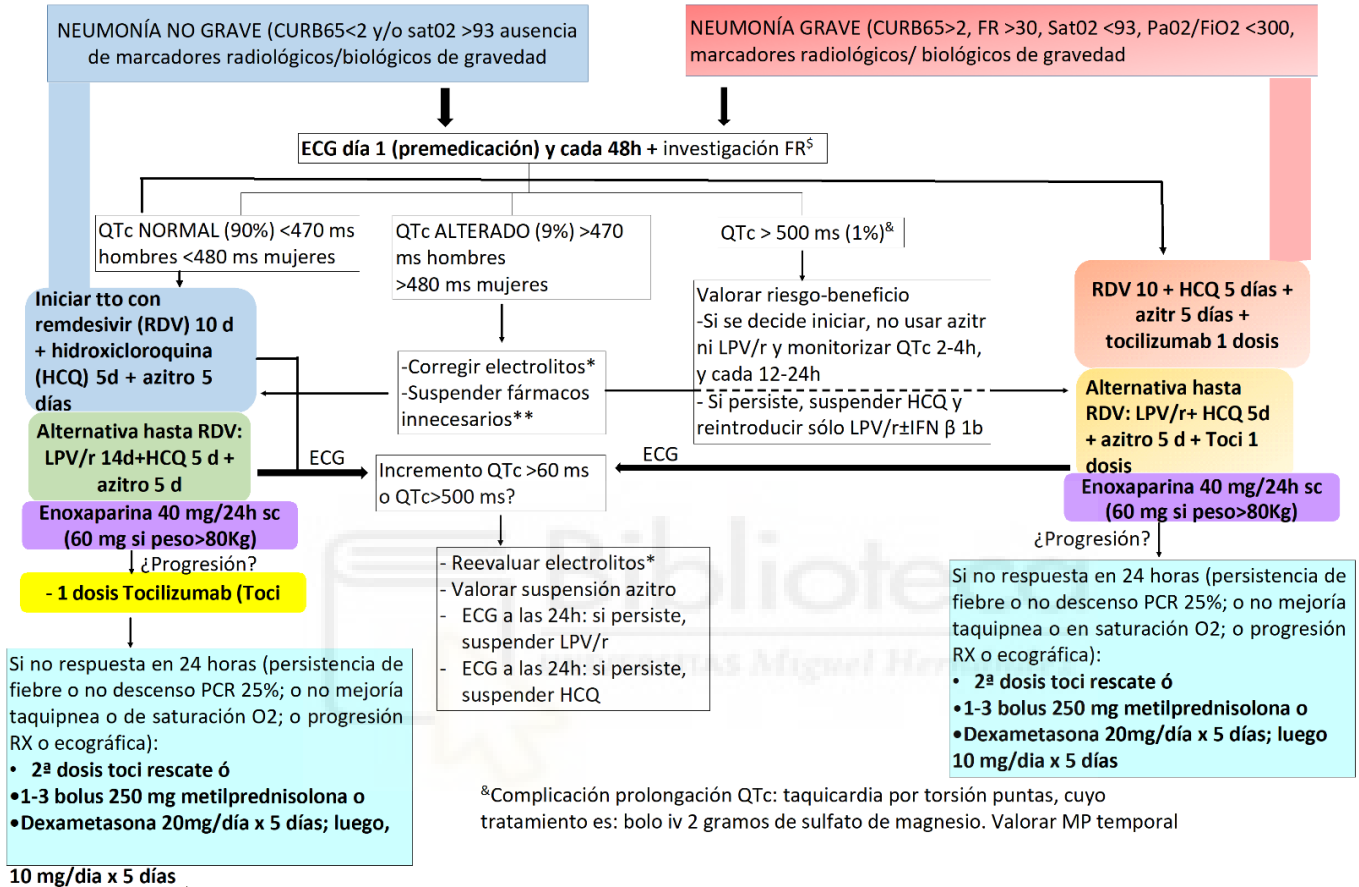
FÁRMACO	PRESENTACIÓN	COMENTARIOS
Lopinavir/ ritonavir	Kaletra [®] 200/50 mg comp Kaletra 80/20mg sol oral	Se administrará Lopinavir/Ritonavir solución oral 80/20 mg/mL, dosis de 5mL/12h vo. Lavar la sonda con leche o nutrición enteral (no con agua) para reducir el riesgo de precipitación. Se utilizará una sonda que NO sea de material poliuretano para evitar el riesgo de absorción del alcohol que contiene la solución. Utilizar sonda de PVC o silicona. <u>Sondas disponibles en UCI:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Sonda Levin (RUSCH Europlast)[®] 16 y 18F: PVC. Compatible. - Sonda nasogástrica (Flocare Nutricia[®]) 12F: poliuretano. Incompatible
Cloroquina	Resochin [®] 250mg comp	Es preferible no partir los comprimidos; sin embargo, los comprimidos de cloroquina pueden ser triturados y mezclados con mermelada, miel, yogur o similar.
Hidroxiclоро- quina	Dolquine [®] 200mg comp	Es preferible no partir los comprimidos; sin embargo, algunas fuentes sugieren triturar los comprimidos y dispersar en agua. Recomendación: utilizar hidroxiclороquina solución 25mg/ml (Fórmula magistral preparada en el S.Farmacia).

INTERACCIONES: Se recomienda visitar la siguiente página web <http://www.covid19-druginteractions.org/> o cualquier otra fuente de información contrastada para detectar posibles interacciones con cualquier tratamiento prescrito

**ALGORITMO PARA EL MANEJO DIAGNÓSTICO Y TERAPEÚTICO DE LA INFECCIÓN
POPR SARS-CoV-2 DEL HOSPITAL GENERAL DE ELCHE MARZO 2020.**

**RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO INFECCIÓN COVID-19
Tratamiento ANTIVÍRICO y/o INMUNOMODULADOR**

Hospital General Universitario de Elche 31-03-2020

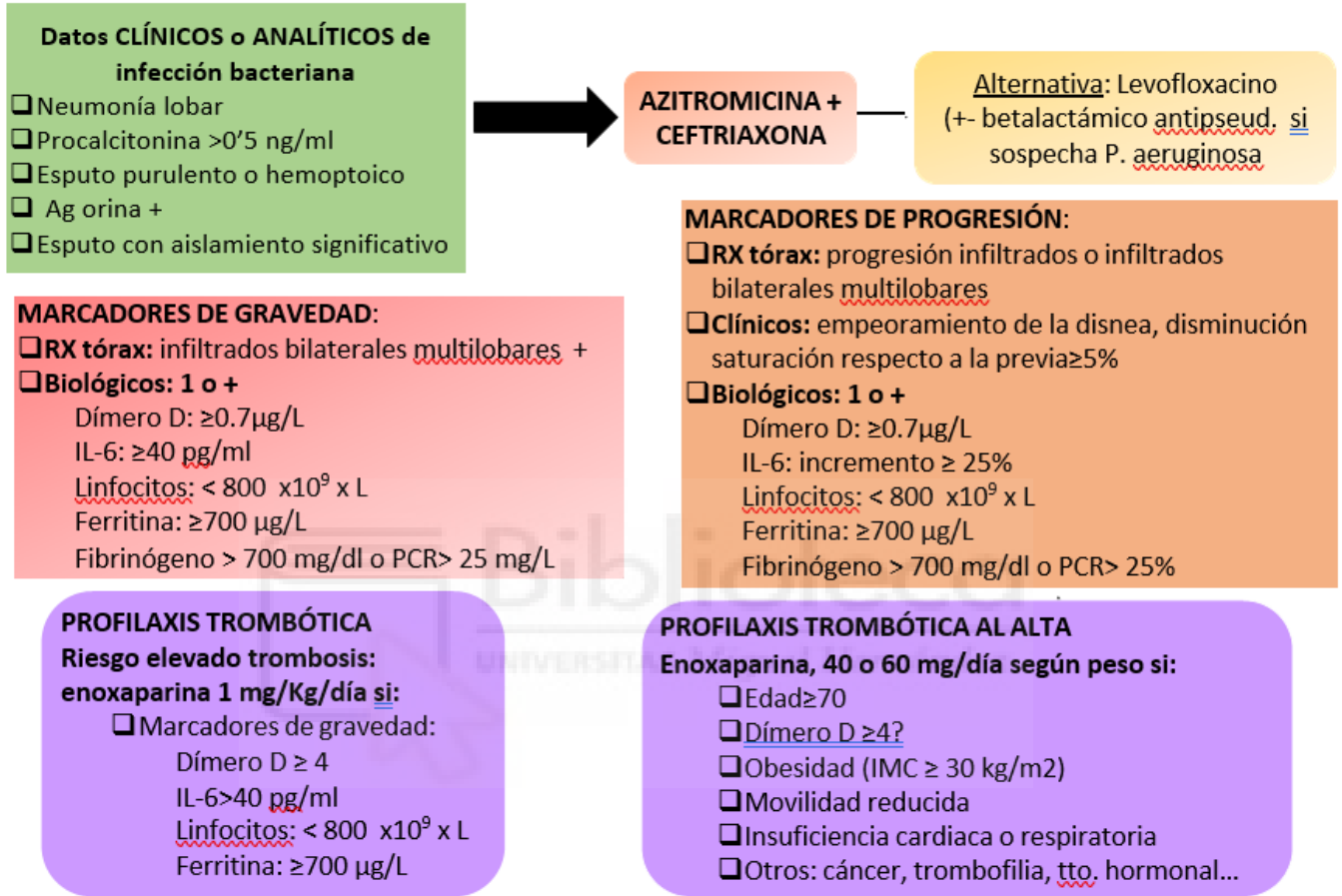


[§]Mayores de 65 años, mujeres, cardiopatía (ICC, Sd. coronario agudo, MCP hipertrofica), I. Renal Crónica en Dialisis. *K > 4, Mg > 2;

ALGORITMO PARA EL MANEJO DIAGNÓSTICO TERAPEÚTICO DE LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2 HOSPITAL GENERAL DE ELCHE MARZO 20

RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO INFECCIÓN COVID-19

Hospital General Universitario de Elche



ANEXO III. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS







OPEN

Preemptive interleukin-6 blockade in patients with COVID-19

Lucía Guillén¹, Sergio Padilla¹, Marta Fernández¹, Vanesa Agulló¹, José Alberto García¹, Guillermo Telenti¹, Javier García-Abellán¹, Ángela Botella¹, Félix Gutiérrez^{2,3,4}✉ & Mar Masía^{2,3,4}✉

Excessive interleukin-6 signaling is a key factor contributing to the cytokine release syndrome implicated in clinical manifestations of COVID-19. Preliminary results suggest that tocilizumab, a humanized monoclonal anti-interleukin-6 receptor antibody, may be beneficial in severely ill patients, but no data are available on earlier stages of disease. An anticipated blockade of interleukin-6 might hypothetically prevent the catastrophic consequences of the overt cytokine storm. We evaluated early-given tocilizumab in patients hospitalized with COVID-19, and identified outcome predictors. Consecutive patients with initial Sequential-Organ-Failure-Assessment (SOFA) score < 3 fulfilling pre-defined criteria were treated with tocilizumab. Serial plasma biomarkers and nasopharyngeal swabs were collected. Of 193 patients admitted with COVID-19, 64 met the inclusion criteria. After tocilizumab, 49 (76.6%) had an early favorable response. Adjusted predictors of response were gender, SOFA score, neutrophil/lymphocyte ratio, Charlson comorbidity index and systolic blood pressure. At week-4, 56.1% of responders and 30% of non-responders had cleared the SARS-CoV-2 from nasopharynx. Temporal profiles of interleukin-6, C-reactive protein, neutrophil/lymphocyte ratio, NT-ProBNP, D-dimer, and cardiac-troponin-I differed according to tocilizumab response and discriminated final in-hospital outcome. No deaths or disease recurrences were observed. Preemptive therapy with tocilizumab was safe and associated with favorable outcomes in most patients. Biological and clinical markers predicted outcomes.

The pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) has become one of the greatest global health challenges. The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) has spread to the five continents and caused more than 8,000,000 new infections and 400,000 deaths. Although the majority of infected people have a mild disease with good prognosis, a subset of patients develops bilateral interstitial pneumonia, diffuse alveolar injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS), which carries a mortality higher than 50% and constitutes the main cause of death^{1,2}. In contrast to other respiratory viral infections like influenza, a major pathogenic mechanism implicated in severe clinical manifestations of COVID-19 is an aberrant host immune response resulting in an excessive cytokine and chemokine release known as “cytokine storm” or “cytokine release syndrome”^{2,3}. Among immune molecules contributing to the cytokine-mediated damage and inflammation, interleukin-6 (IL-6) is one of the key factors³. Patients with COVID-19 show high plasma levels of IL-6, which correlate with disease severity and multiorgan failure^{4,5}. Excessive IL-6 signaling induces different biological effects that, in addition to the immune system and inflammation mediators, also involve the blood vessels or the myocardium, and result in organ damage^{6,7}. Due to the different pathogenic mechanisms implicated in COVID-19, combined therapeutic approaches including both antivirals and blockage of inflammatory pathways have been advocated for an optimal disease control⁸.

Tocilizumab (TCZ) is a humanized monoclonal anti-IL-6 receptor antibody, subclass IgG1. Because of the prominent role of IL-6 in COVID-19, it was the first drug proposed for the treatment of the inflammatory complications in patients with severe disease⁹. However, data are limited to a scarce number of studies that mostly included severely ill patients¹⁰⁻¹³. Several questions remain to be elucidated. First, whether TCZ administration at an earlier stage of disease might hypothetically prevent the catastrophic consequences of the overt cytokine

¹Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Camí de la Almazara S/N, Elche, 03203 Alicante, Spain. ²Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, Ctra. de Valencia (N-322), Km 87, 03550 San Juan de Alicante, Spain. ³Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad S/N, Elche, 03202 Alicante, Spain. ⁴These authors contributed equally: Félix Gutiérrez and Mar Masía. ✉email: gutierrez_fel@gva.es; mmasia@umh.es

storm. As a counterpart, since IL-6 can both facilitate but also suppress viral replication^{14,15}, TCZ could have a detrimental impact on viral clearance if given prematurely. Therefore, information on the effect of TCZ on SARS-CoV-2 replication might help understanding the benefits and risks of therapy. A third question refers to whether there could be predictors of a higher probability of response to TCZ to select the most suitable candidates for therapy and to design alternative strategies for the anticipated non-responders. Finally, mid-term effects and incidence of disease recurrences after treatment cessation, or complications derived from the TCZ-associated immunosuppression in patients diagnosed with COVID-19 remain to be determined.

In March 2020, the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices granted an emergency-use authorization for using TCZ in the setting of COVID-19, and our center developed specific guidelines for treating patients requiring hospital admission. The institutional guidelines included the use of TCZ at an early stage of disease, according to predefined criteria, evaluating clinical, biological and virological outcomes. In this article we describe the short and mid-term effects of early therapy with TCZ and identify predictors of a higher probability of response.

Results

During the study period, 193 adult patients were admitted with COVID-19. Of them, 89 received TCZ, and 64 met the inclusion criteria and were selected for the analysis; 55 of them had SARS-CoV-2 infection confirmed by RT-PCR. Overall cohort mortality (95% CI) was 5.6 (3–10)%; 4.5 (1.5–11.7)% in patients receiving TCZ, and no deaths occurred in patients meeting the inclusion criteria. Median (Q1–Q3) SOFA score was 1.5 (1–2), and median (Q1–Q3) number of days from illness onset to hospital admission was 10 (7–14). Baseline characteristics of included patients are shown in Table 1. Median (Q1–Q3) age was 62 (56–74) years, and 47 (73%) were male. The majority (61%) of patients had coexisting comorbid diseases, mainly hypertension (34%), cardiovascular disease (14%), diabetes (14%) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (5%), with median (Q1–Q3) Charlson comorbidity index score of 2 (1–4). Antimicrobial and/or immunomodulatory therapy administered during hospital stay is detailed in Table 1.

After therapy with TCZ, 49 (76.6%) patients had a favorable and 15 (23.4%) unfavorable response or adverse outcome, defined as an increase in the SOFA score > 2 measured at 48–72 h or at day 7 (12 patients; 18.8%), ICU admission (3 patients, 4.7%) or death (0 patients). Patients with favorable response to TCZ were younger (60 [53–69] vs 77 [68–85] years, $p = 0.002$), had a significant lower Charlson comorbidity index (1 [1, 2] vs 3 [1, 3], $p = 0.005$), lower frequency of diabetes (4 [8%] vs 5 [33%], $p = 0.022$), lower mean (91 [83–96] vs 99 [90–104] mm Hg, $p = 0.032$) and systolic (120 [112–129] vs 135 [123–148] mm Hg, $p = 0.003$) blood pressure, lower axillary temperature, higher pulse oximetry saturation (96 [95–97]% vs 95 [94–96], $p = 0.040$), lower SOFA score (2 [2–2] vs 1 [1, 2], $p = 0.009$), lower neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) (2.4 [1.4–3.3] vs 8.1 [3.7–11.2], $p = 0.009$), and lower LDH levels (240 [188–278] vs 280 [232–329] U/L, $p = 0.041$). Responders to TCZ had received less frequently interferon- β -1b (7 [14%] vs 4 [27%], $p = 0.019$), with no differences between groups in the frequency of treatment with methylprednisolone. There were no disease recurrences after TCZ interruption, or additional bacterial infections as a complication of therapy during hospitalization or at the 4-week follow-up visit. Among the 55 patients meeting the inclusion criteria with confirmed SARS-CoV-2 infection by RT-PCR, there were 43 (78.18%) responders and 12 (21.82%) non-responders. When both groups were compared, the results were similar to those observed in the 64 patients comprising the entire study sample (see Supplementary Table 1).

Table 2 shows the multivariate logistic regression analysis to identify predictors of response to TCZ. The model showed that male sex (OR 6.70; 95% CI 1.05–42.96), a NLR > 2.55 (OR 4.55; 95% CI 1.03–20), higher SOFA score (OR 6.05; 95% CI 1.27–28.8 per unit increase), higher systolic blood pressure (OR 1.07; 95% CI 1.01–1.14 per mmHg) and higher Charlson comorbidity index (OR 1.35; 95% CI 1.03–1.79 per unit increase), were associated with unfavorable outcome following TCZ administration. In a sensitivity analysis including only the 55 patients with confirmed SARS-CoV-2 infection by RT-PCR, the significant variables in the adjusted multivariate model were a NLR > 2.55 (OR 5.26; 95% CI 1.02–25), higher Charlson comorbidity index (OR 1.56; 95% CI 1.04–2.34) per unit, and higher SOFA score (OR 5.05; 95% CI 1.10–23.24) (Supplementary Table 2).

Figure 1 shows the temporal changes of several biomarkers in TCZ responders and non-responders analyzed through local polynomial regression. Non-response to TCZ was associated with an increase in IL-6 not observed in responders ($p < 0.001$), and the same occurred for the levels of D-dimer ($p = 0.003$), the NLR ($p < 0.001$), and the NT-ProBNP ($p = 0.02$). For the platelet/D-dimer ratio, initial levels were significantly lower in non-responders ($p = 0.005$), although trends were not significantly different between groups. The CRP levels decreased in both groups, and the decrease tended to be faster in responders to TCZ ($p = 0.07$).

Table 3 shows ROC analysis to identify plasma biomarkers and clinical variables that, measured at 48 h after TCZ initiation, best discriminated between favorable or unfavorable further clinical outcome. The best predictors among the biomarkers were the CRP, the platelet/D-dimer ratio and the hs-cardiac troponin. At 48 h of TCZ initiation, a CRP value above 25 mg/dL (specificity [SP] 86%; sensitivity [SE] 68%; area under the ROC curve [AUC] [95% CI] 0.78 [0.63–0.92]), a platelet/D-dimer ratio above 343 (SP, 92%; SE, 61%; AUC [95% CI] 0.73 [0.59–0.87]) and a hs-cardiac troponin I higher than 0.02 ng/mL (SP, 82%; SE, 58%; AUC [95% CI] 0.74 [0.57–0.91]) significantly predicted an unfavorable subsequent response. A cut-off value > 5 of a composite score including 10 clinical and biological variables (Table 3) showed a specificity of 90% and a sensitivity of 91% to predict adverse outcome, with an AUC (95% CI) of 0.96 (0.91–1.00). A sensitivity analysis including only the 55 patients with microbiologically confirmed infection showed significant AUC [95% CI] for the CRP (0.80 [0.65–0.96]) and the platelet/D-dimer ratio (0.73 [0.59–0.87]), and also for the NLR (0.71 [0.52–0.86]) and LDH (0.73 [0.55–0.90]) (Supplementary Table 3).

SARS-CoV-2 RNA levels in nasopharyngeal samples at TCZ initiation were not different between responders, who showed a median (Q1–Q3) viral load of 3.89 (2.86–4.59) copies/swab, and non-responders, with 3.48

Variables ^a	All		Death, ICU admission or SOFA ≥ 3				OR (CI 95%)	P value ^b
			Yes		No			
Patients, no	64		15		49		–	–
Male, no. (%)	47	(73)	13	(86)	2	(13)	2.86 (0.57–14.31)	0.317
Age, years	62	(56–74)	77	(68–85)	60	(53–69)	1.10 (1.04–1.16)	0.002
Coexisting conditions								
Charlson-CI	2	(1–4)	3	(1–3)	1	(1–2)	1.51 (1.13–2.01)	0.005
Any ^c , no. (%)	39	(61)	11	(73)	28	(57)	2.06 (0.57–7.39)	0.266
Hypertension, no. (%)	22	(34)	7	(47)	15	(31)	1.98 (0.61–6.47)	0.256
Diabetes, no. (%)	9	(14)	5	(33)	4	(8)	5.62 (1.27–24.76)	0.022
Cardiovascular disease ^d , no. (%)	9	(14)	3	(20)	6	(12)	1.79 (0.38–6.33)	0.454
COPD, no. (%)	3	(5)	2	(13)	1	(2)	0.13 (0.01–1.61)	0.072
Days from illness onset	10	(7–14)	9	(4–15)	11	(8–14)	0.94 (0.84–1.06)	0.337
Vital signs								
Body temperature, °C	36.5	(36.1–36.9)	36.9	(36.4–37.3)	36.4	(36.1–36.7)	4.64 (1.14–15.23)	0.011
Systolic blood pressure, mmHg	120	(113–134)	135	(123–148)	120	(112–129)	1.06 (1.02–1.11)	0.003
Diastolic blood pressure, mmHg	74	(70–81)	80	(67–87)	74	(70–80)	1.02 (0.97–1.07)	0.419
Mean blood pressure ^f	92	(86–99)	99	(90–104)	91	(83–96)	1.08 (1.01–1.15)	0.032
Supplemental oxygen, no (%)	54	(84)	14	(93)	40	(82)	3.15 (0.36–27.14)	0.296
SpO ₂ , percentage	96	(95–97)	95	(94–96)	96	(95–97)	0.64 (0.42–0.98)	0.040
SpO ₂ /FIO ₂	346	(337–365)	342	(339–360)	346	(335–365)	0.99 (0.98–1.01)	0.281
SOFA score	1.5	(1–2)	2	(2–2)	1	(1–2)	16.2 (1.99–131.74)	0.009
Bilateral lung infiltrates, no (%)	47	(73)	11	(73)	36	(73)	0.76 (0.19–2.92)	0.695
Laboratory findings								
Lymphocyte count, × 10 ³ /μL	1.06	(0.82–1.57)	0.99	(0.71–1.29)	1.12	(0.83–1.61)	1.26 (0.84–1.87)	0.250
Neutrophil-to-lymphocyte ratio	2.5	(1.8–5.3)	8.1	(3.7–11.2)	2.4	(1.4–3.3)	1.21 (1.05–1.40)	0.009
C-reactive protein, mg/L	50	(18–91)	85	(52–148)	45	(18–76)	1.01 (0.99–1.01)	0.126
IL-6, pg/mL	85	(39–181)	108	(45–241)	84	(23–159)	1.01 (0.99–1.01)	0.507
D-dimer, μg/mL	0.83	(0.46–1.73)	1.36	(0.7–2.13)	0.61	(0.46–1.19)	0.98 (0.77–1.23)	0.875
Lactate dehydrogenase, U/L	243	(193–297)	280	(232–329)	240	(188–278)	1.01 (1.01–1.01)	0.041
Ferritin, ng/mL	439	(307–634)	448	(323–596)	438	(301–648)	0.99 (0.99–1.01)	0.674
High HS-cardiac troponin I, no. (%) ^g	10	(18)	4	(31)	6	(14)	2.81 (0.65–12.10)	0.164
NT-proBNP, pg/mL	82	(36–188)	85	(10–303)	80	(41–171)	1.00 (0.99–1.01)	0.777
Concomitant antimicrobial/immunomodulatory drugs, no. (%)								
HCQ-based combinations	64	(100)	15	(100)	49	(100)	–	–
Azithromycin	60	(94)	14	(93)	46	(94)	1.09 (0.10–11.3)	0.938
Lopinavir/ritonavir	63	(98)	14	(93)	49	(100)	10.2 (0.39–256.1)	0.091
Remdesivir	0	–	–	–	–	–	–	–
Interferon-β-1b	11	(17)	4	(27)	7	(14)	0.16 (0.03–0.82)	0.019
Methylprednisolone ^e	11	(17)	2	(13)	9	(18)	1.46 (0.28–7.65)	0.653
Follow-up								
SpO ₂ /FIO ₂ (48 h)	346	(323–359)	312	(273–354)	350	(339–358)	0.98 (0.97–0.99)	0.032
C-reactive protein (48 h), mg/L	22	(8–44)	46	(32–81)	16	(7–37)	1.02 (1.01–1.03)	0.011
Supplemental oxygen (48 h), no (%)	50	(78)	14	(93)	36	(74)	5.05 (0.60–42.3)	0.135
Supplemental oxygen (7 days), no (%)	43	(67)	14	(93)	29	(59)	9.65 (1.17–79.4)	0.035
Radiological progression	13	(20)	3	(20)	10	(20)	0.97 (0.23–4.19)	0.973
SOFA ≥ 3 during follow-up, no (%)	12		12		–		–	–
ICU admission	3		3		–		–	–
Death	0		–		–		–	–

Table 1. Demographic, clinical and laboratory findings on admission. ICU intensive care unit, Charlson-CI Charlson Comorbidity Index, SpO₂ pulse oximetric saturation, FIO₂ fraction of inspired oxygen, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, HCQ hydroxychloroquine, IL-6 interleukin 6, NT-proBNP N-terminal Pro B-type Natriuretic Peptide. ^aValues expressed as median (interquartile range) unless stated otherwise. ^bP values are obtained from univariate logistic regression modeling. ^cCardiovascular (i.e., hypertension, coronary artery disease, chronic heart failure, cerebrovascular disease and peripheral arterial disease), respiratory (i.e., chronic obstructive pulmonary disease [COPD], asthma), chronic kidney failure, immunosuppression, malignancy, liver cirrhosis, systemic autoimmune disease or diabetes mellitus. ^dCardiovascular disease other than hypertension. ^eShort course methylprednisolone 0.5–1 mg/kg/day divided in 2 intravenous doses for 3 days. ^fMean blood pressure was calculated as (2/3-diastolic blood pressure) + (1/3-systolic blood pressure). ^gValues for HS-cardiac troponin I were available in 57 patients (44 and 13 in favorable and unfavorable groups, respectively). Since they were skewed left, resulting in very few cases with values above upper normal limit and precluding calculation of informative odds ratios and 95% confidence intervals, the variable was categorized with a cut-off value of 0.2 ng/mL.

Baseline variable	OR (95% CI)	P value
Male sex	6.70 (1.05–42.96)	0.045
Charlson-CI, per unit	1.35 (1.03–1.79)	0.032
Systolic blood pressure, per mmHg	1.07 (1.01–1.14)	0.027
SOFA score, per unit	6.05 (1.27–28.8)	0.024
Neutrophil-to-lymphocyte ratio > 2.55	4.55 (1.03–20)	0.045
Platelet-to-D-dimer ratio < 200	3.05 (0.81–11.45)	0.098

Table 2. Predictors of unfavorable outcome after tocilizumab initiation in multivariate logistic regression analysis. Unfavorable response was defined as reaching a SOFA score > 2 during hospital stay, Intensive Care Unit admission or death. *Charlson-CI* Charlson Comorbidity Index, *SOFA* Sequential Organ Failure Assessment.

(2.5–5.249) copies/swab ($p = 0.863$). Figure 2 shows temporal changes of SARS-CoV-2 RNA obtained from nasopharyngeal swabs among TCZ responders and non-responders analyzed through local polynomial regression. At 1 month after admission, 23/41 (56.10%) of TCZ responders and 3/10 (30%) of non-responders showed undetectable viral load ($p = 0.173$).

Discussion

In this cohort of patients admitted with COVID-19 in whom TCZ was used at an earlier stage of disease, there was a low rate of mortality. Previous studies included severely-ill patients, and mortality rates between 10 and 20%^{11–13}, with the exception of a study including 20 patients, where no deaths occurred¹⁰. Our results support that prompt initiation of therapy with TCZ is safe in the short and mid-term, and might be associated with a favorable outcome in patients hospitalized with COVID-19, as reflected by the low overall mortality observed in our entire cohort of patients admitted for COVID-19, which was lower than the 21.8% mortality described in hospitalized patients in Spain (<https://www.mscbs.gob.es/en/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/situacionActual.htm>). We identified early clinical and biological predictors of response to TCZ, which might contribute to selecting alternative strategies for the anticipated non-responders. We found that non-response to TCZ was associated with higher SOFA score and systolic blood pressure on admission, as well as a higher Charlson comorbidity index. Baseline levels and the initial response after TCZ administration of some biomarkers were also useful to predict the clinical outcome; a lower NLR on admission, and lower platelet/D-dimer ratio and hs-cardiac troponin I at 48 h following TCZ initiation were associated with favorable TCZ response. Likewise, the performance of several biomarkers after TCZ initiation revealed to be useful to discriminate among responders and non-responders. Specifically, the levels of IL-6, NLR, D-dimer, NT-ProBNP, and the platelet/D-dimer ratio showed an increase in non-responders that was not observed in responders.

One of the concerns regarding anti-IL-6 therapy is the potential risk of impaired viral infection control. IL-6 regulates the immune response through differentiation of CD4 and CD8 T cells to induce a cytotoxic and cytolytic activity against pathogens¹⁴. In experimental studies, IL-6 has demonstrated to induce T cell and B cell responses against viruses for viral clearance, the phagocytic activity of macrophages and tissue remodeling^{16,17}, and to suppress the replication of viruses like hepatitis B or HIV^{14,18}. Therefore, anti-IL-6 therapy could potentially have detrimental consequences if given too early in patients with COVID-19, before the full effect of the antivirals has been established. However, data also exist pointing to a negative influence of IL-6 on viral clearance by inhibition of CD8 T cell response, favoring viral persistence through a synergistic interaction with IL-17¹⁹, leading to higher viral replication²⁰ and higher virulence^{21,22}. In our cohort, patients receiving TCZ had a favorable outcome, and viral clearance was not significantly different among those with favorable or unfavorable response, although due to the low number of patients, our study cannot exclude a potential relationship between the worse clinical outcome and a negative effect of TCZ on viral dynamics in the subgroup of non-responders. We neither observed additional bacterial infections as a complication of therapy during hospitalization or at the 30-day follow-up visit.

We analyzed baseline and serial levels of biomarkers of inflammation, coagulation and myocardial function on an every-other-day schedule during hospital stay, and at 1 month after admission. We found that the initial levels of a number of different biomarkers allowed the prediction of subsequent response to TCZ. Lower levels on admission of the NLR were associated with a favorable TCZ response after adjusting for other predicting covariables. This biomarker reflects excessive inflammation and dysregulation of immune cells that play a central role in severity of disease in viral infections²³, and has been associated with mortality in patients hospitalized with COVID-19²⁴. The NLR has shown to be the most important factor for the early-stage prediction of disease progression in patients with COVID-19, and a useful tool for risk stratification²⁵. Our findings support a similar central role of the NLR for the prediction of response to TCZ, and also suggest that early initiation of therapy with TCZ before the catastrophic hyper-inflammatory response has been triggered might improve the prognosis of patients with COVID-19.

In addition to baseline levels, we found that the initial response of some biomarkers after TCZ administration also predicted disease outcome. The levels of CRP at 48 h after TCZ infusion with a cut-off value of 25 mg/dL showed a high specificity and moderate-to-high sensitivity to predict favorable subsequent response. The same was observed with a cut-off value of 343 for the platelets/D-dimer ratio and of 0.02 ng/mL for the hs-cardiac troponin I, although for the latter value the sensitivity was fair. The association of biomarkers of coagulation

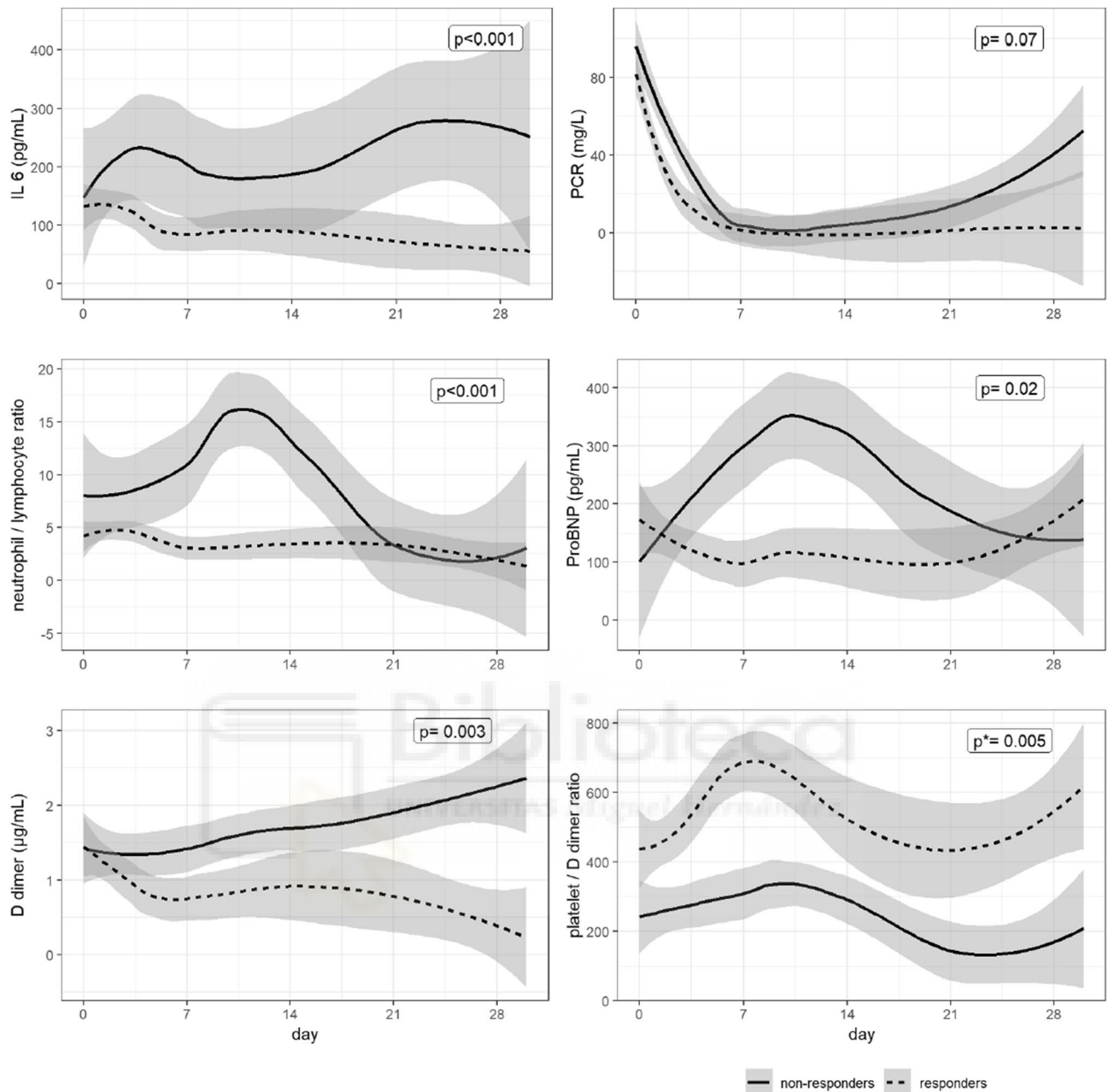


Figure 1. Temporal changes in the levels of several biomarkers in tocilizumab responders and non-responders analyzed through local polynomial regression. P values for the comparison in the temporal trends between responders and non-responders. *P value for the comparison of baseline levels of the biomarker between responders and non-responders. No significant differences observed in the temporal trends between groups. LOD limit of detection.

and myocardial function with outcome reflects the multifactorial pathogenesis of COVID-19, and its potential reversibility with anti-IL-6 therapy before the overt disease is manifested. Conversely, further immune-based or antiviral therapy should be considered in addition to TCZ when the initial levels of the biomarkers predict poor response, in order to optimize treatment results.

The performance of several biomarkers after drug administration was another factor contributing to characterize the responders to TCZ. The levels of the inflammation markers IL-6 and the NLR showed an increasing trend during the following days after TCZ initiation in non-responders, and peaked several days afterwards; by contrast, they remained relatively stable in patients with favorable outcome. As a result, in some patients TCZ would not be capable of inhibiting the cytokine storm, and this would be a predictor of poor outcome. IL-6 showed a second peak during the 4th week after TCZ, and the same was seen for CRP, and again only in non-responders, probably reflecting more than one flare of disease in this subset of patients. In addition to inflammation, a biomarker of cardiac disease such as the proBNP also showed a raising trend in non-responders,

Variable	Absolute variable value at 48 h			
	AUC (95% CI)	Cut-off value	Sp	Sn
C-reactive protein	0.78 (0.63–0.92)	25 mg/L	86	68
IL-6	0.65 (0.42–0.88)	177 pg/mL	63	79
Neutrophil-to-lymphocyte ratio	0.67 (0.48–0.86)	5.3	64	79
Lactate dehydrogenase	0.66 (0.47–0.84)	307 U/L	50	89
HS-cardiac troponin I	0.74 (0.57–0.91)	0.02 ng/mL	82	58
Platelets	0.68 (0.49–0.86)	$182 \times 10^3/\mu\text{L}$	50	92
Platelet-to-D-dimer ratio	0.73 (0.59–0.87)	343	92	61
SpO ₂	0.81 (0.69–0.93)	96%	93	69
SpO ₂ /FIO ₂	0.70 (0.53–0.88)	334	67	79
Systolic blood pressure	0.69 (0.54–0.84)	120 mmHg	88	50
Composite score	0.96 (0.91–1.00)	5.5	90	91
Simplified composite score ^a	0.91 (0.91–0.82)	1.5	83	99

Table 3. Performance in ROC analysis of serum biomarkers and clinical variables at 48 h of tocilizumab initiation on clinical outcome. Unfavorable response was defined as reaching a SOFA score > 2 during hospital stay, Intensive Care Unit admission or death. *IL-6* Interleukin 6, *HS* high-sensitivity, *AUC* area under the ROC curve, *CI* confidence interval, *Sp* specificity (%), *Sn* sensitivity (%). ^aComposite score using IL-6, platelets, SpO₂ and SpO₂/FIO₂ variables.

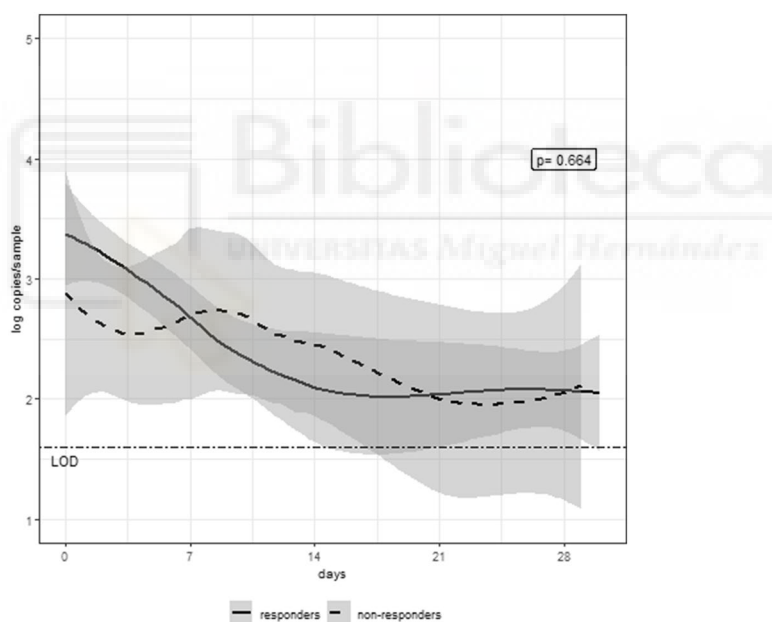


Figure 2. Temporal changes in the levels of SARS-CoV-2 RNA obtained from nasopharyngeal swabs among tocilizumab responders and non-responders analyzed through local polynomial regression. P value for the comparison in the temporal trend between responders and non-responders.

suggesting that myocardial dysfunction may contribute as well to the lung complications and adverse outcome. The same occurred with D-dimer, an independent predictor of hospital death in patients with COVID-19²⁶, that reflects a pro-coagulant state and increased thrombotic risk associated with severe disease in COVID-19²⁷, and which only showed a decreasing trend in patients responding to TCZ. The role of IL-6 in venous thromboembolism remains to be well defined. While IL-6 has been associated with the resolution of thrombi through macrophage recruitment and the induction of proteolytic enzymes²⁸, other studies have demonstrated an association between the development of deep venous thrombosis and the inflammatory injury of vascular endothelial cells caused by the imbalance of cytokine expression and, particularly, IL-6 was significantly upregulated in clinical and experimental studies of deep venous thrombosis, and blocking IL-6 in mice with neutralizing antibodies inhibited the formation and development of thrombosis²⁹.

The Charlson comorbidity index was a predictor of response to TCZ. Our patients had a high frequency of hypertension, followed by cardiovascular diseases, diabetes and COPD, as described in other series³⁰. The

four comorbidities are included in the Charlson index, and have been associated with higher disease severity in patients with COVID-19³¹. Although the implicated pathogenic mechanisms have not been characterized, in patients with diabetes or underlying cardiovascular disease, the infection could induce additional damage due to direct or indirect effects related to inflammation, hypercoagulable state and hypoxia³², which may aggravate the acute respiratory syndrome. The inverse association observed between the Charlson score and the response to TCZ supports the recent results of a nationwide cohort of hospitalized patients with COVID-19, where a greater number of comorbidities was associated with poorer outcome³³.

Blood pressure showed to be an independent predictor of response to TCZ, and lower levels on admission were associated with a better response to TCZ. SARS-CoV-2 binds to the angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) receptor, and the expression of ACE-2 is increased in patients treated with ACE inhibitors and angiotensin II type-I receptor blockers^{34,35}. This may facilitate infection with SARS-CoV-2, and might also lead to higher severity of disease and mortality. Higher systolic blood pressure in our study could be a surrogate marker of hypertension, and might also be associated with raised filling pressures and contribute to pulmonary edema in patients with ARDS. Interestingly, increased levels of hs-troponin I and NT-proBNP were associated with non-response to TCZ, which might suggest that the cytokine-related stress cardiomyopathy might not be reversed by TCZ if it is not promptly initiated. This impaired myocardial function may be aggravated in patients with higher blood pressures and/or hypertensive heart disease.

Limitations of the study are the absence of a comparable control group, and the possibility of a selection bias in patients receiving TCZ due to the observational nature of the study. The small number of non-responders to TCZ does not allow to exclude a role of viral load as a predictive factor, and other potential contributors like the host immune response were not explored in the study. Strengths are the distinctive characteristics of the population included, and the exhaustive sequential analysis of a high number of biomarkers following TCZ administration which, in addition to clinical factors, allowed the characterization of the patients with a higher probability of response.

In conclusion, early therapy with TCZ is safe and it is associated with low mortality. Our results suggest that a prompt use of TCZ before the overwhelming secretion of cytokines has occurred might lead to better patient outcomes, and support confirmatory randomized clinical trials to assess the role of immune modulator therapies at an early stage of COVID-19.

Methods

From all hospital admissions due to COVID-19 at Hospital Universitario of Elche, Spain, between March 10th and April 17th, 2020, consecutive patients treated with TCZ with an initial SOFA score < 3 were included in the analysis. Patients with confirmed or probable COVID-19 according to European Centre for Disease Prevention and Control criteria (<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>) were included. Microbiological confirmation was performed through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) from a nasopharyngeal smear sample or a bronchial aspirate.

Patients were managed according to a pre-defined protocol approved by Hospital General Universitario de Elche, consisting in the collection of epidemiological, demographic, and clinical data, as well as serial nasopharyngeal samples for SARS-CoV-2, chest X-ray, and routine blood tests including levels of interleukin 6 (IL-6), ferritin, lactate dehydrogenase (LDH), magnesium, procalcitonin, C-reactive protein (CRP), N-terminal pro b-type natriuretic peptide (NT-proBNP), highly sensitive (hs)-troponin I, D-dimer, and coagulation tests. Comorbidities and the Charlson comorbidity index were collected on admission. Blood samples for lab tests, electrocardiogram (EKG), chest X-ray and nasopharyngeal samples for SARS-CoV-2 were obtained at different time points during hospital stay. In addition to SARS-CoV-2, PCR analysis for influenza A and B viruses and for respiratory syncytial virus (RSV) were also performed from nasopharyngeal samples upon admission, as well as pneumococcal and *Legionella* antigens from a urine sample, and serological test for HIV, HCV and HBV, and the Quantiferon test.

As stated before, therapy for COVID-19 was given following institutional guidelines of Hospital General Universitario de Elche. Patients received antimicrobial and/or immunomodulatory therapy containing lopinavir/ritonavir, hydroxychloroquine, azithromycin or interferon- β -1b \pm methylprednisolone. According to guidelines, tocilizumab (TCZ) was added to initial therapy on admission if any of the following criteria were met: a CURB-65 > 2; oxygen saturation < 93%; respiratory frequency > 30 per min; a chest radiograph with bilateral multilobar infiltrates; one of the following biological markers: D-dimer ≥ 0.7 $\mu\text{g/L}$, IL-6 ≥ 40 pg/mL , lymphocytes < $800 \times 10^9/\text{L}$, ferritin ≥ 700 $\mu\text{g/L}$, fibrinogen > 700 mg/dL or PCR > 25 mg/L . The dose of TCZ was 600 mg iv if the weight was ≥ 75 kg or 400 mg if the weight was < 75 kg. The patients were reevaluated on the following 24 h. Response to therapy was defined as resolution of fever, improvement in tachypnea, improvement in oxygen saturation by at least 5%, decrease in CRP of at least 25%, or no radiological progression 24 h after TCZ administration. Non-response was defined by the absence of any of 24 h response criteria, or an increase in the SOFA score > 2 measured at 48–72 h or at day 7 after TCZ, ICU admission or death. If no clinical response was achieved at 24 h after TCZ administration, a second dose of TCZ (400 mg) or intravenous corticosteroids were administered. Contraindications to the use of TCZ drug were a neutrophil count < $500 \times 10^9/\text{L}$, platelets $\leq 50,000 \times 10^9/\text{L}$, AST/ALT > 5 \times upper normal limit and documented sepsis by other pathogens. The protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital General Universitario de Elche (Spain) as part of the COVID-19@Spain study. Informed consent was obtained from all subjects.

For RNA extraction and RT-PCR analysis for SARS-CoV-2, nasal and oropharyngeal flock swabs were placed together into 3 mL transport medium (VICUM, Deltalab, Rubí, Spain). Viral RNA was extracted from 350 μL of the medium using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted in a final 50 μL nucleic acid elution sample. Eight μL RNA was used for detection of SARS-CoV-2

by RT-PCR, with a commercially available kit (ALLPLEX 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, Korea) which targeted the E, RdRP and N genes. Viral load measurements of nasal/throat samples (log₁₀ copies/sample) were performed with a standard curve of ten-fold serial dilutions from an in vitro RNA transcript (MACROGEN, Seoul, Korea). Assay procedure was carried out in accordance with the manufacturer's protocol, in a CFX96 real-time thermocycler (BIO-RAD, California, USA). The success of RNA extraction and PCR were assessed by the internal control included in the kit and negative and positive controls were used in each assay.

Statistical analyses. Continuous variables are expressed as median ± 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. Normality of data samples was assessed using Shapiro–Wilk test. Odds ratios (OR) were estimated through generalized linear models with binary response and logit link function. To represent the temporal changes of the biomarkers levels, local polynomial regression models were employed using weighted least squares to estimate the performance of each biomarker according to the day since TZC was initiated. Differences in temporal trends between biomarkers were analyzed through linear mixed models in which an interaction term of day since TCZ initiation and response was included. Confidence intervals for the area under the receiver operating characteristic curve (AUC of the ROC curve) were calculated through stratified bootstrap replicates with 2000 attempts. The cut-off values with the best sensitivity and specificity were selected. Statistical analysis was performed using R-project version 3.6.2 (2019-12-12) and the libraries ggplot2 for the figures³⁶.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 30 June 2020; Accepted: 24 September 2020

Published online: 08 October 2020

References

1. Wu, C. *et al.* Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994> (2020) (**Epub ahead of print**).
2. Fu, B., Xu, X. & Wei, H. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19?. *J. Transl. Med.* **18**, 164 (2020).
3. Zhou, Y. *et al.* Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Natl. Sci. Rev.* <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041> (2020) (**Epub ahead of print**).
4. Liu, B., Li, M., Zhou, Z., Guan, X. & Xiang, Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J. Autoimmun.* **111**, 102452 (2020).
5. Ruan, Q. R., Yang, K., Wang, W. X., Jiang, L. Y. & Song, J. X. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care. Med.* **46**, 846–848 (2020).
6. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* **8**, 959–970 (2016).
7. Pathan, A. *et al.* Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet* **363**, 203–209 (2004).
8. Gaborit, B. J. *et al.* Plea for multitargeted interventions for severe COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **S1473–3099**(20), 30312–30321 (2020).
9. Zhang, C., Wu, Z., Li, J. W., Zhao, H. & Wang, G. Q. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: Interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents* **55**, 105954 (2020).
10. Xu, X. *et al.* Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 10970–10975 (2020).
11. Toniati, P. *et al.* Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: A single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun. Rev.* **19**, 102568 (2020).
12. Alattar, R. *et al.* Tocilizumab for the treatment of severe coronavirus disease 2019 [published online ahead of print, 2020 May 5]. *J. Med. Virol.* <https://doi.org/10.1002/jmv.25964> (2020) (**Epub ahead of print**).
13. Luo, P. *et al.* Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience [published online ahead of print, 2020 Apr 6]. *J. Med. Virol.* **92**, 814–818 (2020).
14. Velazquez-Salinas, L., Verdugo-Rodriguez, A. & Rodriguez, L. L. The role of interleukin 6 during viral infections. *Front. Microbiol.* **10**, 1057 (2019).
15. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A. & Bridgewood, C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun. Rev.* **19**, 102537 (2020).
16. Yang, M. L. *et al.* IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci. Rep.* **7**, 43829 (2017).
17. Harker, J. A., Lewis, G. M., Mack, L. & Zuniga, E. I. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* **334**, 825–829 (2011).
18. Rogez-Kreuz, C. *et al.* Involvement of IL-6 in the anti-human immunodeficiency virus activity of IFN-tau in human macrophages. *Int. Immunol.* **17**, 1047–1057 (2005).
19. Hou, W., Jin, Y. H., Kang, H. S. & Kim, B. S. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. *J. Virol.* **88**, 8479–8489 (2014).
20. Wu, W. *et al.* TLR ligand induced IL-6 counter-regulates the anti-viral CD8(+) T cell response during an acute retrovirus infection. *Sci. Rep.* **5**, 10501 (2015).
21. Velazquez-Salinas, L. *et al.* Increased virulence of an epidemic strain of vesicular stomatitis virus is associated with interference of the innate response in pigs. *Front. Microbiol.* **9**, 1891 (2018).
22. Wattrang, E., Jessett, D. M., Yates, P., Fuxler, L. & Hannant, D. Experimental infection of ponies with equine influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses. *Viral. Immunol.* **16**, 57–67 (2003).
23. Channappanavar, R. & Perlman, S. Pathogenic human coronavirus infections: Causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* **39**, 529–539 (2017).
24. Liu, Y. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J. Infect.* **81**, e6–e12 (2020).
25. Liu, J. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J. Transl. Med.* **18**, 206 (2020).

26. Zhou, F., Yu, T. & Du, R. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **395**(10229), 1054–1062 (2020).
27. Levi, M., Thachil, J., Iba, T. & Levy, J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* **7**, e438–e440 (2020).
28. Nosaka, M. *et al.* Crucial involvement of IL-6 in thrombus resolution in mice via macrophage recruitment and the induction of proteolytic enzymes. *Front. Immunol.* **10**, 3150 (2020).
29. Zhang, Y. *et al.* IL (interleukin)-6 contributes to deep vein thrombosis and is negatively regulated by miR-338-5p. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 323–334 (2020).
30. Wang, Z., Yang, B., Li, Q., Wen, L. & Zhang, R. Clinical features of 69 cases with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa272> (2020).
31. Wang, T. *et al.* Comorbidities and multi-organ injuries in the treatment of COVID-19. *Lancet* **395**(10228), e52 (2020).
32. Guo, T. *et al.* Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* **5**, 811–818 (2020).
33. Guan, W. J. *et al.* Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: A nationwide analysis. *Eur. Respir. J.* **55**, 2000547 (2020).
34. Fang, L., Karakiulakis, G. & Roth, M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? [published correction appears in *Lancet Respir. Med.* 2020 May 18]. *Lancet Respir. Med.* **8**, e21 (2020).
35. Li, X. C., Zhang, J. & Zhuo, J. L. The vasoprotective axes of the renin–angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacol. Res.* **125**, 21–38 (2017).
36. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* (Springer, New York, 2016). ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Acknowledgements

This work was supported by the 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; CM 19/00160 COV20-00005]).

Author contributions

M.M. and F.G. designed research. L.G., G.T., J.G.A., and A. B. collected the data. M.F. and V.A. performed the laboratory investigations. J.A.G. and S.P. analyzed the data and prepared tables and figures. M.M. and F.G. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74001-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.G. or M.M.

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

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



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

© The Author(s) 2020





Research paper

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

Mar Masía^{a,*}, Marta Fernández-González^b, Sergio Padilla^b, Piedad Ortega^b, José A. García^c, Vanesa Agulló^b, Javier García-Abellán^b, Guillermo Telenti^b, Lucía Guillén^b, Félix Gutiérrez^{a,*}

^a Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernández, Camí de la Almazara 11, Elche, Alicante 03203, Spain

^b Hospital General Universitario de Elche, Camí de la Almazara 11, Elche, Alicante 03203, Spain

^c Operational Research Center, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain



ARTICLE INFO

Article History:

Received 25 July 2020

Revised 24 August 2020

Accepted 27 August 2020

Available online xxx

Keywords:

Tocilizumab

SARS-CoV-2

COVID-19

Viral kinetics

Antibody responses

Anti-cytokine therapy

S-IgG

N-IgG

ABSTRACT

Background: The virological and immunological effects of the immunomodulatory drugs used for COVID-19 remain unknown. We evaluated the impact of interleukin (IL)-6 blockade with tocilizumab on SARS-CoV-2 viral kinetics and the antibody response in patients with COVID-19.

Methods: Prospective cohort study in patients admitted with COVID-19. Serial nasopharyngeal and plasma samples were measured for SARS-CoV-2 RNA and S-IgG/N-IgG titers, respectively.

Findings: 138 patients with confirmed infection were included; 76 (55%) underwent IL-6 blockade. Median initial SOFA ($p = 0.016$) and SARS-CoV-2 viral load ($p < 0.001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) were significantly higher among anti-IL-6 users. Patients under IL-6 blockade showed delayed viral clearance in the Kaplan-Meier curves (HR 0.35 [95%CI] [0.15–0.81], log-rank $p = 0.014$), but an adjusted propensity score matching model did not demonstrate a significant relationship of IL-6 blockade with viral clearance (HR 1.63 [0.35–7.7]). Cox regression showed an inverse association between SARS-CoV-2 RNA clearance and the initial viral load (HR 0.35 [0.11–0.89]). Patients under the IL-6 blocker showed shorter median time to seropositivity, higher peak antibody titers, and higher cumulative proportion of seropositivity in the Kaplan Meier curves (HR 3.1 [1.9–5] for S-IgG; and HR 3.0 [1.9–4.9] for N-IgG; log-rank $p < 0.001$ for both). However, no significant differences between groups were found in either S-IgG (HR 1.56 [0.41–6.0]) nor N-IgG (HR 0.96 [0.26–3.5]) responses in an adjusted propensity score analysis.

Interpretation: Our results suggest that in patients infected with SARS-CoV-2, IL-6 blockade does not impair the viral specific antibody responses. Although a delayed viral clearance was observed, it was driven by a higher initial viral load. The study supports the safety of this therapy in patients with COVID-19.

Funding: Instituto de salud Carlos III (Spain).

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) disease (COVID-19) represents a major threat to human health worldwide. In contrast to other respiratory viruses, SARS-CoV-2 induces a hyper-inflammatory response associated with a disproportionate cytokine and chemokine release that leads to severe lung damage, multiorgan failure, and eventually death [1]. Consistently, therapeutic strategies against COVID-19 have not only involved antiviral agents,

but also different immunomodulatory drugs in an attempt to block the inflammatory pathways activated by the virus. Among them, cytokine-targeted therapies have been commonly used in patients with COVID-19, and particularly tocilizumab, a humanized monoclonal antibody anti-interleukin 6 (IL-6) receptor [2,3]. Available data on the effects of IL-6 blockade in patients with COVID-19 come from observational studies, mostly in severely-ill patients, where it has been associated with clinical and radiological improvement [4–6]. However, the impact of IL-6 blockade on SARS-CoV-2 replication and on the immune response against the virus remain largely unknown. IL-6 is a multifunctional cytokine that regulates many aspects of innate and adaptive immunity [7]. In addition to inducing acute-phase protein production, this cytokine stimulates the differentiation and maturation of cytotoxic

* Corresponding author.

E-mail addresses: marmasia@umh.es (M. Masía), gutierrez_fel@gva.es (F. Gutiérrez).

Research in context

Evidence before this study

The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) disease (COVID-19) induces a hyper-inflammatory response associated with a disproportionate cytokine and chemokine release that leads to severe lung damage, multiorgan failure, and eventually death. Consistently, in addition to antiviral agents, therapeutic strategies have also included immunomodulatory drugs in an attempt to block the inflammatory pathways activated by the virus. Among them, cytokine-targeted therapies have been commonly used, and particularly tocilizumab, a humanized monoclonal antibody anti-interleukin 6 (IL-6) receptor. In the literature search, no published studies have assessed the impact of IL-6 blockade on SARS-CoV-2 replication and on the immune response against the virus.

Added value of this study

Our study is the first to show that IL-6 blockade does not impair the specific antibody response against SARS-CoV-2. Although viral clearance is delayed in patients receiving tocilizumab, this effect is mainly driven by the initial viral load.

Implications of all the available evidence

This study supports the safety of this anti-cytokine therapeutic strategy for COVID-19 from a virological and immunological perspective. Our results can also be extrapolated to patients receiving tocilizumab for rheumatologic diseases who acquire this infection, and potentially other acute viral infections, and warrant additional studies to confirm if the same effects occur with other anti-cytokine drugs.

Patients were managed according to a pre-defined protocol that included the diagnostic and therapeutic procedures during hospital stay. Blood samples for routine lab tests and biomarkers of cytokine release syndrome, serologic tests, and nasopharyngeal samples for SARS-CoV-2 were serially obtained at different time-points during hospital stay. Plasma samples for the measurement of the levels of antibodies to SARS-CoV-2 were collected and frozen at -80°C .

Therapy for COVID-19 was given following institutional guidelines. Patients received antimicrobial and/or immunomodulatory therapy containing lopinavir/ritonavir, hydroxychloroquine, azithromycin, interferon- β -1b or remdesivir \pm methylprednisolone. According to guidelines, tocilizumab was added to initial therapy on admission at a dose of 600 mg intravenously if the weight was ≥ 75 kg or 400 mg when the weight < 75 kg if any of pre-established clinical (including oxygen saturation levels and respiratory frequency rate), radiological (presence of bilateral multilobar infiltrates) or inflammatory biomarkers (including lymphocyte count, interleukin-6, ferritin, D-dimer, fibrinogen and C-reactive protein) criteria were met (See supplementary (S)-Table 1). Patients were reevaluated on the following 24 h, and if no clinical response was achieved (S-Table 1), a second dose of tocilizumab (400 mg) or intravenous methylprednisolone were administered. The protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital General Universitario de Elche (Spain) as part of the COVID-19@Spain study. Informed consent was obtained from all subjects.

2.2. SARS-CoV-2 RNA measurement

For RNA extraction and RT-PCR analysis for SARS-CoV-2, nasal and oropharyngeal flock swabs were placed together into 3 mL transport medium (VICUM[®], Deltalab, Rubí, Spain). Viral RNA was extracted from 350 μL of the medium using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted in a final 50 μL nucleic acid elution sample. Eight μL RNA was used for detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR, with a commercially available kit (Allplex[™] 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, Korea) which targeted the E, RdRP, and N genes. Viral load measurements of nasal/throat samples (log₁₀ copies/sample) were performed with a standard curve of ten-fold serial dilutions from an in vitro RNA transcript (Macrogen, Seoul, Korea). The lower limit of detection was 64 copies/sample. Assay procedure was carried out in accordance with the manufacturer's protocol, in a CFX96 real-time thermocycler (Bio-Rad, California, USA). The success of RNA extraction and PCR were assessed by the internal control included in the kit and negative and positive controls were used in each assay.

2.3. Antibody measurement against SARS-CoV-2

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 in EDTA plasma samples using commercial semi-quantitative EIA kits in an automated instrument (Dynex DS2[®] ELISA system) following the manufacturer instructions. Antibody levels were evaluated by calculating the ratio of the optical density (OD) of the patient sample over the OD of the calibrator (sample OD/calibrator OD = S/CO [absorbance/cut-off]). Results were interpreted according to the following criteria: ratio $\leq 1 \cdot 1$ was defined as negative and ratio $> 1 \cdot 1$ as positive.

2.4. 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 anti-IL6 therapy treated and untreated patients.

T-lymphocytes, and macrophage/monocyte functions [8]. Consequently, therapy directed against IL-6 could interfere with viral clearance. Noteworthy, tocilizumab has been associated with severe viral infections caused by cytomegalovirus and varicella-zoster in patients with rheumatoid arthritis [9–11]. This would be particularly concerning due to the close correlation found between disease severity, IL-6 levels and SARS-CoV-2 viral load in patients with COVID-19 [12]. IL-6 also plays an important role in the differentiation of B-cells into antibody producing plasma cells and immunoglobulin secretion [13]. As a result, anti-IL-6 therapy might impair the antibody response against the virus, which could compromise viral clearance and future protection against reinfections.

In March 2020, the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices granted an emergency-use authorization for using tocilizumab in the setting of COVID-19, and our center developed specific guidelines for treating patients requiring hospital admission. We investigated the longitudinal effects of IL-6 blockade on viral shedding and on the antibody response to SARS-CoV-2 in a cohort of patients admitted with COVID-19 and compared them with the non-anti-cytokine-treated patients.

2. Methods

2.1. Study design and patients

This prospective, observational study was carried out at the University Hospital of Elche, Spain. All patients admitted for COVID-19 between March 10th and April 17th, 2020, were included in the analysis. Patients had confirmed or probable COVID-19 according to European centre for Disease Prevention and Control criteria (<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>). Microbiological confirmation was performed through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), mostly from nasopharyngeal smear samples, and rarely from sputum, bronchial aspirate, or fecal samples.

Kaplan Meier curves and the two-sided log-rank test were used to evaluate the differences in the duration of viral shedding and antibody positivity between patients receiving and not receiving anti-cytokine therapy. To balance treatment groups, a propensity score matching logistic regression model was fitted with a 1:1 ratio among groups. Covariates with a p-value <0.05 in the crude comparison between treatment groups were used for matching. To further adjust for the covariates that remained unbalanced between treatment groups after matching, Cox proportional hazard regression was run including the statistically different variables. Statistical analysis was performed using R-project version 3.6.2 (2019–12–12).

2.5. Role of the funding source

The funder of the study had no direct role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

3. Results

During the study period, 210 adult patients were admitted with COVID-19. Clinical data of the entire cohort are shown in S-Table 2. A total of 138 (65.7%) patients had confirmed SARS-CoV-2 infection with RT-PCR in a sample other than feces; 133 (96.4%) from nasopharyngeal samples (six patients also had positive results in sputum and four in bronchial aspirate), and 5 (3.6%) from sputum. Of them, 76 (55%) underwent IL-6 blockade. Demographic and clinical data from these patients are shown in Table 1. Patients undergoing IL-6 blockade were more frequently male, showed a higher severity of disease as supported by a higher median SOFA score at anti-cytokine therapy initiation, lower peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate on admission, higher frequency of pneumonia

Table 1
Clinical data of patients admitted with COVID-19 confirmed with real-time polymerase chain reaction.

Variable	Non Tocilizumab N = 62	Tocilizumab N = 76	Total N = 138	P
Sex, male	31 (50.0)	54 (71.1)	85 (61.6)	0.014
Age, years	68.5 (53.2–76.0)	62.0 (56.8–77.0)	64.0 (55.2–76.8)	0.961
Active smoking	35 (60.3)	42 (59.2)	77 (59.7)	1.000
Charlson comorbidity index	3.0 (1.0–5.8)	3.0 (1.0–5.0)	3.0 (1.0–5.0)	0.402
Comorbidities				
Diabetes	17 (27.4)	14 (18.4)	31 (22.5)	0.225
Congestive heart failure	5 (8.1)	4 (5.3)	9 (6.5)	0.731
Previous AMI	6 (9.7)	7 (9.2)	13 (9.4)	1.000
Stroke	8 (12.9)	1 (1.3)	9 (6.5)	0.011
Respiratory disease	10 (16.1)	13 (17.1)	23 (16.7)	1.000
Renal disease	8 (12.9)	8 (10.5)	16 (11.6)	0.791
Peripheral arterial disease	3 (4.8)	2 (2.6)	5 (3.6)	0.657
Clinical status				
Days from symptom onset to admission	6.0 (2.0–11.0)	7.0 (4.0–10.0)	7.0 (3.0–10.0)	0.321
SOFA score on admission	2.0 (1.2–2.8)	2.0 (2.0–3.0)	2.0 (2.0–3.0)	0.016
SOFA score at TCZ initiation*	2.0 (1.8–3.0)	3.0 (2.0–3.5)	2.0 (2.0–3.0)	0.017
SpO ₂ /FIO ₂ on admission	354 (346–458)	346 (336–380)	350 (343–451)	0.010
Pneumonia	36 (59.0)	63 (82.9)	99 (72.3)	0.002
Bilateral lung infiltrates on X Ray	22 (35.5)	56 (75.7)	78 (67.8)	0.022
Microbiological data				
SARS-CoV-2 RNA, log ₁₀ copies/sample	1.98 (1.59–3.63)	3.77 (2.72–4.67)	3.11 (1.97–4.30)	<0.001
Cycle threshold <36	18 (32.1)	55 (73.3)	73 (55.7)	<0.001
Cycle threshold 36–38	11 (19.6)	12 (16.0)	23 (17.6)	
Cycle threshold >38	27 (48.2)	8 (10.7)	35 (26.7)	
Peak S-IgG, S/CO	2.7 (0.1–6.3)	6.4 (5.9–7.1)	6.0 (3.4–6.9)	<0.001
Peak N-IgG, S/CO	2.8 (0.1–4.7)	4.5 (3.7–5.0)	4.3 (2.5–4.9)	0.001
Biomarkers				
Interleukin-6, pg/mL	12.7 (5.4–30.5)	44.9 (18.0–105)	23.1 (11.4–80.4)	<0.001
Ferritin, ng/mL	221 (85.8–384)	416 (257–611)	303 (142–478)	<0.001
C-reactive protein, mg/L	34.5 (4.9–68.4)	60.1 (32.9–115)	50.0 (19.9 to 98.7)	0.001
Fibrinogen, mg/dL	452.0 (347–624)	637.0 (455–792)	552 (361–760)	0.011
Lymphocytes, x10 ³ /μL	1.4 (0.9–1.9)	1.1 (0.8–1.3)	1.2 (0.8–1.5)	<0.001
Neutrophil tolymphocyte ratio	4.9 (3.5–7.2)	4.3 (3.3–6.2)	4.6 (3.5–6.7)	0.122
D-dimer, μg/mL	0.8 (0.3–2.1)	0.7 (0.5–1.6)	0.7 (0.4–1.7)	0.950
NT-proBNP, pg/mL	73.5 (25.5–235)	85.0 (41.0–238)	81.0 (38.2–242)	0.699
Outcomes				
Death	8 (12.9)	2 (2.6)	10 (7.2)	0.043
ICU admission	8 (12.9)	9 (11.8)	17 (12.3)	1.0
Hospital stay, days	9.0 (6.0–13.0)	13.0 (11.0–20.8)	12.0 (9.0–17.0)	<0.001
Concomitant antimicrobial/ immunomodulatory drugs, no. (%)				
HCQ-based combinations	61 (98.4)	74 (97.4)	135 (97.8)	1.000
Azithromycin	54 (87.1)	73 (96.1)	127 (92.0)	0.064
Lopinavir/ritonavir	48 (77.4)	76 (100.0)	124 (89.9)	<0.001
Remdesivir	1 (1.6)		1 (0.7)	0.449
Interferon-β-1b	11 (17.7)	19 (25.0)	30 (21.7)	0.407
Methylprednisolone [§]	3 (4.8)	24 (31.6)	27 (19.6)	<0.001

Categorical variables are expressed as no. and (%), and continuous variables as median (Q1–Q3). Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to compare continuous variables, and Fisher's exact test to compare categorical variables. AMI, acute myocardial infarction; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; TCZ, tocilizumab; SpO₂/FIO₂, peripheral blood oxygen saturation/fraction of inspired oxygen rate; S/CO, absorbance/cut-off; NT-proBNP, N-terminal pro b-type natriuretic peptide; ICU, Intensive Care Unit; HCQ, hydroxychloroquine. For the non-tocilizumab group, the number represents the median SOFA score of patients at anti-COVID therapy initiation. [§]Short course methylprednisolone 0.5–1 mg/kg/day divided in 2 intravenous doses for 3 days.

and bilateral lung infiltrates, and longer median hospital stay. The frequency of death was lower among patients on IL-6 blockade (2•6% vs 12•9%, $p = 0•043$, Fisher's exact test). Regarding concomitant treatment, patients receiving immunomodulatory therapy were more frequently treated with lopinavir/ritonavir, and received more frequently concomitant therapy with methylprednisolone (Table 1).

3.1. Viral dynamics of SARS-CoV-2

Patients undergoing IL-6 blockade showed significantly lower initial cycle threshold (Ct) values and higher median viral load (Table 1). At the last follow-up visit, after a median (Q1-Q3) of 39 (31–62) days and 31 (30–44) days from admission in patients with and without IL-6 blockade, respectively, 43 (57•3%) and 44 (78•6%), respectively, showed undetectable levels of SARS-CoV-2 RNA ($p = 0•015$, Fisher's exact test), and the number of patients with two consecutive negative results was 23 (30•7%) and 32 (57•1%), respectively ($p = 0•004$, Fisher's exact test). For patients who had achieved viral clearance, median (Q1-Q3) time to negative viral load was 39•0 (18•0 to 40•0) days vs 35•0 (10•8–45•0) days in patients with and without anti-cytokine therapy, respectively ($p = 0•734$, Mann-Whitney-Wilcoxon test). Kaplan Maier curves showed a greater probability of SARS-CoV-2 clearance during follow-up among non-anti-cytokine users: hazard ratio (HR) (95% confidence interval, CI) 0•35 (0•15–0•81), log-rank $p = 0•01$ for viral shedding (Fig. 1a). Cox proportional hazard regression model adjusted for the initial viral load and the SOFA score showed that the relationship of IL-6 blockade with viral clearance was significantly weakened (HR 0•60 [95% CI, 0•21–1•70], $p = 0•34$, Wald test). The model also showed that initial viral load levels (HR 0•56 [95% CI 0•36–0•87], $p = 0•01$, Wald test), but not the SOFA score (HR 1•28 [95% CI, 0•00–1•26], $p = 0•20$, Wald test) were associated with viral clearance. A propensity score matching model was fitted to further examine the effect of IL-6 blockade on viral shedding after balancing treatment groups. Covariates with a p -value $< 0•05$ in the comparison between anti-cytokine treatment groups were included in adjustment. The model yielded a total of 58 participants (29 on each group) with remaining residual differences, so it was further adjusted for the covariates that remained unbalanced between groups with a Cox proportional hazard regression analysis, specifically the levels on admission of IL-6, ferritin, C-reactive-protein (CRP), lymphocytes, and viral load. Therapy with methylprednisolone was also included to assess its effect on viral clearance. In the adjusted model, the association of IL-6 blockade with viral shedding did not remain significant: HR 1•68 (0•36–7•81), $p = 0•510$, Wald test (Fig. 1b). In a non-inferiority analysis, treatment with tocilizumab showed to be non-inferior to not receiving tocilizumab for achieving viral clearance ($p = 0.018$) (normal approximation method using a Z test statistic), considering that treatment with tocilizumab was non-inferior if the HR of the adjusted model was greater than 0.33.

3.2. Antibody response to SARS-CoV-2

Of 181 patients with available serological samples, 120 with follow-up samples were finally included for analysis (see Supplementary Figure 1). Of them, 73 (60•8%) patients underwent IL-6 blockade. The proportion of patients receiving immunomodulatory therapy with positive S-IgG and N-IgG antibodies was 94•5% ($n = 69$) after a median (Q1-Q3) of 35 (28–60) days from the onset of symptoms vs 55•3% ($n = 26$) ($p < 0•001$, Fisher test) after 31 (29–42•5) days in untreated patients. Median (Q1-Q3) time from the onset of symptoms to seropositivity for S-IgG in patients receiving anti-IL6 therapy was 14 (11–17) days vs 17 (15–24) days ($p = 0•014$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) in untreated patients (Fig. 2a); and 12 (9–14) and 15 (11•2–20•2) days, respectively, for N-IgG ($p = 0•017$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) (Fig. 2b). Peak S-IgG titers among patients with or without anti-cytokine therapy were 6•4 (5•9–7•1) vs 2•7 (0•1–6•3)

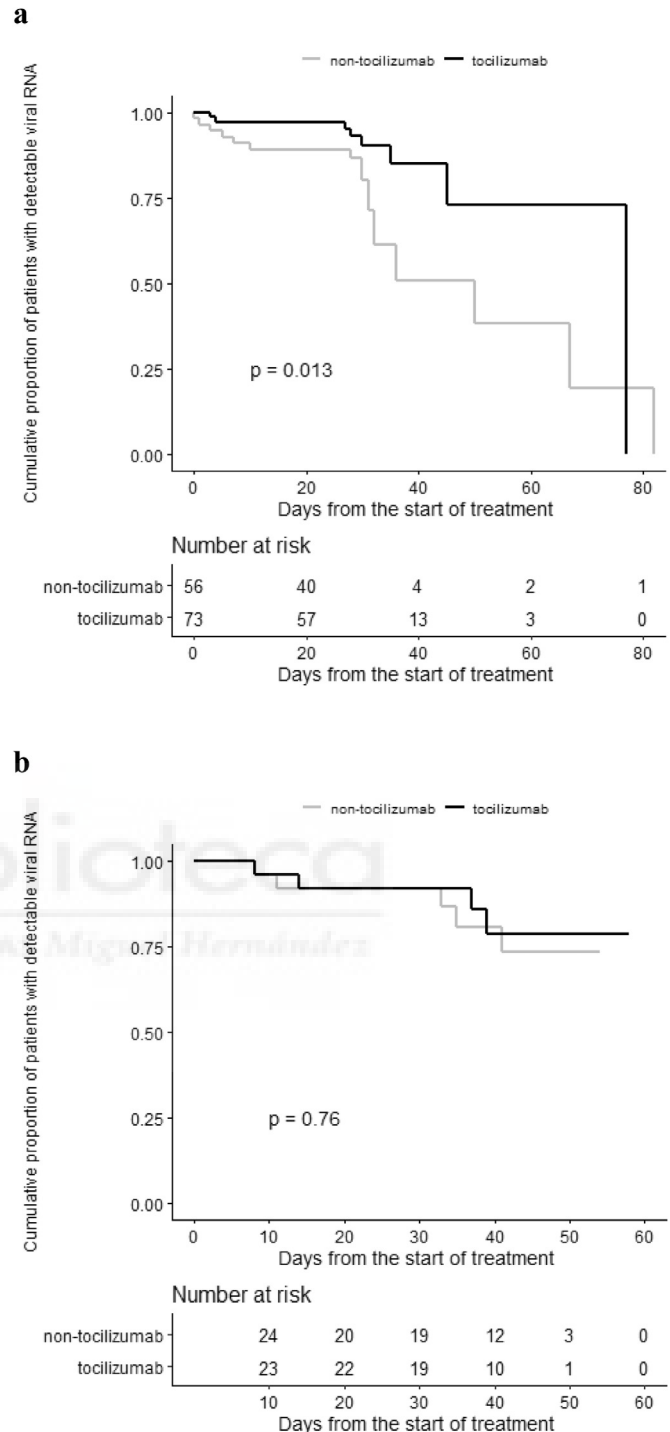


Fig. 1. Kaplan Meier curve to estimate the cumulative proportion of patients with detectable viral RNA according to therapy with tocilizumab. (a) Unadjusted. (b) Adjusted (Wald test).

S/CO ($p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) (Fig. 3a); and peak N-IgG titers were 4•5 (3•7–5•0) and 2•8 (0•1–4•7) S/CO, respectively ($p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) (Fig. 3b). When patients who had not achieved detectable antibody levels were excluded, peak S-IgG titers in the anti-IL-6 treated and untreated patients were 6•4 (5•8–7) vs 6•1 (5–6•6) S/CO ($p = 0•037$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) (Fig. 3c); and peak N-IgG titers were 4•6 (4•0–5•0) vs 4•6 (4–5•0) S/CO, respectively ($p = 0•877$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) (Fig. 3d).

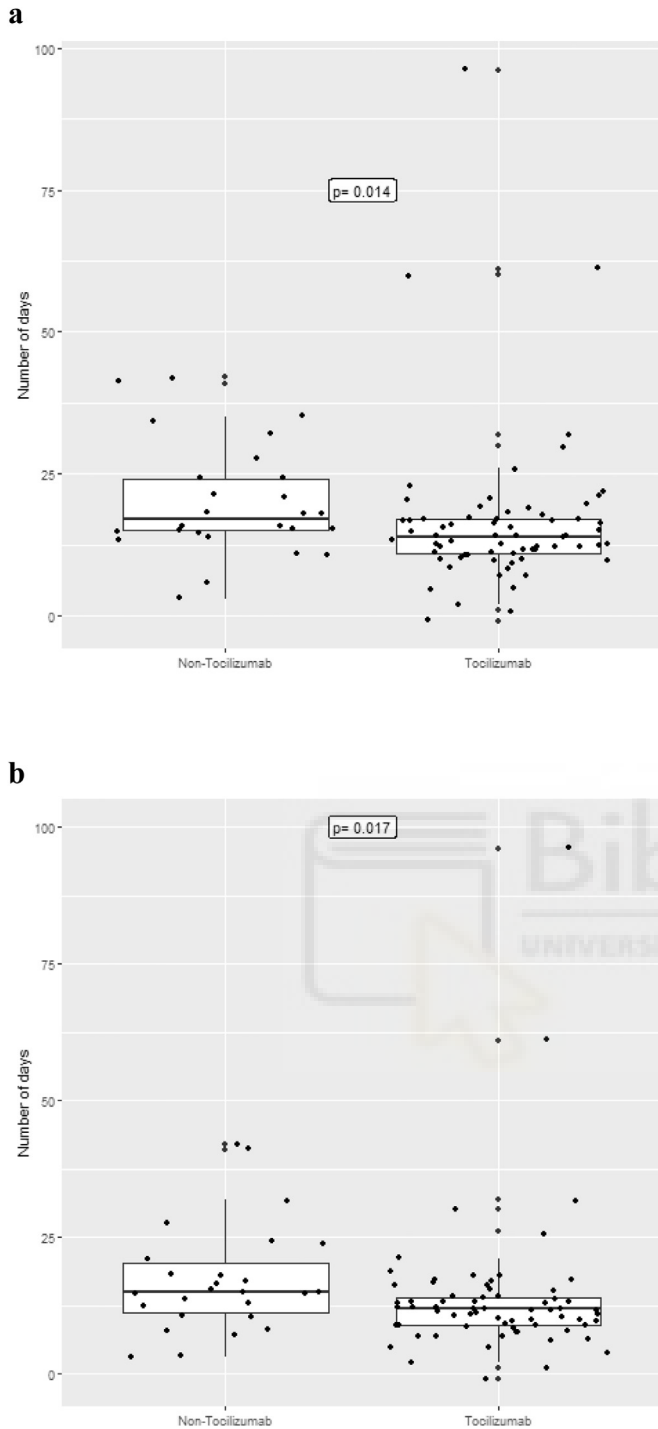


Fig. 2. Median time from the onset of symptoms to seropositivity according to therapy with tocilizumab (Mann-Whitney-Wilcoxon test). (a) S-IgG. (b) N-IgG.

Kaplan Meier curves showed a higher cumulative proportion of patients with detectable antibody levels among those under anti-cytokine therapy (HR [95% CI] 3•1 [1•9–5], $p < 0•001$ for S-IgG and HR 3 [1•9–4•9], log-rank $p < 0•001$ for N-IgG) (Figs. 4a and 4b). A propensity score matching model yielded 46 participants (23 on each group). In the adjusted final matched sample, where therapy with methylprednisolone was also included to assess its effect on antibody production, no significant association of IL-6 blockade with S-IgG or N-IgG response was found: HR (95% CI) for anti-IL-6 use was 1•66 (0•45–6•12) for S-IgG seropositivity ($p = 0•444$, log-rank test);

and 1•05 (0•30–3•70) for N-IgG ($p = 0•939$, log-rank test) (Figs. 4c and 4d). In a non-inferiority analysis, treatment with tocilizumab showed to be non-inferior to not receiving tocilizumab for S-IgG ($p = 0•007$) and for N-IgG response ($p = 0•049$) (normal approximation method using a Z test statistic for both), considering that treatment with tocilizumab was non-inferior if the HR of the adjusted model was greater than 0.33.

3.3. Biomarkers of systemic release syndrome

The levels on admission and at immunomodulatory therapy initiation of IL-6, ferritin, CRP, fibrinogen, and the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) were significantly higher in patients receiving anti-IL6 therapy, and the lymphocyte and platelet counts were lower (Table 1). After anti-cytokine drug therapy, there was an early significant decrease at week-1 in the levels of CRP (median reduction [Q1 to Q3] - 69•9 [-84•1 to -55•8], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) and fibrinogen (median reduction -128•7 [-213•1 to -44•2 mg/dl], $p = 0•003$, Mann-Whitney-Wilcoxon test), and an increase in the lymphocyte (median increase 0•21 [0•09–0•32], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test) and the platelet count (median increase 50•6 [33•6–67], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test); at week-2, a decrease in the levels of IL-6 (-74•5 [-126•5 to -22•4], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test), and NLR (-0•80 [-2•57 to 0•97], $p = 0•028$, Mann-Whitney-Wilcoxon test); and at week-4, a decrease of ferritin (-111•4 [-169•3 to -53•6], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test). No significant changes were observed for these biomarkers in patients not receiving anti-cytokine therapy, with the exception of CRP. Peak decrease was observed at week-1 for CRP and fibrinogen (see above), at week-3 for the NLR (-3•48 [-7•61- 0•66], $p = 0•005$, Mann-Whitney-Wilcoxon test), at week-4 for ferritin (-111•4 [-169•3 to -53•56], $p < 0•001$, Mann-Whitney-Wilcoxon test), and at week-5 for IL-6 (-154•7 [-282•3 to -27•09], $p = 0•013$, Mann-Whitney-Wilcoxon test).

4. Discussion

Cytokines regulate antiviral cellular and humoral responses [14]. We evaluated the virological and immunological impact of anti-cytokine therapy consisting on an IL-6 receptor blocker in patients with COVID-19. Our results suggest that IL-6 blockade does not impair the antibody response to SARS-CoV-2. Although viral shedding was longer in patients on anti-cytokine therapy, this effect was largely dependent on the initial viral load.

To the best of our knowledge, the effects of the immunomodulatory drugs used for SARS-CoV-2 infection on the viral kinetics and the viral-induced humoral immune response had not been previously assessed. Most of the clinical experience with tocilizumab comes from patients with chronic inflammatory disorders, mainly rheumatoid arthritis, where an increased risk of opportunistic and serious infections was reported in clinical trials [15]. In our cohort, patients with COVID-19 under IL-6 blockade exhibited prolonged viral shedding. Interleukin-6 plays a central role in the integrated innate and adaptive immune responses against pathogens. In experimental models, IL-6 deficiency was associated with increased susceptibility to certain viral infections, which was attributed to impaired activity of cytotoxic T-cells, and the T-helper-dependent virus neutralizing IgG response [14,16]. Clinical data about the risk of viral infections after IL-6 blockade are discordant, and although some cases of viral reactivation have been reported in patients with rheumatoid arthritis [9–11], no increase in the viral load of Epstein-Barr, cytomegalovirus, varicella zoster, or hepatitis C virus was evidenced during longitudinal follow-up [17,18]. Patients undergoing IL-6 blockade in our cohort had a higher initial viral load, along with clinical and biological data reflecting the greater disease severity of candidates to anti-

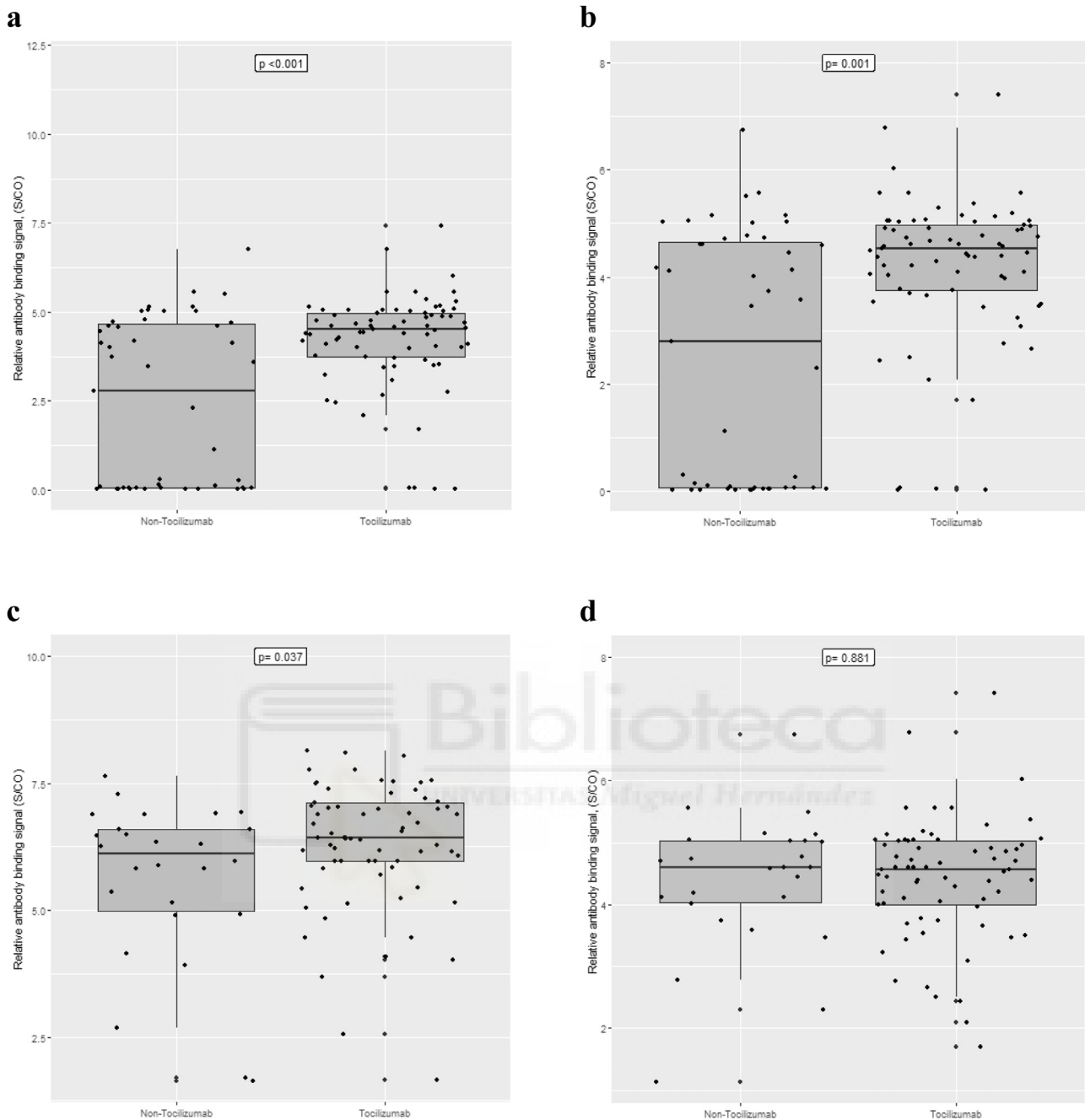


Fig. 3. IgG titers according to therapy with tocilizumab (Mann-Whitney-Wilcoxon test). (a) Peak S-IgG. (b) Peak N-IgG. (c) Peak S-IgG after excluding non seroconverters. (d) Peak N-IgG after excluding non seroconverters.

cytokine therapy. This is in agreement with the higher viral load and longer viral shedding described in severely-ill patients with COVID-19 compared with milder cases [19–22]. Adjustment for the viral load resulted in a significant attenuation of the relationship between IL-6 blockade and viral shedding, suggesting that viral load was a central factor implicated in viral persistence. The same effect was observed with adjustment for the variables related to severity status.

By contrast to duration of viral shedding, our results show that the blockage of IL-6 activity did not attenuate the antibody response to SARS-CoV-2. We found a rapid and robust humoral response in the group under IL-6 blockade, and neither the proportion of patients with positive antibody titers, the time to antibody production or the intensity of the antibody response were poorer than those observed in patients without anti-cytokine therapy. Our findings are consistent

with the conserved immunogenicity after vaccination reported in patients with rheumatoid arthritis receiving tocilizumab [23–25]. One of the reasons argued for the apparently unaltered humoral response with anti-IL-6 therapy was that it does not induce depletion of B cells, and consequently other cytokines produced by T-helper cells could also stimulate lymphocytes B to induce the antibody production [24]. Early and strong antibody responses have been reported in severely-ill patients with COVID-19 [26], and an independent correlation between disease severity and higher levels of antibodies as well [26–28]. Patients under IL-6 blockade in our cohort had higher disease severity, and a higher initial viral load and longer viral shedding, which were likely involved in their enhanced humoral immune response. Actually, although patients under IL-6 blockade showed a higher frequency of detectable antibody titers, and in a faster time

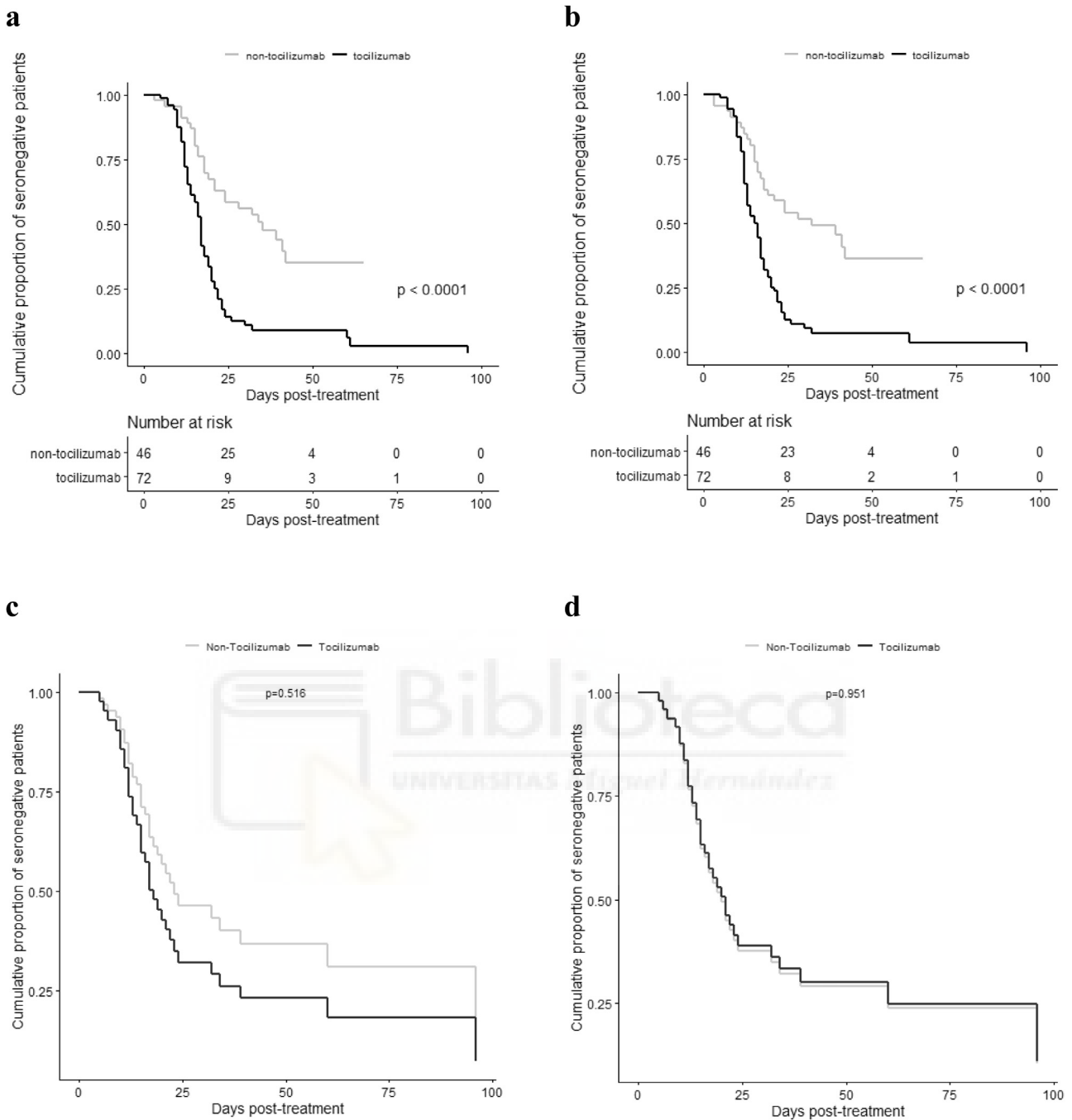


Fig. 4. Kaplan Meier curve to estimate the cumulative proportion of patients with negative titers of IgG according to therapy with tocilizumab. (a) S-IgG (unadjusted). (b) N-IgG (unadjusted). (c) S-IgG (adjusted) (log-rank test). (d) N-IgG (adjusted) (log-rank test).

than the non-anti-cytokine treatment group, no significant association between seropositivity and IL-6 blockade was found after adjustment for severity of disease and viral load levels. A high viral load might induce an immediate activation of extrafollicular B cells, leading to early and intense antibody production, although with less affinity than those induced by the antigen-specific B cells at the germinal center [28,29]. The strong and early antibody response observed in patients receiving anti-IL-6 therapy in our cohort included also high levels of the potentially neutralizing S-IgG antibodies [30], which might have contributed to their favorable outcome, despite this group contained a higher proportion of severely-ill patients.

IL-6 blockade was otherwise accompanied by the recognized positive impact on the biomarkers of cytokine release syndrome which, as

expected, showed higher initial levels in the anti-cytokine treated group. The significant drop in the levels of IL-6 was delayed compared to the rapid decline observed in the concentrations of CRP, fibrinogen, or the lymphocytes after IL-6 blockade. This anti-inflammatory effect accompanied by the overall favorable outcome of the patients would argue in favor of a positive final balance of IL-6 blockade.

Limitations of the study include that SARS-CoV-2 RNA measurements were performed in upper respiratory tract samples, which may exhibit in some cases lower sensitivity than lower tract specimens. All patients also received combinations of antiviral agents with potential effects on viral dynamics, which differed between anti-cytokine treatment groups, especially regarding lopinavir/ritonavir and steroids. Because of the observational nature of the study,

patients receiving IL-6 blockade had a higher disease severity which might have confused some of the results in the comparisons with the non-treated groups. This is a single center study and the results may not therefore be generalizable to the wider population. There was a high proportion of patients with undetectable antibody titers among the non-anti-cytokine treated group. One of the potentially contributing factors could be the differences in the viral load and Ct values between the groups, although it would warrant further investigations. Strengths consist of the availability of serial measurements of respiratory and serum samples for the novel assessment of the effects of IL-6 blockade on viral dynamics and the antibody response in a high number of patients in real-life conditions.

Our data suggest that immunomodulatory therapy based on IL-6 blockade in patients with COVID-19 does not impair the specific antibody response. Although viral clearance was delayed, this effect was mainly driven by the initial viral load. Our findings contribute to expand the scientific knowledge about the effects of anti-cytokine therapy on SARS-CoV2 kinetics and on the humoral immune response to the virus, and support the safety of this strategy for the treatment of COVID-19. Further carefully designed studies are required to confirm that tocilizumab does not affect viral replication and immune response to SARS-CoV-2.

Contributors

MM and FG conceived the study and wrote the first draft; MF, PO and VA performed the laboratory analyses; SP, JGA, GT and LG participated in data acquisition; JAG analyzed the data; all authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

Data sharing

The dataset generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Members of the COVID19-Elx group

Félix Gutiérrez, Mar Masiá, Eduardo García, Antonia Mora, Sergio Padilla, Guillermo Telenti, Lucia Guillen, Cristina Bas, María Andreo, Fernando Lidón, Vladimir Ospino, Francisco López, Oscar Torregrosa, José López, Fernando Bonilla, Clara Escolano, Marta Fernández, Vanesa Agulló, Gabriel Estañ, Maria José Soler, Justo Grau, Lucía Zamora, Carlos Baeza, Antonio Ramón, Vicente Cantó, Ricardo Mora, Rafael Julio Simón, Irene Pascual, Javier García, Alejandro de la Torre, Cristina Martínez, Leticia Alonso, Joan Sanchís, Ángela Botella, Paula Mascarell, María Selene Falcón, Jose Carlos Asenjo, Carolina Ding, Lucía Gómez, María Fernández, Marian Fernández, Lucia Madero, Roberto Morales, Luis Marhuenda, Enrique Valdeolivas and Carolina Garrido on behalf of COVID-19 wards nursing team.

Declaration of Competing Interests

Dr. Gutiérrez reports personal fees from Janssen-Cilag and from ViiV Health Care, outside the submitted work. The other authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by the [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 No. [PI16/](#)

[01740](#); [PI18/01861](#)]; [CM19/00160](#); [COV20-00005](#)]). This study would not have been possible without the collaboration of all the patients, and the medical and nursing staff who were involved in their attention (COVID19-Elx Group).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ebiom.2020.102999](#).

References

- [1] Zhou Y, Fu B, Zheng X, et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* 2020 [in press].
- [2] Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mL-6R and sLL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1731–40.
- [3] Fu B, Xu X, Wei H. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19. *J Transl Med* 2020;18:164.
- [4] Xu X, Han M, Li T, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117:10970–5.
- [5] Toniati P, Piva S, Cattalini M, et al. Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: a single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun Rev* 2020;19:102568.
- [6] Guaraldi G, Meschiari M, Cozzi-Lepri A, et al. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol* 2020 [in press].
- [7] Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology. Biochem Pharmacol* 2003;149:1–38.
- [8] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1–21.
- [9] Scherlinger M, Alain S, Richez C. Monitoring of Epstein–Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2018;85:259–60.
- [10] Van Duin D, Miranda C, Husni E. Cytomegalovirus viremia, pneumonitis, and tocilizumab therapy. *Emerg Infect Dis* 2011;17:754–6.
- [11] Kubandova Z, Mathieu S, Poutrier C, Soubrier M. Serious herpes zoster in rheumatoid arthritis under anti-interleukin-6 receptor antibody. *Joint Bone Spine* 2010;77:623–264.
- [12] Chen X, Zhao B, Qu Y, et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. *Clin Infect Dis* 2020; [in press].
- [13] Muraguchi A, Hirano T, Tang B, et al. The essential role of B cell stimulatory factor (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988;15:332–44.
- [14] Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev* 1997;159:119–35.
- [15] Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:399–409.
- [16] Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368:339–42.
- [17] Mourgues C, Henquell C, Tatar Z, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2016;83:412–5.
- [18] Nagashima T, Maruyama A, Kamata Y, Minota S. Unchanged serum viral load and liver function during tocilizumab treatment in a patient with rheumatoid arthritis and hepatitis C virus infection. *Rheumatol Int* 2012;32:2231–2.
- [19] Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020 [in press].
- [20] Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054–62.
- [21] Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020;20:656–7.
- [22] Qian GQ, Chen XQ, Lv DF, et al. Duration of SARS-CoV-2 viral shedding during COVID-19 infection. *Infect Dis (Lond)* 2020;52:511–2.
- [23] Crnkic Kapetanovic M, Saxne T, Jönsson G, Truedsson L, Geborek P. Rituximab and abatacept but not tocilizumab impair antibody response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R171.
- [24] Mori S, Ueki Y, Hirakata N, Oribe M, Hidaka T, Oishi K. Impact of tocilizumab therapy on antibody response to influenza vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:2006–10.
- [25] Bingham CO, Rizzo W, Kivitz A, Hassanali A, Upmanyu R, Kleerman M. Humoral immune response to vaccines in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: results of a randomised controlled trial (VISARA). *Ann Rheum Dis* 2015;74:818–22.

- [26] Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:833–6.
- [27] Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020 [in press].
- [28] Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845–8.
- [29] Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med* 2011;208:1377–88.
- [30] Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9804–9.



