



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

**ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DEL UMBRAL
DE CICLOS DE AMPLIFICACIÓN EN LA RT-PCR DE
SARS-COV-2 Y LA GRAVEDAD EN PACIENTES
HOSPITALIZADOS POR COVID-19**

TESIS

PARA OBTENER GRADO DE ESPECIALIDAD EN

NEUMOLOGÍA

P R E S E N T A

DRA. BELINDA MARICELA CONTRERAS GARZA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ALEJANDRA RENATA BAÉZ SALDAÑA



CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradecimientos

A mi familia, por su amor, comprensión y apoyo durante todo este camino. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes, especialmente a Nancy, cuya presencia en mi vida ha sido invaluable.

A la serie de sucesos del universo que nos llevaron a enfrentarnos a situaciones incómodas, pero en los escenarios idóneos para crecer de la forma que necesitábamos. Como bien dicen, dulces son los frutos de la adversidad.

Muchas gracias, no. Muchas carchofas! Palabra que inventó Enrique Jardiel para cuando hay que dar cosas mucho más grandes que las gracias.



Índice

Resumen.....	4
Antecedentes.....	6
Características del virus y estructura viral.....	6
Inmunopatogénesis.....	7
Ciclo viral.....	7
Período de incubación.....	7
Presentaciones clínicas.....	8
Hallazgos de laboratorio.....	8
Métodos diagnósticos.....	9
Prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)	
Obtención de la muestra.....	10
Extracción y purificación.....	11
Transcripción inversa, amplificación y cuantificación.....	11
Falsos negativos.....	12
CTs – Carga viral.....	12
Asociación entre Cts y desenlaces.....	13
Estudios que han encontrado asociación entre los desenlaces del pacientes y los Cts.....	14
Estudios que no han encontrado asociación entre los desenlaces del pacientes y los Cts.....	15
Planteamiento del problema.....	17
Justificación.....	19
Pregunta de investigación.....	20
Objetivo.....	21
Material y métodos.....	22
Diseño, sitio del estudio y período.	22
Criterios de inclusión.....	23
Criterios de exclusión.....	23
Reclutamiento y desarrollo del proyecto.....	24
Tamaño de muestra.....	25
Variables de estudio.....	26



Definición operacional de las variables de estudio.....	27
Procesamiento de muestras en el laboratorio para SARS-CoV-2 y obtención de los valores de Cts.	30
Análisis estadístico.....	34
Consideraciones éticas.....	36
Resultados.....	37
Características clínicas generales de la población.....	37
Variables hematológicas y bioquímicas de laboratorio clínico.....	38
Valores del umbral de ciclos de amplificación y presentaciones estratificadas por carga viral.....	39
Discusión.....	46
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexos.....	58
Tabla 1.- Estudios asociación Cts con ventilación mecánica.....	58
Tabla 2.- Estudios asociación Cts con Mortalidad.....	60
Tabla 3 Estudios asociación Cts con Gravedad.....	64



Resumen

Introducción: Actualmente el método estándar de oro para detectar el SARS-CoV-2 es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), que es el método con mayor sensibilidad y especificidad. El umbral del ciclo (Ct) está determinado por el número de ciclos de PCR necesarios para informar una señal superior al umbral, por lo tanto, un valor de Ct más bajo significa una mayor carga viral de ARN. Aún sigue sin ser clara la asociación de Cts con gravedad de la enfermedad como requerimiento de ventilación mecánica invasiva y mortalidad. Los datos reportados en la literatura hasta el momento son contradictorios. El presente estudio tiene como objetivo estudiar esta asociación.

Métodos: Estudio prospectivo de Mayo 2020 a Marzo 2022. Se desarrolló en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Se incluyeron 431 pacientes registrados que contaban con valor de Ct y registro de datos clínicos y desenlace. La variable del valor del umbral de ciclos (Ct) para los genes N, E y Rdr se dicotomizó en la de un valor menor a 30 (carga viral alta) y la de mayor a 30 (carga viral baja). Se midió la mediana (IIC) del valor del Ct de los genes N, E y Rdr de acuerdo al tiempo de evolución del padecimiento actual en días dividido en 3 estratos (1-7, 8-14 y >14). La comparación entre la variable Ct con valor menor a 30 (carga viral alta) y mayor a 30 (carga viral baja) de los genes N, E y Rdr y los casos con ventilación mecánica y mortalidad se realizó con estadística no paramétrica mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó un valor p a dos colas ≤ 0.05 para designar la significación estadística. La asociación entre el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 y las diferentes variables clínicas para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2, se evaluó mediante regresión logística conforme a la metodología de Hosmer-Lemeshow y la variable Ct < 30 se utilizó como variable dependiente o independiente, cuya designación fue de acuerdo con su posición en la cadena de causalidad tomando en cuenta la fisiopatología de la enfermedad.



Resultados: Se incluyeron un total de 431 pacientes. La mediana de edad fue de 56 años (IIC 46-66), y 289 (67.1%) fueron hombres. Noventa y ocho (22.7%) pacientes reportaron tabaquismo actual o pasado y el 21.6% contaba con antecedente de vacunación contra SARS-CoV-2. Las principales comorbilidades encontradas en nuestra población fueron obesidad (45.01%), hipertensión arterial sistémica (35.5%) y diabetes (34.1%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de Ct de acuerdo al tiempo de evolución del padecimiento actual para ninguno de los genes, ni relación entre los valores de umbral de ciclos de amplificación por estratificaciones de carga viral para los genes N, E y Rdr con los desenlaces de ventilación mecánica invasiva y mortalidad.

Conclusiones: En población mexicana de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2, ajustando el tiempo de evolución de los síntomas a la toma de muestra, los valores del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR de SARS-CoV-2 para los genes N, E y Rdr no se asocian a la necesidad de ventilación mecánica invasiva ni mortalidad.



Antecedentes

En diciembre de 2019 se detectó un grupo de pacientes con neumonía atípica vinculados epidemiológicamente a un mercado de Wuhan, China, desde entonces hemos estado en el campo de batalla con una nueva amenaza para la humanidad conocida como COVID-19, cuyo agente causal es el virus SARS-CoV-2.¹ El SARS-CoV-2 ha afectado a más de 200 países, lo que ha resultado en más de 500 millones de casos identificados con 6 millones de muertes confirmadas y una tasa de letalidad global de 2.2%.^{2,3}

El primer caso en nuestro país se presentó el 27 de febrero de 2020 en la Ciudad de México. A pocas horas se confirmaron dos casos más, en ese momento inició la fase 1 epidemiológica. El primer fallecimiento registrado oficialmente en México ocurrió el día 18 de marzo de 2020. Al igual que en otros países del mundo el virus se diseminó rápidamente y hasta la semana epidemiológica 20 del año 2022 se han reportado 5 759 773 casos, con más de 300, 000 defunciones, lo que nos da una tasa de letalidad estimada de 5.1%, posicionándose como uno de los problemas de salud pública más relevantes.^{2,3}

Características del virus y estructura viral.

El SARS-CoV-2, que pertenece a la familia *coronaviridae*, tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 30 000 nucleótidos de longitud. El genoma codifica 27 proteínas, incluida una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) y cuatro proteínas estructurales.⁴ El gen S (3822 nt) codifica la glucoproteína espiga (S) que se une a los receptores ACE2 y TMPRSS2 en la superficie de la célula huésped.⁵ El gen N (1260 nt) codifica una proteína de la nucleocápside (N) que participa en la síntesis y el ensamblaje viral.⁶ El gen E es bastante corto con 227 nt y codifica una proteína que está asociada con la envoltura viral (E).^{1,7}



Inmunopatogénesis

Ciclo viral

Al principio de la infección, el SARS-CoV-2 se dirige a las células, como las células epiteliales nasales y bronquiales y los neumocitos, a través de la proteína espiga (S) que se une a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2).¹ La proteasa transmembrana de serina tipo 2 (TMPRSS2), presente en la célula huésped, promueve la captación viral al escindir ACE2 y activar la proteína S del SARS-CoV-2, que media la entrada del coronavirus en las células huésped.¹

En etapas posteriores de la infección, cuando se acelera la replicación viral, se compromete la integridad de la barrera epitelial-endotelial. Además de las células epiteliales, el SARS-CoV-2 infecta las células endoteliales de los capilares pulmonares, lo que acentúa la respuesta inflamatoria y desencadena una afluencia de monocitos y neutrófilos. Los estudios de autopsia han mostrado engrosamiento difuso de la pared alveolar con células mononucleares y macrófagos que infiltran los espacios aéreos, además de endotelitis. Se desarrollan infiltrados inflamatorios mononucleares intersticiales y edema que aparecen como opacidades en vidrio esmerilado en la tomografía computarizada. A continuación se presenta edema pulmonar que llena los espacios alveolares con formación de membrana hialina, compatible con el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). En conjunto, la alteración de la barrera endotelial, la transmisión de oxígeno alveolar-capilar disfuncional, y la capacidad de difusión de oxígeno deteriorada son rasgos característicos de COVID-19.⁸

Período de incubación

El período de incubación es de aproximadamente 5 días y la carga viral máxima se produce en la fase temprana de la enfermedad, cerca del momento de aparición de los síntomas.^{9,10} Aproximadamente el 97.5% de las personas que



desarrollan síntomas lo harán dentro de 11,5 días de infección y la mediana (rango intercuartílico) del intervalo desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso hospitalario es de 7 (3-9) días.¹

Presentaciones clínicas

COVID-19 tiene diversas presentaciones clínicas. En un estudio de 44 672 pacientes con COVID-19 en China, el 81 % de los pacientes tenían manifestaciones leves, el 14 % tenían manifestaciones graves y el 5 % tenían manifestaciones críticas (definidas como insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o disfunción multiorgánica).¹

Una vez que el SARS-CoV-2 se une al receptor de la célula diana del huésped, la replicación activa y la liberación del virus en las células pulmonares provocan síntomas no específicos como fiebre, mialgias, cefalea.^{1,11}

Si bien es cierto las principales manifestaciones se presentan a nivel del sistema respiratorio, COVID-19 es una enfermedad multisistémica, la distribución de los receptores ACE2 en diferentes tejidos explica los sitios de infección y los síntomas del paciente. Por ejemplo, el receptor ACE2 se encuentra en el epitelio de otros órganos como el intestino y las células endoteliales del riñón y los vasos sanguíneos, por lo que se pueden presentar síntomas gastrointestinales y complicaciones cardiovasculares.¹¹

Hallazgos de laboratorio

Toda la inflamación sistémica que conlleva la enfermedad se traduce en alteraciones de laboratorio inespecíficas. Una revisión sistemática de 19 estudios de 2874 pacientes que eran en su mayoría de China (edad media, 52 años), de los cuales el 88% fueron hospitalizados, informó las principales anomalías de laboratorio observadas en COVID-19, incluida la proteína C reactiva sérica elevada (aumentada en >60% de los pacientes), lactato deshidrogenasa



(aumentada en aproximadamente 50%-60%), alanina aminotransferasa (elevada en aproximadamente 25%) y aspartato aminotransferasa (aproximadamente 33%). Aproximadamente el 75% de los pacientes tenían niveles bajos de albúmina. La anomalía hematológica más común es la linfopenia (recuento absoluto de linfocitos $<1.0 \times 10^9/L$), que está presente hasta en el 83% de los pacientes hospitalizados con COVID-19. Junto con la coagulopatía, son comunes la prolongación modesta de los tiempos de protrombina (prolongados en $>5\%$ de los pacientes), la trombocitopenia leve (presente en aproximadamente el 30% de los pacientes) y los valores elevados de dímero D (presentes en el 43%-60% de los pacientes). Las anomalías de laboratorio más graves se han asociado con una infección más grave. El dímero D y, en menor medida, la linfopenia parecen tener las mayores asociaciones pronósticas.¹²

Además se estos biomarcadores se han descrito otros factores de riesgo para el desarrollo presentación clínica grave y muerte, tales como, la edad avanzada (≥ 65 años), fiebre alta ($\geq 39^\circ C$) y comorbilidades (p. ej., hipertensión, diabetes).^{13,14}

En México la hipertensión, la obesidad y la diabetes son las principales comorbilidades que aumentan el riesgo de muerte por COVID-19, lo cual nos posiciona en una situación vulnerable debido a la alta prevalencia de enfermedades crónicas en la población adulta.¹⁵

Métodos diagnósticos

Actualmente se cuenta con un arsenal de métodos diagnósticos para SARS-CoV-2. La infección por COVID-19 se puede detectar indirectamente midiendo la respuesta inmunitaria del huésped a la infección por SARS-CoV-2. El diagnóstico serológico es especialmente importante para los pacientes con enfermedad leve a moderada que pueden presentarse tarde, más allá de las primeras 2 semanas del inicio de la enfermedad, y con fines de vigilancia e investigación epidemiológica.¹⁶ Los anticuerpos IgM son detectables dentro de los 5 días de la infección, con



niveles más altos durante las primeras 2 a 3 semanas de la enfermedad, mientras que una respuesta de IgG se observa por primera vez aproximadamente 14 días después del inicio de los síntomas.¹

Desde 24 de marzo de 2020, se han identificado las composiciones genómica y proteómica del SARS-CoV-2, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares.¹⁷

Prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Actualmente el método estándar de oro para detectar el SARS-CoV-2 es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), que es el método con mayor sensibilidad y especificidad y consiste en la detección de ácidos nucleicos virales en muestras respiratorias.¹⁸

Obtención de la muestra

El método tiene una alta sensibilidad y especificidad, siempre que el muestreo se haya realizado correctamente. El primer paso del análisis RT-PCR es obtener una muestra con suficiente carga viral. Este paso es crucial para evitar resultados falsos negativos. En el contexto de la COVID-19, diferentes estudios han demostrado que el muestreo más eficiente para la detección del virus son las muestras de las vías respiratorias superiores. Las muestras nasofaríngeas obtenidas mediante hisopos son las más comunes. Una vez que la muestra está en el hisopo, debe guardarse en un tubo de transporte estéril con 2–3 ml de medio de transporte viral (VTM) o solución salina estéril.¹⁸ En este paso del análisis, es importante señalar que la carga viral en la muestra depende del momento de la enfermedad y del lugar anatómico de la toma.¹¹ Un estudio de modelado estimó la sensibilidad en 33 % 4 días después de la exposición, 62 % el día del inicio de los síntomas y 80 % 3 días después del inicio de los síntomas.¹



Extracción y purificación

La primera etapa en el laboratorio de la prueba es el aislamiento y la purificación del ARN. El procedimiento clásico para la extracción y purificación de ARN consiste en una extracción orgánica para eliminar proteínas y grasas, seguida de una centrifugación para purificar el ARN.

Transcripción inversa, amplificación y cuantificación

Después de la extracción y purificación, el ARN se incorpora con una mezcla maestra que consta de: solución amortiguadora, enzima transcriptasa inversa (RT), nucleótidos (dNTP), cebadores inversos, cebadores directos, sonda y ADN polimerasa. La mezcla de reacción homogeneizada se carga en la placa de PCR y se introduce en un termociclador donde tienen lugar diferentes pasos: (1) Transcripción inversa formando híbridos de ARN/ADN. (2) Desnaturalización, rompiendo los híbridos formados mediante altas temperaturas (95 °C) e inactivando la transcripción inversa. (3) Recocido con el cebador directo y con la sonda, que se produce cuando la temperatura desciende a 60 °C, siendo esta temperatura dependiente de la longitud y composición del cebador. (4) Paso de extensión, en el que se sintetiza una nueva cadena complementaria, dependiendo la temperatura de este paso de la ADN polimerasa utilizada. Una vez finalizado el proceso, se obtiene una nueva diana de ADN de doble cadena. Para amplificar este material genético, es necesario repetir cíclicamente los pasos (2-4). En general, se necesitan entre 30 y 45 ciclos de PCR para detectar el virus. La amplificación es el factor limitante para transformar el método estándar en una prueba rápida, pero es gracias a este proceso que la RT-PCR tiene tan buena sensibilidad. El genoma del virus se detecta mediante una señal de fluorescencia. Se utiliza una sonda para este propósito. La sonda es una hebra con un fluorocromo en el extremo 5' y un extintor en el extremo 3'. Durante el paso (4), el fluorocromo emite fluorescencia por excitación después de la liberación por escisión de la polimerasa y la señal es detectada por una cámara acoplada. La intensidad de fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN viral



sintetizado después de cada ciclo.⁷ El umbral del ciclo (Ct) está determinado por el número de ciclos de PCR necesarios para informar una señal de fluorescencia detectable superior al umbral de la señal de fluorescencia. Por lo tanto, un valor de Ct más bajo significa una mayor carga viral de ARN. Según los CDC de China (Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades), los valores de Ct < 37 pueden informarse como resultados positivos, los valores de Ct > 40 se consideran clínicamente negativos y los valores de Ct entre 37 y 40 deben considerarse dudosos y la prueba debe repetirse.¹⁹

El genoma codifica 27 proteínas, la mayoría de las cuales son proteínas no estructurales (NSP), que también juegan un papel crucial durante el ciclo de replicación. Los ensayos se dirigen predominantemente a los genes Orf1ab, N, S o E en el virus. La sensibilidad y capacidad de detección del SARS-CoV-2 varía según el gen amplificado.⁷ La mayoría de los ensayos incluyen más de un gen o sitio dentro de un gen para evitar resultados negativos falsos debido a la deriva mutacional en el virus.⁴

Falsos negativos

Los factores que contribuyen a los resultados falsos negativos incluyen la idoneidad de la técnica de recolección de la muestra, el tiempo desde la exposición y la fuente de la muestra. Así mismo, los cambios producidos en la secuenciación genética del virus (aparición de nuevas cepas) y su evolución durante la infección suponen un reto para los fabricantes de pruebas moleculares. Es muy importante actualizar la base de datos compartida del genoma del virus con las nuevas secuencias genómicas identificadas para poder producir pruebas moleculares con suficiente sensibilidad de los cebadores y sondas de oligonucleótidos evitando falsos negativos.

CTs – Carga viral



Los valores de Ct no equivalen a la medición directa de la carga viral (que requiere estandarización utilizando una curva de referencia), pero proporcionan una medida sustituta útil de la carga viral.²⁰ Cuanto menor sea el valor de Ct, menos ciclos de PCR se necesitarán para producir un resultado positivo, mayor será la cantidad de ácido nucleico viral en la muestra analizada y mayor será la cantidad de ácido nucleico viral (la carga viral) en el sitio anatómico muestreado.²⁰

La carga viral en la muestra depende del momento de la enfermedad.¹⁰ El momento de la recolección de muestras clínicas es crítico y también puede afectar el valor de Ct.²¹ Si bien a veces se informa el tiempo desde el ingreso hasta la recolección de la muestra, en muchos estudios no se describe el tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la muestra, que se sabe que está fuertemente asociado con la carga viral.²² Un estudio de Hu et al. sugirió que la carga viral alcanza su punto máximo poco después del inicio de los síntomas y luego disminuye de manera constante.²³ En una población, los valores medianos de Ct de las muestras del tracto respiratorio superior fueron de aproximadamente 30 en el período presintomático, con valores que oscilaron entre 20 y 29 desde el momento del inicio de los síntomas hasta alrededor del día 15, y luego aumentaron a >30 después del día 15. Una carga viral máxima cerca del comienzo del período sintomático es consistente con la mayoría de los estudios previos en pacientes hospitalizados.^{20,24}

Al igual que las características clínicas y los marcadores de respuesta inflamatoria, los Cts, como una medida indirecta de la carga viral, son un marcador plausible de predicción de curso de la enfermedad por lo que se han realizado múltiples estudios sobre su asociación con la gravedad de la presentación clínica y desenlaces clínicamente importantes.

Asociación entre Cts y desenlaces clínicamente importantes

La asociación de Cts con diversos desenlaces ya se ha estudiado en otras enfermedades respiratorias, con resultados contradictorios. En pacientes con influenza un Ct bajo no se asoció con peores resultados.²³ Los estudios que



involucran a pacientes con el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) han demostrado que la tasa de mortalidad en pacientes con MERS aumenta con una carga viral alta.²³ Hung et al. realizó un estudio prospectivo de 154 pacientes infectados con el SARS-CoV original en 2003 y descubrió que una mayor carga viral se asoció con mayores tasas de ventilación mecánica y muerte.²⁶

En el contexto de COVID-19, en estudios descriptivos desde el inicio de la pandemia se observó que los pacientes con cuadros más graves presentaban niveles más bajos de Cts. En un estudio de 76 pacientes hospitalizados en China la carga viral media de los casos graves fue alrededor de 60 veces mayor que la de los casos leves, lo que sugiere que las cargas virales más altas podrían estar asociadas con resultados clínicos graves.²⁷

Estudios que han encontrado asociación entre los desenlaces del paciente y los Cts

Múltiples estudios han demostrado relación positiva entre la carga viral y la gravedad de la presentación clínica, incluyendo requerimiento de ventilación mecánica y mortalidad.

En el estudio de Rajyalakshmi B, cuyo objetivo primario fue estudiar la asociación entre los valores de Ct y la gravedad de la presentación clínica reportaron que un valor bajo de Ct se asocia con un mayor ingreso en la UCI, una alta mortalidad, choque y una mayor duración de la estancia en la UCI.²⁸

En el estudio de Da Young, dividieron a los pacientes en 3 grupos, pacientes asintomáticos, sintomáticos y fallecidos, encontrando un menor número de copias virales en el grupo asintomático, comparado con el grupo sintomático o no sobreviviente, sin embargo, el número de pacientes fue limitado.²⁹ Waudby-West, et al, en su estudio con más de 1300 individuos mostró que un valor de Ct inicial bajo

se asoció con un aumento riesgo de mortalidad en comparación con un valor Ct inicial alto. ³⁰

Un metanálisis de 7 estudios no mostró diferencias significativas en los valores medios de Ct entre hospitalizados y pacientes no hospitalizados, sin embargo entre los pacientes hospitalizados, aquellos con valores de Ct <25 tenían un alto riesgo de enfermedad más grave y mortalidad que los pacientes con valores de Ct >30 (odds ratio [OR], 2,31; IC del 95 %, 1,70 a 3,13; y OR, 2,95; 95 % IC, 2,19 a 3,96, respectivamente). ³¹

Estudios que no han encontrado asociación entre los desenlaces del paciente y los Cts

Por otro lado, en muchos otros estudios no han encontrado asociación de los Cts con desenlaces importantes. En el estudio de Camargo J.F no se encontraron diferencias en los valores iniciales ni en los nadir Ct entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes o la enfermedad leve/moderada versus grave/crítica, aunque su tamaño de muestra fue limitado.³² Al comparar sobrevivientes y no sobrevivientes, en una cohorte retrospectiva en la unidad de urgencias de pacientes que ingresaban a hospitalización por COVID-19, la carga viral no difirió según los subgrupos. Además, la medición de la carga viral respiratoria no predijo la gravedad de la enfermedad.³³

Aún sigue sin ser clara la asociación de Cts con gravedad de la presentación clínica, requerimiento de ventilación mecánica invasiva y mortalidad. Los datos reportados en la literatura hasta el momento son contradictorios. La heterogeneidad en los datos puede deberse, en parte, a diferentes poblaciones de estudio, fuentes de muestras y ensayos de rtPCR. En nuestra población no hay ningún estudio que describa los Cts y su asociación a estos desenlaces. A pesar de las limitaciones en la interpretación de los valores de Ct individuales pueden permitir a los médicos clasificar mejor a ciertos pacientes ingresados en el hospital



Universidad Nacional
Autónoma de México

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”



para proporcionar las intervenciones adecuadas de manera oportuna. El presente estudio tiene como objetivo estudiar esta asociación.



Planteamiento del problema

La prueba de referencia para identificar la presencia del SARS-CoV-2 es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) que ha demostrado sensibilidad y especificidad elevadas. Cuando una prueba de PCR para el SARS-CoV-2 detecta las secuencias diana del ácido nucleico específicas, un resultado positivo se asocia con un valor de umbral de ciclo (Ct), esto es, el número de ciclos de PCR necesarios para producir una señal detectable. Cuanto más bajo sea el valor Ct, menos ciclos de PCR se necesitan para producir un resultado positivo, y mayor es la cantidad de ácido nucleico viral (la carga viral) en el lugar anatómico muestreado. Si no se ve una señal positiva después de 37 a 40 ciclos, la prueba es negativa, pero las muestras que resultan positivas pueden comenzar con cantidades de virus muy diferentes para las cuales el valor Ct proporciona una medida inversa. Los valores Ct no equivalen a la medición directa de la carga viral (que requiere la estandarización mediante una curva de referencia), pero proporcionan una medida sustitutiva útil de la carga viral. En las fases iniciales de la infección por el SARS-CoV-2 hay una elevada carga viral en el tracto respiratorio superior (TRS), y las muestras de este sitio anatómico son las más adecuadas para detectar la infección temprana. La carga viral en el TRS disminuye con el tiempo.

El espectro clínico de la COVID-19 con respecto a su gravedad es variable, se sabe que el 15% puede desarrollar neumonía e insuficiencia respiratoria y, el 5% de éstos tienen probabilidad de progresar a falla orgánica múltiple y muerte. Las formas graves de COVID-19 se han asociado a una inflamación sistémica, que da lugar a niveles plasmáticos más altos de PCR, LDH, ferritina o dímero D y a niveles reducidos de albúmina. El estudio de esta asociación con la carga viral ha sido limitado y los resultados presentan controversia con respecto a la relación que hay entre la carga viral medida mediante el valor del Ct y la gravedad de la COVID-19, así mismo, muy pocos abordan su relación con biomarcadores hematológicos, bioquímicos y con el tiempo de evolución de los síntomas de los casos al momento del diagnóstico, por ello, la información definitiva sobre el



Universidad Nacional
Autónoma de México

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"



posible valor predictivo de los valores Ct en dichos escenarios aún es incompleto, por lo que hasta el momento las guías de los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) no recomiendan el uso del valor Ct en el entorno clínico.



Justificación

El informe de los resultados cualitativos de la prueba PCR para SARS-CoV-2 como positivos o negativos es suficiente para el diagnóstico de la COVID-19, sin embargo, consideramos que el informe de los valores de Ct puede ofrecer beneficio adicional a los médicos al tomar decisiones clínicas y de manejo de pacientes con COVID-19, así como, orientar las decisiones sobre control de infecciones, salud pública y salud ocupacional. Adicionalmente, el desarrollo de este estudio permitirá un mejor entendimiento de la utilidad de los valores de Cts al identificar si ello tiene implicaciones directas sobre la gravedad, desenlace de la enfermedad y su relación con biomarcadores hematológico y bioquímicos, esto último incidirá también en ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad.



Pregunta de investigación

¿Cuál es la relación entre el valor del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR de SARS-CoV-2 y ventilación mecánica, mortalidad y tiempo de evolución de los síntomas, así como en biomarcadores hematológicos y bioquímicos de pacientes hospitalizados por COVID-19?



Objetivo

Identificar la relación entre el valor del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR de SARS-CoV-2 y ventilación mecánica, mortalidad y tiempo de evolución de los síntomas, así como en biomarcadores hematológicos y bioquímicos de pacientes hospitalizados por COVID-19.



Material y métodos

Diseño, sitio del estudio y período.

Estudio prospectivo de Mayo 2020 a Marzo 2022. Se desarrolló en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, hospital de referencia de todo tipo de enfermedades respiratorias. Sin embargo, después de la diseminación de la COVID-19 en la Ciudad de México, el gobierno lo declaró hospital para la atención de pacientes con neumonía grave y críticos con COVID-19. Antes de la pandemia la capacidad del hospital incluía 150 camas de hospitalización y 20 en la unidad de cuidados intensivos. En respuesta a la pandemia el hospital se reconvirtió para incrementar la capacidad de camas de cuidados intensivos de 20 a 120 camas, convirtiéndose en un gran unidad de cuidados intensivos.



Material y métodos

Criterios de inclusión

- Hombre o mujer mayor de 18 años hospitalizado con diagnóstico confirmado de neumonía por SARS-CoV-2.
- Resultado de laboratorio de microbiología del RT-PCR positivo para SARS-CoV-2.
- Prueba PCR para SARS-CoV-2 con medición de Ct al ingreso hospitalario.
- Que haya firmado el consentimiento informado institucional.

Criterios de exclusión

- Hasta el momento no hay definidos



Material y métodos

Reclutamiento y desarrollo del proyecto

Se realizó al momento de la llegada del paciente al servicio clínico 3 de hospitalización, con el diagnóstico de neumonía grave por SARS-CoV-2 confirmado por RT-PCR positivo y con evidencia de afección del parénquima pulmonar por tomografía computada de tórax e insuficiencia respiratoria de grados variables. Los pacientes recibieron el tratamiento estándar de acuerdo con los lineamientos de la institución que incluye profilaxis para trombosis venosa profunda, corticoesteroides intravenosos (dexametasona o metilprednisolona), paracetamol, administración de antibióticos en caso de infección secundaria, oxígeno suplementario o ventilación mecánica invasiva.

Desde el inicio de la pandemia y con el fin de sistematizar de la mejor manera la atención médica de los pacientes, se registraron en un formato electrónico los datos clínicos y desenlace de los casos hospitalizados en el servicio clínico 3. Los pacientes se siguieron hasta su egreso por mejoría o defunción. A partir de esa información se tomaron las variables para el desarrollo del presente estudio de forma anónima. Para la recolección de datos se utilizó una hoja de trabajo estandarizada para el estudio.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”



Material y métodos

Tamaño de muestra

Disponemos de la información de 431 pacientes registrados que contaban con valor de Ct.



Material y métodos

VARIABLES DE ESTUDIO

Se registraron variables generales como edad, sexo, comorbilidades, antecedentes de exposición a tabaquismo y humo de leña, fecha de inicio de los síntomas, tiempo de evolución del cuadro clínico, síntomas y signos, tipo de apoyo respiratorio (ventilación mecánica invasiva versus aporte de oxígeno por alto flujo o puntas nasales) resultados de laboratorio clínico como biometría hemática, química sanguínea, pruebas de coagulación, pruebas de función renal y hepática, electrolitos séricos, así como niveles séricos de biomarcadores de inflamación como proteína C reactiva, dímero D, y ferritina, y el desenlace de cada paciente (alta por mejoría o defunción).

Material y métodos

Definición de las variables de estudio

Variable	Tipo	Definición para su estudio
Edad	Cuantitativa discreta	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.
Sexo	Cualitativa nominal	Conjunto de las peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en masculinos y femeninos.
Comorbilidades	Cualitativa nominal	Enfermedades que se presentan en la persona, además de Covid-19.
Exposición a tabaquismo	Cualitativa nominal	Exposición activa o pasiva al humo que se produce al quemarse un producto de tabaco.
Exposición a humo de leña	Cualitativa nominal	Exposición activa o pasiva al humo que se produce al quemarse leña.
Fecha de inicio de los síntomas	Cuantitativa discreta	Momento de la instauración de las manifestaciones de la enfermedad.
Tiempo de evolución del cuadro clínico	Cuantitativa discreta	Tiempo que transcurre desde el inicio de las manifestaciones de la enfermedad
Síntomas	Cualitativa nominal	Dato subjetivo de enfermedad o situación del paciente.
Signos	Cualitativa nominal	Manifestación objetiva o física de una alteración orgánica o enfermedad.
Ventilación mecánica invasiva	Cualitativa nominal	Procedimiento de respiración artificial que emplea un aparato

		para suplir o colaborar con la función respiratoria de un paciente a través de un tubo endotraqueal.
Oxigenoterapia de alto flujo	Cualitativa nominal	Tipo de soporte respiratorio que consiste en aplicar un flujo de aire/oxígeno humidificado y calentado por encima del flujo pico inspiratorio del paciente.
Puntas nasales	Cualitativa nominal	Tipo de soporte respiratorio que proporciona oxígeno a bajo flujo.
Biometría hemática	Cuantitativa continua	Prueba de laboratorio realizada en sangre para medir composición de la misma. Glóbulos rojos, bancos y plaquetas.
Química sanguínea	Cuantitativa continua	Medición de los componentes químicos disueltos en la sangre, tales como, glucosa, urea, creatinina, ácido úrico.
Pruebas de coagulación	Cuantitativa continua	Análisis sanguíneo que determina los niveles de factores de coagulación. TTP, TT, INR.
Pruebas de función hepática	Cuantitativa continua	Estudio de laboratorio que mide los niveles de determinadas enzimas y proteínas en la sangre. ALT, AST, FA, Albumina, proteínas totales, DHL, CPK.
Electrolitos séricos	Cuantitativa continua	Medición de iones con carga eléctrica que se encuentran en



		la sangre en forma de sales disueltas.
Proteína C reactiva	Cuantitativa continua	Proteína pentamérica sintetizada principalmente por los hepatocitos en respuesta a procesos infecciosos, inflamatorios.
Dímero D	Cuantitativa continua	Marcador de inflamación, producto de la degradación de la fibrina.
Ferritina	Cuantitativa continua	Marcador de inflamación, principal proteína almacenadora y transportadora de hierro.
Desenlace (mejoría o defunción)	Cualitativa nominal	Evento clínico que mide el resultado de una intervención.



Material y métodos

Procesamiento de muestras en el laboratorio para SARS-CoV-2 y obtención de los valores de Cts.

El enfoque estándar para la detección de ARN del SARS-CoV-2 a partir de muestras nasofaríngeas implica la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras en una plataforma de extracción automatizada. La manipulación y el procesamiento de las muestras se realizan en un gabinete en una instalación de nivel de bioseguridad 2 (BSL2).

Con base en los lineamientos Nacionales emitidos por el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), todas las muestras que se toman en el INER en pacientes con sospecha de COVID-19 se recolectan por medio de un hisopo faríngeo y nasofaríngeo y para su preservación se colocan en 3 ml de medio universal de transporte viral (UTM).

El proceso estándar implica la extracción del RNA. La extracción se realizó utilizando 200 μ l de cada muestra incluida para el estudio. La extracción se realizó con el kit de ARN viral ExiPrep 96 y el sistema de purificación de NA automatizado ExiPrep 96 Lite (Bioneer), sistema que utiliza perlas magnéticas y permite la extracción simultánea de múltiples muestras. El procedimiento se realizó con base a las especificaciones del fabricante.

Desde mayo 2020 a marzo 2022 se utilizaron diferentes ensayos de PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

En el primer semestre del 2020 se utilizó el protocolo de Berlín (Genes E, N, RdRp). Para el ensayo de amplificación del RNA viral, se empleó la técnica transferida por el InDRE basada en el protocolo de Berlín. Para el ensayo (Detección del Gen E) y RNasaP, las mezclas de PCR 25 μ l contuvieron 1 μ M de las sondas E_Sarbeco_F1



y E_Sarbeco_R2, 0.5 μ M y E_Sarbeco_P1 a una concentración de 400 nM conteniendo 1 μ M de enzima SUPER SCRIPT II PLATINUM. Para el ensayo discriminatorio (Detección del Gen RdRp) las mezclas de 25 contuvieron 1.5 μ M del Primer RdRP_SARSr_F2, 2 μ M Primer RdRP_SARSr_R1 y 0.5 μ M de RdRP_SARSr_P2. La RT-PCR se ejecutó en un termociclador 7500 Real-Time PCR (marca Applied Biosystems™) con las siguientes condiciones de amplificación: RT: 15min a 55°C, Desnaturalización inicial: 2min a 95° C; 45 ciclos que constan de: Desnaturalización 15 seg a 95° C, alineamiento 30seg a 55 grados. La detección de fluorescencia se llevó a cabo durante el alineamiento.

Los cebadores, sondas y plásmidos que se utilizaron fueron sintetizados por T4 Oligo. Las secuencias del cebador (5'-3 ') utilizadas para los genes objetivo de SARS-CoV-2, (Tabla 1)

Detección del Gen E	E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
	E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1
Gen RdRp Discriminatorio	RdRP_SAR Sr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
	RdRP_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
RP	MAPGD_19_RdRP_SARSr_P2	CAGGT(G)(G)AACC[BHQ1Dt]CATCA(G)(G)AGATGC Modificación: G LNA, t-BHQ1,

Otra de las técnicas utilizadas durante este período en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias fue la técnica de RT-qPCR convencional GeneFinder. Se extrajo RNA a partir de 200 μ l del medio de transporte universal de las muestras de exudado orofaríngeo/nasofaríngeo, la extracción se hizo de forma automatizada en el equipo BIONEER Exiprep 96,



empleando el kit de extracción ExipPrep 96 Viral DNA/RNA de la marca BIONEER (Ref. K-4614), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para el ensayo de amplificación de RNA viral, se empleó el kit de PCR en tiempo real GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp, marca GeneFinder (Ref. IFMR-45), el cual amplifica el RNA de los genes RdRP, N y E. Mca. GeneFinder. Para este proceso se siguieron las especificaciones del fabricante, la mezcla de reacción se realizó partiendo de 10 μ L del tubo de mezcla de reacción y 5 μ L del tubo con la mezcla de sondas, finalmente se adicionaron 5 μ L del extracto de ácidos nucleicos por cada muestra, para tener un volumen final de 20 μ L. La RT-qPCR se ejecutó en un termociclador Quant Studio 5 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 50°C/20 min, 95°C/5min, seguido de 45 ciclos de 95°C/15 seg y 58°C/60 seg.

También se utilizó el kit Xpert® Xpress SARS-CoV-2, cuyas pruebas de realizaron con base a las especificaciones del fabricante.

Todas las pruebas y procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos de los fabricantes. En la atención clínica rutinaria, los resultados se clasifican como detectados si se detecta el gen N, E o Rdr o no detectados si no se detecta ninguna de las dos dianas. Sin embargo, el instrumento también genera un valor Ct para cada diana que se correlaciona inversamente con la carga viral cuantitativa y en nuestra institución esta información no se da a conocer a los clínicos. El valor Ct representa el número de ciclos de replicación necesarios para una amplificación génica suficiente para producir una señal fluorescente que supere un umbral predefinido.

Para este estudio, revisamos los valores de Ct para las tres dianas génicas para todas las pruebas iniciales de SARS-CoV-2 que se realizaron en las muestras de hisopados oro y nasofaríngeos que se tomaron de los sujetos del estudio para la atención clínica rutinaria al momento de su llegada al servicio de urgencias.

Separamos los valores Ct para las dianas específica del SARS-CoV-2 (N, E, Rdr)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"



en dos estratos basados en los valores cuantitativos. Se asignaron como muestras de carga viral alta aquellas con Ct más bajos <30 , y las muestras de carga viral baja con valores más altos, Ct >30 .



Material y métodos

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATA 17.0 (College Station, Texas, USA). Para resumir las características clínicas y de laboratorio de la población se utilizó estadística descriptiva de acuerdo al tipo de variable. Las variables continuas, entre ellas, el valor Ct para los genes N, E y Rdr se resumieron como medianas (intervalos intercuartiles IIC) y, las variables categóricas se representaron como proporciones. Adicionalmente, la variable del valor del umbral de ciclos (Ct) para los genes N, E y Rdr se dicotomizó en la de un valor menor a 30 (carga viral alta) y la de mayor a 30 (carga viral baja). Se midió la mediana (IIC) del valor del Ct de los genes N, E y Rdr de acuerdo al tiempo de evolución del padecimiento actual en días dividido en 3 estratos (1-7, 8-14 y >14) y, para identificar las diferencias se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. La comparación entre la variable Ct con valor menor a 30 (carga viral alta) y mayor a 30 (carga viral baja) de los genes N, E y Rdr y los casos con ventilación mecánica y mortalidad se realizó con estadística no paramétrica mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó un valor p a dos colas ≤ 0.05 para designar la significación estadística.

La asociación entre el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 y las diferentes variables clínicas para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2, se evaluó mediante regresión logística conforme a la metodología de Hosmer-Lemeshow y la variable Ct < 30 se utilizó como variable dependiente o independiente, cuya designación fue de acuerdo a su posición en la cadena de causalidad tomando en cuenta la fisiopatología de la enfermedad. De esta manera el Ct < 30 se consideró como variable dependiente para analizar su asociación con la edad, sexo, tabaquismo, comorbilidad y tiempo del padecimiento actual. Así mismo, ésta se consideró como variable independiente cuando medimos su asociación con ventilación mecánica invasiva, mortalidad, variables hematológicas y biomarcadores de inflamación. Las razones de momios se expresaron a un intervalo de confianza de



Universidad Nacional
Autónoma de México

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"



95%. Se utilizó un valor p a dos colas ≤ 0.2 para designar la significación estadística.



Material y métodos

Consideraciones éticas

El protocolo se sometió a evaluación por el comité Institucional de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades. El estudio se desarrolló con base en las buenas prácticas clínicas.

Todos los pacientes o el familiar responsable fueron informados sobre el tratamiento y procedimientos médicos que recibieron y al ingreso del paciente firmaron el consentimiento institucional. Al comité se solicitó dispensa de consentimiento ya que es un estudio descriptivo anónimo y sin riesgo, ya que solo se recabó información clínica y microbiológica que es la misma que se registra en el expediente clínico.

Resultados

Características clínicas generales de la población

Se incluyeron un total de 431 pacientes. La mediana de edad fue de 56 años (IIC 46-66), y 289 (67.1%) fueron hombres. 98 (22.7%) pacientes reportaron tabaquismo actual o pasado y sólo el 21.6% contaba con antecedente de vacunación contra SARS-CoV-2. Las principales comorbilidades encontradas en nuestra población fueron obesidad (45.01%), hipertensión arterial sistémica (35.5%) y diabetes (34.1%). La mediana del tiempo desde el inicio de síntomas hasta su ingreso hospitalario y la toma de hisopado nasofaríngeo fue de 9 días (IIC 7-12). La mayoría de los pacientes requirió apoyo ventilatorio invasivo (65.4%) y 107 (24.8%) fallecieron durante la hospitalización (cuadro 1).

Cuadro 1. Características clínicas generales de la población .

Variable	Población total N= 431
Edad*	56 (46-66)
Edad mayor de 50 años	283 (65.7%)
Hombre	289 (67.1%)
Mujer	142 (33%)
Tabaquismo actual o pasado	98 (22.7%)
Vacunación contra SARS-CoV-2	93 (21.6%)
Obesidad (IMC >30)	194 (45.01%)
Diabetes	147 (34.1%)
Hipertensión arterial sistémica	153 (35.5%)
Tiempo del padecimiento actual en días*	9 (7-12)
Tiempo del padecimiento actual < 14 días	345 (80.1 %)
Ventilación mecánica	282 (65.4%)
Mortalidad	107 (24.8%)

*Mediana (intervalo intercuartil 25-75)

Variables hematológicas y bioquímicas de laboratorio clínico.

De 431 pacientes, 312 (72.4%) presentaron linfopenia y cerca del 50% (211 de 431) tenían neutrofilia. Casi el 40% de los pacientes (170 de 431 [39.4%]) de esta cohorte demostraron niveles de glucosa sérica >150 mg/dL. En cuanto a los marcadores de inflamación, la mediana de deshidrogenasa láctica medida al ingreso fue de 390 (272-539), un tercio de la población presentó niveles >500. 40% de la población (173 de 431) tenía hipoalbuminemia, definida como albúmina < 3 gr/dL. Niveles de Dímero D > 1000 se evidenciaron en 206 de 409 pacientes (50.4%), mientras que la mediana de valor de proteína C reactiva fue de 11.69, una cuarta parte de la cohorte (25.8%) presentó niveles superiores a 20 mg/dL (cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de las variables hematológicas y bioquímicas de laboratorio clínico.

Variable	Población total, n= 431
Neutrófilos totales cels/mm ³ ^a	8500 (5,600-11,900)
Neutrófilos > 8500 cels/mm ³ ^b	211 (49%)
Linfocitos totales cels/mm ³ ^a	700 (500-1100)
Linfocitos < 1000 céls/mm ³ ^b	312 (72.4%)
Glucosa mg/dL ^a	135 (104-188)
Glucosa > 150 mg/dL ^b	170 (39.4%)
Deshidrogenasa láctica ^a	390 (272-539)
Deshidrogenasa láctica > 500 ^b	129 (30.1%)
Albúmina gr/dL ^a	3.14 (2.73-3.54)
Albúmina < 3 gr/dL ^b	173 (40.1%)
Dímero D ^a	1003 (490-2220)
Dímero D > 1000 ^b (n=409)	206/409 (50.4%)
Proteína C reactiva ^a (n=399)	11.69 (6.99-20.39)
Proteína C reactiva > 20 mg/dL ^b	103/399 (25.8%)
Ferritina (n=326) ^a	874 (504-1383)
Ferritina > 1100 ^b	110/326 (33.7%)

^amediana (intervalo intercuartil 25-75) ^bn (%)

Valores del umbral de ciclos de amplificación y presentaciones estratificadas por carga viral

Un total de 431 muestras de hisopados nasofaríngeos estaban disponibles para el análisis de pacientes hospitalizados que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio. En 390 muestras se reportaron los valores de Ct para el gen N que oscilaron entre 15.01 y 44.5, con una mediana de 27.93. En cuanto al gen E, se reportó en 335 muestras de 431, en las cuales se evidenció una mediana de valores de Ct de 26.24 con intervalo mínimo de 14.7 y máximo de 42.54. En 269 muestras de reportaron los valores de Ct del gen Rdr el intervalo mínimo y máximo osciló entre 16.23 y 44.58, con una mediana de 28.66 (cuadro 3).

Para simplificar, designamos aquellas muestras con valores de Ct <30 como carga viral alta y muestras de carga viral baja con valores de Ct >30. La mayoría de nuestros pacientes presentaron carga viral alta 66.2% en el gen N (258 de 390), 69.9% en el gen E (234 de 335) y 59.1% en el gen Rdr (159 de 269) (cuadro 3).

Cuadro 3. Valores del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR para SARS-CoV-2 de los genes N, E y Rdr

	Gen N	Gen E	Gen Rdr
N	390/431	335/431	269/431
Mediana (IIC)	27.93 (24.01-32.24)	26.24 (22.77-30.99)	28.66 (25.08-33.04)
Intervalo mínimo máximo	15.01-44.5	14.7-42.54	16.23-44.58
Ct < 30 n (%)	258 (66.2%)	234 (69.9%)	159 (59.1%)
Ct >30 n (%)	132 (33.9%)	101 (30.2%)	110 (40.9%)

Se realizó un análisis de los valores de Ct de acuerdo al tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas al momento del diagnóstico y llegada a la hospital, para cada uno de los genes. En la mitad de la cohorte (52.7% [227 de 431]) se obtuvo la muestra de hisopado nasofaríngeo entre el día 8 y 14 de inicio del padecimiento actual, en 141 pacientes (32.7%) se obtuvo después de el día de inicio de síntomas y en 63 pacientes (14.6%) entre el día 1 y 7. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de Ct de acuerdo al tiempo de evolución del padecimiento actual para ninguno de los genes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valor del Ct de acuerdo al tiempo de evolución del padecimiento actual para los genes N, E y Rdr.

Tiempo de evolución del padecimiento actual	Población total n =431	Gen N n= 390	Gen E n= 335	Gen Rdr n= 269
	n (%)	Ct (mediana IIC)		
1-7 días	63 (14.6%)	27.8 (23.29 – 31.57)	26.7 (22.4-31.9)	29.9 (26.1-35)
8-14 días	227 (52.7%)	27.77 (24.28 – 31.13)	26.3 (22.9-30.7)	29.2 (25.2-33)
> 14 días	141 (32.7%)	29.22 (25.1 – 33.8)	26 (22.5-30.4)	27.8 (24.2-32.3)
		p= 0.0931	p= 0.6463	p= 0.2470

Al estudiar la relación entre los valores de umbral de ciclos de amplificación por estratificaciones de carga viral para los genes N, E y Rdr con los desenlaces de ventilación mecánica invasiva y mortalidad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. De los 390 pacientes que contaban con datos del gen N 258 presentaba carga viral alta (Ct < 30) y 170 (65.9%) requirieron ventilación mecánica invasiva, mientras que 132 tuvieron carga viral baja (Ct > 30) y 89 (67.4) requirieron apoyo ventilatorio invasivo (p 0.762). Del mismo modo, falleció un cuarto tanto del grupo con carga viral alta como baja, 24.4% y 25% respectivamente (p 0.900). Observamos un comportamiento similar en el gen E y Rdr. En el gen E se presentó necesidad de apoyo ventilatorio invasivo en el 67.1% (157 de 234) y fallecieron el 25.2% de los pacientes con carga viral alta, mientras

que en el grupo de pacientes con carga viral baja 64.4% (65 de 101) requirieron ventilación mecánica invasiva y 22.8% (23 de 101) fallecieron. De los 269 pacientes que contaban con datos del gen Rdr, 159 presentaba carga viral alta (Ct < 30) y 112 (70.4%) requirieron ventilación mecánica invasiva, mientras que 110 tuvieron carga viral baja (Ct > 30) y 72 (65.5) requirieron apoyo ventilatorio invasivo (p 0.387). En este grupo fallecieron el 26.4% (42/159) de los pacientes con carga viral alta y 24.5% (27/110) de los pacientes con carga viral baja (p 0.730) (cuadro 5).

Cuadro 5. Valores del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR de SARS-CoV-2 para los genes N, E y Rdr en los casos con ventilación mecánica y mortalidad por estatus de carga viral alta y baja.

	Carga viral alta (Ct < 30)	Carga viral alta (Ct >30)	
	Gen N, n=390		Valor de p
Ventilación mecánica invasiva	170/258 (65.9%)	89/132 (67.4%)	0.762
Defunción	63/258 (24.4%)	33/132 (25%)	0.900
	Gen E, n=335		
Ventilación mecánica invasiva	157/234 (67.1%)	65/101 (64.4%)	0.627
Defunción	59/234 (25.2%)	23/101 (22.8%)	0.633
	Gen Rdr, n=269		
Ventilación mecánica	112/159 (70.4%)	72/110 (65.5%)	0.387
Defunción	42/159 (26.4%)	27/110 (24.5%)	0.730

Asociación entre el valor del umbral de ciclos (Ct) y variables clínicas y de laboratorio.

En el análisis univariado sobre la asociación entre el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 como variable dependiente y variables clínicas seleccionadas para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2, se encontró a la edad, particularmente

mayor de 50 años (OR 1.70 [1.01-2.84], $p=0.042$) como factor de riesgo para presentar carga viral alta en el gen Rdr, no así en el resto de los genes. No se evidenció asociación estadísticamente significativa entre el sexo masculino o el tabaquismo actual o pasado con el riesgo para carga viral elevada. Llama la atención que el estatus de vacunación contra SARS-CoV-2 en nuestra cohorte incrementa el riesgo para tener una carga viral aumentada tanto en el gen N (1.40 [0.84-2.34], $p=0.196$), como en el gen E (1.83 [0.99-3.37] 0.052) y Rdr (1.60 [0.86-2.99], $p=0.136$). Respecto a las comorbilidades no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la obesidad y el tener una carga viral alta para ninguno de los genes (gen N OR 1.24 [0.81-1.89], $p=0.326$, gen E OR 1.28 [0.80-2.05], $p=0.302$ y gen Rdr OR 1.29 [0.79-2.11], $p=0.302$). Tener diabetes se asoció a un riesgo incrementado de presentar carga viral elevada en los genes N (OR 1.46 [0.93-2.28], $p=0.100$) y E (OR 1.7 [1.00-2.81], $p=0.047$), así mismo el tener antecedente de hipertensión arterial sistémica se asoció a un incrementado de presentar carga viral alta de hasta 2.4 veces (gen N OR 1.36 [0.87-2.11], $p=0.178$, gen E OR 1.65 [0.99-2.71], $p=0.051$, gen Rdr OR 2.49 [1.47-4.22], $p=0.001$). Otra de las asociaciones estudiadas fue el tiempo desde el inicio del padecimiento actual y la toma de hisopado nasofaríngeo, en la que se encontró que el tener menos de 14 días desde el inicio de los síntomas a la toma del estudio aumenta la probabilidad de tener un umbral de ciclos de amplificación menor de 30 en todos los genes de hasta 1.83 veces (gen N OR 1.54 [0.93-2.55], $p=0.097$, gen E OR 1.75 [0.98-3.10], $p=0.055$ y gen Rdr OR 1.83 [0.99-3.38], $p=0.054$) (cuadro 6).

Cuadro 6. Asociación entre el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 como variable dependiente y variables clínicas seleccionadas para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2.*

Variable	Gen N, n= 390 OR (IC 95%), valor de p	Gen E, n=335 OR (IC 95%), valor de p	Gen Rdr, n= 269 OR (IC 95%), valor de p
Edad	0.99 (0.98-1.01), $p=0.715$	1.00 (0.99-1.02), $p=0.274$	1.02 (1.00-1.04), $p=0.005$
Edad mayor de 50 años	0.95 (0.61-1.48), $p=0.820$	1.33 (0.81-2.17), $p=0.259$	1.70 (1.01-2.84), $p=0.042$

Sexo hombre	1.11 (0.71-1.75), p=0.636	0.97 (0.59-1.59), p= 0.906	1.00 (0.60-1.68), p= 0.997
Tabaquismo actual o pasado	1.4 (0.84-2.34), p=0.79	0.67 (0.39-1.16), p= 0.151	1.03 (0.57-1.87), p= 0.925
Vacunación contra SARS-CoV	1.40 (0.84-2.34), p=0.196	1.83 (0.99-3.37) 0.052	1.60 (0.86-2.99), p= 0.136
Obesidad (IMC >30)	1.24 (0.81-1.89), 0.326	1.28 (0.80-2.05), p= 0.302	1.29 (0.79-2.11), p=0.302
Diabetes	1.46 (0.93-2.28), p=0.100	1.7 (1.00-2.81), p= 0.047	1.38 (0.83-2.30), p= 0.210
Hipertensión arterial sistémica	1.36 (0.87-2.11), p=0.178	1.65 (0.99-2.71), p= 0.051	2.49 (1.47-4.22), p= 0.001
Tiempo del padecimiento actual < 14 días	1.54 (0.93-2.55), p=0.097	1.75 (0.98-3.10), p= 0.055	1.83 (0.99-3.38), p=0.054

*Regresión logística

En el análisis sobre la asociación entre los desenlaces de requerimiento de apoyo ventilatorio invasivo y mortalidad y el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 como variable independiente para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2, en nuestra cohorte no se encontró asociación estadísticamente significativa para mortalidad (gen N OR 0.97 [0.60-1.58], p=0.900, gen E OR 1.14 [0.66-1.98], p=0.634 y gen Rdr OR 1.10 [0.63-1.93], p= 0.730), ni para ventilación mecánica invasiva (gen N OR 0.93 [0.58-1.46], p= 0.762, gen E OR 1.13 [0.69-1.84], p=0.627 y gen Rdr OR 1.26 [0.75-2.12], p=0.388) (cuadro 7).

Al analizar la asociación entre marcadores de inflamación y el valor del umbral de ciclos (Ct) menor de 30 para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2, se encontró que los pacientes con carga viral elevada en los genes N (OR 1.89 [1.19- 2.98], p=0.007) y E (OR 1.8 [1.11-3.07], p= 0.018) presentan un mayor riesgo de tener linfopenia en los laboratorios de ingreso, estadísticamente significativo. Del mismo modo los pacientes con carga viral alta en el gen N presentaron menor riesgo de tener niveles de deshidrogenasa láctica > 500 (OR 0.59 [0.38-0.93], p=0.024); los pacientes con carga viral elevada en el gen E presentaron menor riesgo de tener

niveles de proteína C reactiva mayor a 20 mg/dL (OR 0.60 [0.35-1.04], $p=0.071$) y los pacientes con valores de Ct menor de 30 en el gen Rdr presentaron menor riesgo de tener niveles elevados de ferritina (OR 0.63 [0.34-1.13], $p= 0.121$) (cuadro 7).

Por otro lado no se encontró incremento del riesgo para presentar neutrofilia en los pacientes con carga viral elevada en ninguno de los genes (gen N OR 0.95 [0.63-1.45], $p=0.828$, gen E OR 1.04 [0.65-1.66], $p=0.859$ y gen Rdr OR 1.20 [0.74-1.95], $p=0.466$). Así mismo el tener carga viral alta no se asoció a mayor riesgo de presentar niveles de glucosa > 150 mg/dL en los laboratorios de ingreso (gen N OR 1.14 [0.74-1.76], $p=0.540$, gen E OR 1.35 [0.83-2.18], $p= 0.226$ y gen Rdr OR 1.15 [0.70-1.88], $p=0.579$), ni hipoalbuminemia (gen N OR 0.81 [0.53-1.24], $p= 0.330$, gen E OR 0.90 [0.56-1.46], $p=0.675$ y gen Rdr OR 0.97 [0.58-1.63], $p=0.921$) o valores de Dímero D elevados (gen N OR 0.80 [0.52-1.24], $p=0.324$, gen E OR 0.88 [0.55-1.42], $p=0.600$ y gen Rdr OR 0.80 [0.48-1.32], $p= 0.376$) (cuadro 7).

Cuadro 7. Asociación entre marcadores de inflamación y Ct menor de 30 como variable independiente para los genes N, E y Rdr del SARS-CoV-2.

Variable	Gen N, n = 390	Gen E, n=335	Gen Rdr, n = 269
	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Neutrófilos > 8500 cels/mm ³	0.95 (0.63-1.45), $p=0.828$	1.04 (0.65- 1.66), $p=0.859$	1.20 (0.74-1.95), $p=0.466$
Linfocitos < 1000 céls/mm ³	1.89 (1.19- 2.98), $p=0.007$	1.8 (1.11-3.07), $p= 0.018$	1.26 (0.73—2.18), $p=0.404$
Glucosa > 150 mg/dL	1.14 (0.74-1.76), $p=0.540$	1.35 (0.83- 2.18), $p= 0.226$	1.15 (0.70-1.88), $p=0.579$
Deshidrogenasa láctica > 500	0.59 (0.38-0.93), $p=0.024$	0.7 (0.48-1.30), $p=0.352$	0.93 (0.55—1.56), $p=0.773$



Albúmina < 3 gr/dL	0.81 (0.53-1.24), p= 0.330	0.90 (0.56- 1.46), p=0.675	0.97 (0.58-1.63), p=0.921
Dímero D > 1000	0.80 (0.52-1.24), p=0.324	0.88 (0.55- 1.42), p=0.600	0.80 (0.48-1.32), p= 0.376
Proteína C reactiva > 20 mg/dL	0.76 (0.47-1.24), p=0.274	0.60 (0.35- 1.04), p=0.071	0.85 (0.48-1.49), p= 0.569
Ferritina >1100	0.78 (0.47-1.28), p=0.322	0.97 (0.54- 1.75), p=0.925	0.63 (0.34-1.13), p= 0.121
Ventilación mecánica	0.93 (0.58-1.46), p= 0.762	1.13 (0.69- 1.84), p=0.627	1.26 (0.75-2.12), p=0.388
Defunción	0.97 (0.60-1.58), p=0.900	1.14 (0.66- 1.98), p=0.634	1.10 (0.63-1.93), p= 0.730



Discusión

A nuestro conocimiento este es el primer estudio en nuestra población sobre la asociación de los valores de umbral de ciclos de amplificación de PCR para SARS-CoV-2 con los desenlaces de ventilación mecánica y mortalidad de pacientes hospitalizados por COVID-19. Al estudiar la relación entre los valores de Cts por estratificaciones de carga viral para los genes N, E y Rdr con los desenlaces de ventilación mecánica invasiva y mortalidad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En la literatura previa los resultados de estudios publicados sobre estas asociaciones son contradictorios, dado que en algunos estudios se ha encontrado que la carga viral alta se asocia a un incremento del riesgo de tener presentaciones clínicas graves, requerimiento de ventilación mecánica e incluso aumento de la mortalidad ^{22,28,29,30,31,34} Mientras que en algunos otros no se ha logrado establecer asociación entre la carga viral de SARS-CoV-2 con estos desenlaces. ^{32,33,35,36,37}

Probablemente no encontramos un incremento del riesgo de estos desenlaces desfavorables debido a las características peculiares de nuestra cohorte. Al ser un hospital de tercer nivel de referencia para pacientes con patología respiratoria compleja, al convertirnos por completo en centro de referencia para COVID-19, no fue la excepción y la mayor parte de nuestros pacientes hospitalizados tuvieron una presentación clínica grave. Esto difiere del grueso de estudios publicados anteriormente en los se incluyeron pacientes con todo tipo de presentaciones clínicas, desde asintomáticos detectados en programas de cribado hasta pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda secundario a SARS-CoV-2, cabe resaltar que en la mayoría de los estudios sólo una minoría de los pacientes presentó un cuadro clínico grave con requerimiento de hospitalización; En uno de los estudios que sí encontraron asociación entre la carga viral y el requerimiento de ventilación mecánica invasiva y mortalidad, de 201 pacientes incluidos sólo 11 presentaron una enfermedad crítica, lo que corresponde al



5.47%.²² Ruper Waudby, et al. Reportaron una población de estudio grande, sin embargo la mayoría de los pacientes presentó un cuadro leve, solo el 15% requirieron hospitalización.³⁰ Esta baja representación de pacientes hospitalizados o graves también esta presente en los estudios que no encontraron asociación entre la carga viral y los desenlaces, por ejemplo Saglik et, al reportaron en su población de estudio sólo 10% de pacientes graves.^{35,36}

Otra de las fortalezas más importantes de nuestro estudio es que se tomaron en cuenta para el análisis los días transcurridos desde el inicio de las manifestaciones clínicas hasta la toma de la muestra de hisopado nasofaríngeo. Actualmente sabemos que hay varias consideraciones a tomar en cuenta al momento de interpretar los valores de umbral de ciclos de amplificación de una reacción en cadena de polimerasa (PCR-RT), siendo uno de los principales el sitio anatómico y el momento de la enfermedad en que se recolecta la muestra.¹⁰ Una carga viral máxima cerca del comienzo del período sintomático y que va disminuyendo de manera constante en los días siguientes es consistente en la mayoría de los estudios.^{20,24} Gran parte de los estudios que se han publicado sobre el tema hasta la fecha no toman en cuenta en su análisis este dato, lo que conlleva a una limitante importante en sus resultados debido a la heterogeneidad de días de evolución con los que se presentan los pacientes a valoración médica y por ende su inclusión al estudio ciegos de este aspecto tan importante. Por otro lado, hay estudios previos que si han tomado en cuenta este factor al momento de incluir a los pacientes y analizar los datos, sin embargo presentan otras limitantes como tamaño de muestra pequeña, y muy baja representación de pacientes hospitalizados.^{29,22,35,36}

De igual forma esta es una de las principales debilidades del meta análisis de Vishal P Shah³¹, este incluyó sólo 7 estudios, uno de ellos con muestra de estudio grande que influyó en gran medida los resultados, además la heterogeneidad de los estudios fue significativa. Otra limitante de este metaanálisis es que incluyeron todo tipo de estudios hasta reportes de caso, solamente incluyeron literatura en inglés y no se tomó en cuenta la literatura gris. Además algunos estudios fueron



excluidos del metaanálisis y sólo se hizo revisión sistemática de los mismos. Dado que la mayoría de los estudio incluidos no valoraron el tiempo de inicio de síntomas a la toma de la muestra, no se pudo hacer un análisis ajustado a este dato. Con todo esto, ellos mismos reconocen que la certeza de sus resultados es muy baja debido al riesgo de sesgo y la heterogeneidad.³¹

Otra diferencia a destacar que pudo haber influido de manera importante en nuestros resultados, es que muchos de estos estudios se publicaron al inicio de la pandemia, punto en el que había poca seroconversión, aún no existían vacunas o apenas se estaban empezando a aplicar, aunque también había más apego a las medidas de protección y asilamiento. Nuestra población incluye pacientes desde el inicio de la pandemia hasta inicios del 2022, a través de lo cual, el curso de la pandemia cambió de manera significativa en varias ocasiones influenciada por la introducción de las vacunas, diversos medicamentos y variantes del virus.

Incluso con todo esto nuestra población es similar a los estudios de cohorte publicados anteriormente en que la mayoría de nuestros pacientes se encontraba entre la quinta y séptima década de la vida, predominando el sexo masculino y sinedo las comorbilidades más prevalentes hipertensión arterial sistémica, obesidad y diabetes tipo 2.¹⁴ Sin embargo una diferencia importante con cohortes previas es que pese a que la mayoría de nuestros pacientes presentó un cuadro grave con requerimiento de ventilación mecánica invasiva la mortalidad global fue baja (24.8%), lo cual probablemente en parte se explica también por la inclusión de pacientes de todas las etapas de la pandemia.

Llama la atención que encontramos un bajo porcentaje de antecedente de vacunación en nuestra población, cerca del 20%, lo que curiosamente se asoció a un mayor riesgo de presentar carga viral alta. Probablemente esto se deba a la percepción de seguridad o protección que adquieren las personas al vacunarse con la consiguiente relajación en las medidas de aislamiento y protección, sin embargo no encontramos ningún estudio previo que describiera este fenómeno.



Lo que si esta bien descrito es que, si bien es cierto, las vacunas han demostrado de manera concluyente su beneficio en la reducción de la enfermedad sintomática y grave, lo que se traduce en una reducción de las hospitalizaciones y los ingresos en la unidad de cuidados intensivos, estas no tienen impacto en la carga viral inicial, la cual se ha demostrado es similar en los casos vacunados y no vacunados, y ambos pueden transmitir la infección de manera eficiente. La diferencia principal entre los casos vacunados y no vacunados, es la dinámica de aclaramiento viral, ya que en los diferentes estudios es consistente que los individuos vacunados presentan una eliminación viral más eficiente y rápida. Con esta evidencia sustentamos la recomendación de que el estado de vacunación no debe reemplazar las prácticas de mitigación como el uso de cubrebocas, el distanciamiento físico y las investigaciones de rastreo de contactos, incluso dentro de poblaciones altamente vacunadas. ^{38,39,40}

Las limitantes principales de este estudio es que incluye pacientes de diferentes olas, por lo que se incluyen casos con diferentes variantes virales, así como pacientes pre y post introducción de la vacuna, así mismo durante la pandemia se utilizaron diferentes medicamentos que fueron cambiando a medida que nuestro conocimiento sobre la enfermedad avanzaba, pasando por hidroxiquina, azitromicina, remdesivir, tocilizumab, entre otros y no se realizó un ajuste por estos tratamiento recibidos, aunque cabe aclarar que fueron muy pocos pacientes (<5%) que los recibieron. Otro aspecto importante es que si bien no es el determinante principal de los Cts, el ensayo comercial de PCR utilizado es uno de los aspectos que puede llegar a influir y a lo largo del tiempo de inclusión de los pacientes a la cohorte se utilizaron diferentes ensayos de PCR, aunque todos validados y estandarizados, sin embargo por esta cuestión no contamos con los datos de todos valores de umbral de ciclo de amplificación de PCR de todos los genes en todos los pacientes.



Esta investigación es un parteaguas en el estudio de los Cts y su asociación con los desenlaces clínicos de los pacientes. Como perspectivas futuras, consideramos que valdría la pena ahondar más en su estudio, caracterizado su comportamiento en los diferentes escenarios epidemiológicos y de variantes virales en las diversas olas, así mismo evaluar su comportamiento en pacientes vacunados y no vacunados en nuestra población, para de esta forma tener más claridad respecto a su papel en las decisiones clínicas en cada una de estas circunstancias.



Conclusiones

En población mexicana de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2, ajustando el tiempo de evolución de los síntomas a la toma de muestra, los valores del umbral de ciclos de amplificación en la RT-PCR de SARS-CoV-2 para los genes N, E y Rdr no se asocian a la necesidad de ventilación mecánica invasiva ni mortalidad.



Bibliografía

- 1.-Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*, 324(8), 782-793.
- 2.- *Covid-19 situation update worldwide*. European Centre for Disease Prevention and Control. (2022, June 23). Retrieved July 01, 2022, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>
- 3.- *Informe técnico Diario COVID-19 México 06/07/2021 - gob.mx*. (n.d.). Retrieved July 17, 2022, from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/650516/Comunicado_Tecnico_Diario_COVID-19_2021.07.06.pdf
- 4.- Bland, J., Kavanaugh, A., Hong, L. K., & Kadkol, S. S. (2021). Development and validation of viral load assays to quantitate SARS-CoV-2. *Journal of Virological Methods*, 291, 114100.
- 5.- Ziegler, C. G., Miao, V. N., Owings, A. H., Navia, A. W., Tang, Y., Bromley, J. D., ... & Ordovas-Montanes, J. (2021). Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell*, 184(18), 4713-4733.
- 6.- Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., ... & Reggiori, F. (2020). Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *Journal of virology*, 94(4), e01925-19.
- 7.- Martín, J., Tena, N., & Asuero, A. G. (2021). Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. *Microchemical Journal*, 167, 106305.



8.- Ahn, D. G., Shin, H. J., Kim, M. H., Lee, S., Kim, H. S., Myoung, J., ... & Kim, S. J. (2020). Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19).

9.- S. A. Lauer et al., The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann. Intern. Med.* 172, 577–582 (2020).

10.-X. He et al., Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 26, 672–675 (2020).

11.- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *bmj*, 371.

12.-M. Cevik et al., 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* 2, e13–e22 (2021).

13.- Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., ... y Song, Y. (2020). Factores de riesgo asociados con el síndrome de dificultad respiratoria aguda y la muerte en pacientes con neumonía por enfermedad por coronavirus 2019 en Wuhan, China. *Medicina interna JAMA*, 180(7), 934-943.

14.- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B: 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.

15.- Fernández-Rojas, M. A., Esparza, M. A. L. R., Campos-Romero, A., Calva-Espinosa, D. Y., Moreno-Camacho, J. L., Langle-Martínez, A. P., ... & Alcántar-Fernández, J. (2021). Epidemiology of COVID-19 in Mexico: Symptomatic profiles



and presymptomatic people. *International Journal of Infectious Diseases*, 104, 572-579.

16.- Sethuraman, N., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *Jama*, 323(22), 2249-2251.

17.- Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y., ... & Chan, W. C. (2020). Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS nano*, 14(4), 3822-3835.

18.- Qasem, A., Shaw, A. M., Elkamel, E., & Naser, S. A. (2021). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Diagnostic Tools: A Focus on Detection Technologies and Limitations. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 728-748.

19.- Viral Disease Control Institute. China CDC 2020. http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html (accessed July 01, 2022).

20.- Fox-Lewis, A., Fox-Lewis, S., Beaumont, J., Drinković, D., Harrower, J., Howe, K., ... & McAuliffe, G. (2021). SARS-CoV-2 viral load dynamics and real-time RT-PCR cycle threshold interpretation in symptomatic non-hospitalised individuals in New Zealand: a multicentre cross sectional observational study. *Pathology*, 53(4), 530-535.

21.- Tom, M. R., & Mina, M. J. (2020). To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. *Clinical Infectious Diseases*.

22.- Boan, P., Jardine, A., & Pryce, T. M. (2022). Clinical associations of SARS-CoV-2 viral load using the first WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA. *Pathology*, 54(3), 344-350.



- 23.- Xu, K., Chen, Y., Yuan, J., Yi, P., Ding, C., Wu, W., ... & Li, L. (2020). Factors associated with prolonged viral RNA shedding in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical infectious diseases*, 71(15), 799-806.
- 24.- Kim, M. C., Cui, C., Shin, K. R., Bae, J. Y., Kweon, O. J., Lee, M. K., ... & Chung, J. W. (2021). Duration of culturable SARS-CoV-2 in hospitalized patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(7), 671-673.
- 25.- Min, C. K., Cheon, S., Ha, N. Y., Sohn, K. M., Kim, Y., Aigerim, A., ... & Kim, Y. S. (2016). Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- 26.- Hung IF, Cheng VC, Wu AK, et al. Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1550–7.
- 27.- Liu, Y., Yan, L. M., Wan, L., Xiang, T. X., Le, A., Liu, J. M., ... & Zhang, W. (2020). Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet infectious diseases*, 20(6), 656-657.
- 28.- Rajyalakshmi, B., Samavedam, S., Reddy, P. R., & Aluru, N. (2021). Prognostic value of “Cycle Threshold” in confirmed COVID-19 patients. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 25(3), 322.
- 29.- Kim, D. Y., Bae, E. K., Seo, J. W., Yun, N. R., Kim, C. M., & Kim, D. M. (2021). Viral Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e00793-21.



30.- Waudby-West, R., Parcell, B. J., Palmer, C. N., Bell, S., Chalmers, J. D., & Siddiqui, M. K. (2021). The association between SARS-CoV-2 RT-PCR cycle threshold and mortality in a community cohort. *European Respiratory Journal*, 58(1).

31.- Shah, V. P., Farah, W. H., Hill, J. C., Hassett, L. C., Binnicker, M. J., Yao, J. D., & Murad, M. H. (2021, September). Association between SARS-CoV-2 cycle threshold values and clinical outcomes in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 8, No. 9, p. ofab453). US: Oxford University Press.

32.- Camargo, J. F., Lin, R. Y., & Komanduri, K. V. (2021). Lack of correlation between the SARS-CoV-2 cycle threshold (Ct) value and clinical outcomes in patients with COVID-19. *Journal of medical virology*, 93(10), 6059-6062.

33.- Le Borgne, P., Solis, M., Severac, F., Merdji, H., Ruch, Y., Alamé Intern, K., ... & CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis). (2021). SARS-CoV-2 viral load in nasopharyngeal swabs in the emergency department does not predict COVID-19 severity and mortality. *Academic Emergency Medicine*, 28(3), 306-313.

34.- Magleby, R., Westblade, L. F., Trzebucki, A., Simon, M. S., Rajan, M., Park, J., ... & Satlin, M. J. (2020). Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*

35.- Argyropoulos, K. V., Serrano, A., Hu, J., Black, M., Feng, X., Shen, G., ... & Jour, G. (2020). Association of initial viral load in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) patients with outcome and symptoms. *The American journal of pathology*, 190(9), 1881-1887.



36.- Saglik, I., Ener, B., Akalin, H., Ozdemir, B., Ocakoglu, G., Yalcin, B., ... & Karadag, M. (2022). Association of SARS-CoV-2 cycle threshold (Ct) values with clinical course and serum biomarkers in COVID-19 patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16(03), 445-452.

37.- Carrasquer, A., Peiró, Ó. M., Sanchez-Gimenez, R., Lal-Trehan, N., del-Moral-Ronda, V., Bonet, G., ... & Bardají, A. (2021). Lack of association of initial viral load in SARS-CoV-2 patients with in-hospital mortality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 104(2), 540.

38.- Thompson, M. G., Stenehjem, E., Grannis, S., Ball, S. W., Naleway, A. L., Ong, T. C., ... & Klein, N. P. (2021). Effectiveness of Covid-19 vaccines in ambulatory and inpatient care settings. *New England Journal of Medicine*, 385(15), 1355-1371.

39.- Singanayagam, A., Hakki, S., Dunning, J., Madon, K. J., Crone, M. A., Koycheva, A., ... & Lackenby, A. (2022). Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B. 1.617. 2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(2), 183-195.

40.- Kissler, S. M., Fauver, J. R., Mack, C., Tai, C. G., Breban, M. I., Watkins, A. E., ... & Grad, Y. H. (2021). Viral dynamics of SARS-CoV-2 variants in vaccinated and unvaccinated persons. *New England Journal of Medicine*, 385(26), 2489-2491

Anexos

Tabla 1.- Estudios asociación Cts con ventilación mecánica.

Tabla 1 Estudios asociación Cts con ventilación mecánica									
Año	Revista	Autor	Diseño	N	Objetivo	Resultados	Tiempo desde síntomas	Cts promedio	Comentarios
Estudios con asociación positiva									
2022	Virology	Peter Boan	Cohorte Retrospectiva	320 muestras de 201 casos	Asociaciones clínicas de carga viral de SARS-CoV-2 utilizando el primer estándar internacional de la OMS para el ARN del SARS-CoV-2.	Mayor carga viral al inicio de los síntomas en los que fallecieron y en los que requirieron ventilación invasiva.	Sí	Al inicio de los síntomas la carga viral media fue de 4,34 log ¹⁰ UI/ml. Ensayo cobas SARS-CoV-2 ORF 28,9 ciclos.	Limitante: Muestras se tomaron más tarde desde el inicio de los síntomas en aquellos que requirieron ventilación invasiva en comparación con los que no requirieron.
2020	IDSA	Reed Magleby	Cohorte Retrospectiva	678 pacientes	Análisis de cargas virales de SARS-CoV-2 al ingreso, presentaciones clínicas y desenlaces en 2 hospitales afiliados de la ciudad de Nueva York mediante un ensayo de RT-PCR.	La carga viral alta se asoció de forma independiente con la mortalidad y la intubación.	Sí	Los valores de Ct para el locus ORF1 oscilaron entre 14,3 y 36,4. El valor medio de Ct fue de 27,9.	
Estudios sin asociación									
2021	The American	Anna Carrasquer	Observacional, retrospectivo	169 pacientes	Asociación de carga viral inicial con	No hubo diferencias en la	No	No especificados	



	Society of Tropical Medicine and Hygiene				mortalidad hospitalaria en pacientes con SARS- CoV-2.	necesidad de ingreso hospitalario, ingreso en la unidad de cuidados intensivos, ni la necesidad de ventilación mecánica. En análisis ajustado, no asociación con mortalidad.			
--	--	--	--	--	---	--	--	--	--

Tabla 2.- Estudios asociación Cts con mortalidad.

Tabla 2 Estudios asociación Cts con Mortalidad									
Año	Revista	Autor	Diseño	N	Objetivo	Resultados	Tiempo desde síntomas	Cts promedio	Comentarios
Estudios con asociación positiva									
2021	Microbiology spectrum	Da Young Kima	Cohorte retrospectiva	100 pacientes	Determinar la relación entre la cinética viral y la gravedad de la enfermedad en la infección por SARS-COV-2.	Cts iniciales significativamente menores en el grupo de no sobrevivientes.	Sí	No especificados	Analizó las diferencias entre pacientes asintomáticos, sintomáticos y no sobrevivientes.
2021	ERJ	Rupert Waudby-West	Cohorte Comunitaria	1337 participantes	Asociación entre el umbral del ciclo SARS-CoV-2 y la mortalidad en una cohorte comunitaria.	Un valor de Ct inicial bajo se asoció con un mayor riesgo de mortalidad en comparación con un valor de Ct inicial alto.	No	28.7	Los valores de Ct se estratificaron en alto (> 30), moderado (20-30) y bajo (y se construyó un modelo ajustando los factores clínicos.
2021	Indian Journal of Critical Care Medicine	Rajyalakshmi B	Estudio observacional retrospectivo unicéntrico.	192 pacientes	Estudiar la correlación entre el umbral del ciclo (CT) de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en pacientes confirmados con COVID-19 y la gravedad de la enfermedad.	El valor bajo de CT se asocia con un mayor ingreso en la UCI, una alta mortalidad, shock y una mayor duración de la estancia en la UCI. Los Cts no puede predecir el	No	Los Cts de los no supervivientes fue de 23,43. Los cts de los supervivientes fue de 25,93.	



					El objetivo primario fue la mortalidad a los 28 días.	requerimiento de ventilación invasiva			
2022	Virology	Peter Boan	Cohorte Retrospectiva	320 muestras de 201 casos	Asociaciones clínicas de carga viral de SARS-CoV-2 utilizando el primer estándar internacional de la OMS para el ARN del SARS-CoV-2.	Mayor carga viral al inicio de los síntomas en los que fallecieron y en los que requirieron ventilación invasiva.	Sí	Al inicio de los síntomas la carga viral media fue de 4,34 log ¹⁰ UI/ml. Ensayo cobas SARS-CoV-2 ORF 28,9 ciclos.	Limitante: Muestras se tomaron más tarde desde el inicio de los síntomas en aquellos que requirieron ventilación invasiva en comparación con los que no requirieron.
2020	IDSA	Reed Magleby	Cohorte Retrospectiva	678 pacientes	Análisis de cargas virales de SARS-CoV-2 al ingreso, presentaciones clínicas y desenlaces en 2 hospitales afiliados de la ciudad de Nueva York mediante un ensayo de RT-PCR.	La carga viral alta se asoció de forma independiente con la mortalidad y la intubación.	Sí	Los valores de Ct para el locus ORF1 oscilaron entre 14,3 y 36,4. El valor medio de Ct fue de 27,9.	
2021	Open Forum Infectious Diseases	Vishal P Shah	Revisión sistemática y meta-análisis	18 estudios	Asociación entre los valores de CT y la hospitalización, la gravedad de la enfermedad y la mortalidad en pacientes ≥18 años con SARS-CoV-2.	Los pacientes hospitalizados con valores de Cts bajos presentan una enfermedad más grave en comparación con los pacientes con			Revisión sistemática y meta-análisis



						valores de CT >30. Los pacientes hospitalizados con valores de CT de 25-30 en comparación con >30 también tenían un mayor riesgo de mortalidad.			
Estudios sin asociación									
2021	Journal of medical virology	Jose F. Camargo	Cohorte retrospectiva	23 pacientes 49 muestras	Asociación entre el valor del umbral del ciclo (Ct) del SARS-CoV-2 y los resultados clínicos en pacientes con COVID-19.	No se encontró correlación entre los valores de Ct para ninguno de estos genes diana y los requerimientos de oxígeno. No se encontraron diferencias en los valores iniciales ni nadir entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes o la enfermedad leve/moderada versus grave/crítica.	No	No especificados	
2021	Acad Emerg Med.	Pierrick Le Borgne MD	Cohorte retrospectiva	287 pacientes	Investigar la carga viral en un hisopo nasofaríngeo al presentarse en el servicio de urgencias como un parámetro de	Al comparar sobrevivientes y no sobrevivientes, esta medida de carga viral no difirió según los	No	No especificado	



					gravedad y progresión de la enfermedad de la infección por SARS-CoV-2.	subgrupos (p = 0,332). Además, no predijo la mortalidad hospitalaria ni la gravedad de la enfermedad.			
2020	The american Journal of Pathology	Kimon V. Argyropoulos	Cohorte retrospectiva	205 pacientes	Investigar asociaciones entre CV y parámetros, como la gravedad de los síntomas, disposición (ingreso versus alta directa), duración de la hospitalización, ingreso a la unidad de cuidados intensivos unidad de cuidados, duración del soporte de oxígeno y supervivencia general.	No se observó asociación significativa entre CV, ingreso a unidad de cuidados intensivos, duración del soporte de oxígeno y la supervivencia global.	Sí	No especificado	Se calculó carga viral a partir de los Cts, utilizando los controles positivos proporcionados por los CDC, que están normalizados a 1000 copias/mL.
2022	J Infect Dev Ctries	Imran Saglik	Cohorte retrospective	214 pacientes	Investigar la asociación de SARS-CoV-2 carga viral con gravedad de la enfermedad y biomarcadores séricos en pacientes con COVID-19.	No se detectó asociación entre los valores de Ct de ingreso y gravedad de la enfermedad. La mortalidad no difirió significativamente en pacientes con valores de Ct bajos (≤ 25) y altos (> 25).	Sí	28.2	Sólo el 10% de los casos era grave.

Tabla 3 Estudios asociación Cts con gravedad.

Tabla 3 Estudios asociación Cts con Gravedad									
Año	Revista	Autor	Diseño	N	Objetivo	Resultados	Tiempo desde síntomas	Cts promedio	Comentarios
Estudios con asociación positiva									
2021	Indian Journal of Critical Care Medicine	Rajyalakshmi B	Estudio observacional retrospectivo unicéntrico.	192 pacientes	Estudiar la correlación entre el umbral del ciclo (CT) de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en pacientes confirmados con COVID-19 y la gravedad de la enfermedad. El objetivo primario fue la mortalidad a los 28 días.	El valor bajo de CT se asocia con un mayor ingreso en la UCI, una alta mortalidad, shock y una mayor duración de la estancia en la UCI. Los Cts no puede predecir el requerimiento de ventilación invasiva	No	Los Cts de los no supervivientes fue de 23,43. Los cts de los supervivientes fue de 25,93.	
2021	Open Forum Infectious Diseases	Vishal P Shah	Revisión sistemática y meta-análisis	18 estudios	Asociación entre los valores de CT y la hospitalización, la gravedad de la enfermedad y la mortalidad en pacientes ≥ 18 años con SARS-CoV-2.	Los pacientes hospitalizados con valores de Cts bajos presentan una enfermedad más grave en comparación con los pacientes con valores de CT >30 . Los pacientes hospitalizados			Revisión sistemática y meta-análisis



						con valores de CT de 25–30 en comparación con >30 también tenían un mayor riesgo de mortalidad.			
Estudios sin asociación									
2021	Journal of medical virology	Jose F. Camargo	Cohorte retrospectiva	23 pacientes 49 muestras	Asociación entre el valor del umbral del ciclo (Ct) del SARS-CoV-2 y los resultados clínicos en pacientes con COVID-19.	No se encontró correlación entre los valores de Ct para ninguno de estos genes diana y los requerimientos de oxígeno. No se encontraron diferencias en los valores iniciales ni nadir entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes o la enfermedad leve/moderada versus grave/crítica.	No	No especificados	
2021	Acad Emerg Med.	Pierrick Le Borgne MD	Cohorte retrospectiva	287 pacientes	Investigar la carga viral en un hisopo nasofaríngeo al presentarse en el servicio de urgencias como un parámetro de gravedad y progresión de la enfermedad de la	Al comparar sobrevivientes y no sobrevivientes, esta medida de carga viral no difirió según los subgrupos ($p = 0,332$). Además, no predijo la mortalidad	No	No especificado	



					infección por SARS-CoV-2.	hospitalaria ni la gravedad de la enfermedad.			
2020	The american Journal of Pathology	Kimon V. Argyropoulos	Cohorte retrospectiva	205 pacientes	Investigar asociaciones entre CV y parámetros, como la gravedad de los síntomas, disposición (ingreso versus alta directa), duración de la hospitalización, ingreso a la unidad de cuidados intensivos unidad de cuidados, duración del soporte de oxígeno y supervivencia general.	No se observó asociación significativa entre CV, ingreso a unidad de cuidados intensivos, duración del soporte de oxígeno y la supervivencia global.	Sí	No especificado	Se calculó carga viral a partir de los Cts, utilizando los controles positivos proporcionados por los CDC, que están normalizados a 1000 copias/mL.
2022	J Infect Dev Ctries	Imran Saglik	Cohorte retrospectiva	214 pacientes	Investigar la asociación de SARS-CoV-2 carga viral con gravedad de la enfermedad y biomarcadores séricos en pacientes con COVID-19.	No se detectó asociación entre los valores de Ct de ingreso y gravedad de la enfermedad. La mortalidad no difirió significativamente en pacientes con valores de Ct bajos (≤ 25) y altos (> 25).	Sí	28.2	Sólo el 10% de los casos era grave.