



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

**DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN S DEL
VIRUS SARS-COV-2 EN PACIENTES COVID-19**

TESIS

Para obtener el título de:

BIOLOGO

PRESENTA:

Fernández Hernández Juan Carlos

Jurado de Examen

Directora: Dra. Mónica Sierra Martínez

Asesor: Dr. Leonardo Trujillo Cirilo

Asesor: M. en C. Ana Rocío Rivera

Sinodal: M. en C. Reynalda Roldan Pérez

Sinodal: M. en C. Ana Cristina



Ciudad de México

Septiembre 2023.



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. EN C. ALVARADO DOMINGUE MARIA CRISTINA
Vocal	DRA. SIERRA MARTINEZ MONICA
Secretario	M. EN C. ROLDAN PEREZ REYNALDA
Suplente	M. EN C. RIVERA MARTINEZ ANA ROCIO
Suplente	DR. TRUJILLO CIRILO LEONARDO

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular, del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, bajo la dirección de la Dra. Mónica Sierra Martínez.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Doctora Mónica Sierra Martínez, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza y el apoyo otorgado durante mi formación académica.

A Vane, Susi y Mtra. Mariana, por sus valiosas lecciones tanto en el laboratorio como en la vida, nunca dejo de aprender de ustedes.

A mi asesora la Mtra. Rocío por su valioso apoyo y recomendaciones a lo largo de toda mi trayectoria universitaria.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado especialmente a mis padres.

Índice

GLOSARIO	1
ABREVIATURAS	4
1. Resumen	5
2.INTRODUCCIÓN	6
3.MARCO TEÓRICO	3
3.1 Generalidades del virus SARS-CoV-2 y de la enfermedad COVID-19.....	3
3.2 Inmunología y características clínicas de la enfermedad COVID-19.	5
3.3 Epidemiología de la infección por SARS-CoV-2 en México	7
3.3.1 Mortalidad de la Enfermedad COVID-19 en México	8
3.4 Características genéticas del virus SARS-CoV-2	9
3.5 Métodos de diagnóstico del virus SARS-CoV-2	10
3.6 Proteínas de estructura viral	12
3.6.1 Proteína N.....	12
3.6.2 Proteína M.....	12
3.6.3 Proteína E.....	12
3.6.4 Proteína S	13
3.7 Mutaciones.....	14
3.8 Mutaciones en el genoma viral y evolución del SARS-CoV-2	14
3.9 Variantes del virus SARS-CoV-2 y su nomenclatura	15
3.9.1 Nomenclatura PANGO	16

3.9.2 Variantes de preocupación (VOC)	17
3.9.3 Variante Alfa (B.1.1.7).....	18
3.9.4 Variante Delta (B.1.617.2)	18
3.9.5 Variante Gamma (P.1).....	19
3.9.6 Variante Beta (B.1.315).....	19
3.10 Métodos de detección de variantes del virus SARS-CoV-2	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
6. JUSTIFICACIÓN	22
7. OBJETIVOS.....	23
7.1 Objetivo General.....	23
7.2 Objetivos Particulares.....	23
8.METODOLOGIA	23
8.1 población de estudio.....	23
8.1.1 Criterios de inclusión	24
8.1.2 Criterios de exclusión.....	24
8.2 MATERIAL Y METODO	24
8.2.1 Toma de muestra.....	24
8.2.2 Extracción de Ácidos Nucleicos	25
8.2.3 Detección molecular del virus SARS-CoV-2	26

8.2.3.1 Amplificación mediante RT-qPCR	26
8.2.3.2 Análisis de las curvas de amplificación para la detección del virus SARS-CoV-2	27
8.2.4 Detección de mutaciones e identificación de variantes virales	27
8.2.5 Base de datos.....	29
8.2.5.1 Recopilación de datos clínicos	29
8.2.5.2 Análisis de datos	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
10. CONCLUSIONES	64
11. REFERENCIAS	65
12. ANEXOS	76
ANEXO 1. PROTOCOLO DE PREPARACION DE MEDIO RPMI 1640	76
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE ANTI-ANTI (ANTIMICÓTICO- ANTIBIÓTICO) PARA MEDIOS DE TRANSPORTE.....	76
ANEXO 3. FRECUENCIAS DE MUTACIONES IDENTIFICADAS.....	76
ANEXO 4. FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES VIRALES IDENTIFICADAS DE MANERA PRELIMINAR.	76

GLOSARIO:

Antígeno: Sustancia que provoca que el sistema inmunitario produzca anticuerpos.

Apoptosis: Muerte celular en la que una serie de procesos moleculares conducen a su muerte programada.

ARNasas: Enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

Artralgia: Dolor de las articulaciones.

Cefalea: Dolor de cabeza.

Citocinas: Proteínas que controla el crecimiento y la actividad de células del sistema inmunitario.

Coagulación intravascular diseminada (CID): Generación excesiva de trombina y fibrina en la sangre. Durante el proceso, hay aumento de la agregación plaquetaria y del consumo de factores de coagulación.

Complejo ribonucleoproteico (RNP): Conjunto de moléculas que contienen proteínas y ARN. A menudo se utiliza para describir la proteína Cas9 unida para guiar el ARN (ARNg), que juntos forman una enzima activa.

CORADS: Sistema basado en TAC que evalúa la sospecha de afectación pulmonar en COVID-19.

Cuasiespecies: Virus mutantes que se desarrolla a medida que se multiplica un virus dentro de un huésped. Los virus agrupados en una cuasiespecie están relacionados por mutaciones similares.

Dímero D: Fragmento de proteína que se produce cuando un coágulo de sangre se disuelve en el cuerpo.

Eosinopenia: Descenso porcentual de los eosinófilos en el plasma sanguíneo.

Exocitosis: Proceso en el cual se secretan moléculas contenidas en una vesícula citoplasmática al espacio extracelular.

Factores de virulencia: Habilidades con las cuales agentes patógenos producen invasión, infección, modulación de la respuesta inmune y dificultad en el tratamiento.

Ferritina sérica: Cantidad de ferritina en la sangre (nivel de ferritina sérica) está directamente relacionada con la cantidad de hierro almacenado en el cuerpo.

IL-18: Citoquina que regula el balance Th1/Th2 y actúa sinérgicamente con la IL-12 para promover el desarrollo de la inmunidad Th116.

IL-7: Citoquina que estimula la linfopoyesis, interviniendo en la diferenciación de la célula madre de la médula ósea a precursores T y B.

INF-γ: Tipo de citocina producida por linfocitos T y NK. Su función es la activación de los macrófagos, con aumento en la capacidad fagocitaria, en las respuestas inmunitaria innatas y las adaptativas.

Inflamasoma: Complejo multiproteico formado por la caspasa 1, PYCARD, una NALP y en ocasiones una caspasa 5 u 11. La composición exacta del inflamasoma depende del activador que inicia el ensamblaje del inflamasoma.

Inmunoglobulinas: Proteína elaborada con células B y células plasmáticas que ayuda al cuerpo a combatir infecciones.

Inmunomoduladores: Sustancias que aumenta o disminuye la respuesta inmune.

Inmunosenescencia: Cambios en el sistema inmunitario a causa del envejecimiento que afectan la inmunidad innata y adaptativa.

Interleucinas: Grupo de proteínas que regulan las respuestas inmunitarias. Una interleucina es un tipo de citocina. También se llama IL.

Linfopenia: Trastorno en el que la sangre no tiene suficiente cantidad de unos glóbulos blancos denominados linfocitos.

Mialgia: Dolor muscular.

Monocatenario: Formado por una sola cadena.

Neutrofilia: Aumento del número de neutrófilos en la sangre, lo que puede indicar infección y enfermedades inflamatoria.

N-terminal: Se refiere al extremo de una proteína que finaliza con un aminoácido que posee un grupo amino libre.

Patogenicidad: Capacidad para infectar un huésped y causar enfermedad.

Peroxidasa de eosinófilos: Proteína citotóxica

Receptor tipo toll: Moléculas de reconocimiento de patógenos y/o moléculas propias alteradas, capaces de activar la respuesta inmunológica.

Respuesta de proteína desplegada (UPR): Respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR, en inglés) es una respuesta al estrés celular relacionado con el

retículo endoplasmático.

Retrotranscripción: Proceso celular por el que una enzima hace una copia de ADN del ARN.

La enzima que hace la copia de ADN se llama retrotranscriptasa.

Rinorrea: Secreción nasal.

RNasa P: Endonucleasa responsable de la generación del extremo 5' de los tRNAs maduros, así como del procesamiento de algunos otros precursores de RNA.

SaO²: Porcentaje de saturación de oxígeno de la hemoglobina en sangre arterial.

TNF- α : Proteína que activa la expresión de diversos genes involucrados con eventos cardiovasculares.

TP: Tiempo de protombina es un examen de sangre que mide el tiempo que tarda la porción líquida de la sangre (plasma) en coagularse.

Transcripción: Proceso en el cual una célula elabora una copia de ARN partiendo de ADN.

Transmisibilidad: Lapso durante el cual, el agente infeccioso puede ser transferido directa o indirectamente de una persona infectada a otra.

Trombosis venosa profunda (TVP): Se produce cuando se forma un coágulo de sangre (trombo) en una o más venas profundas del cuerpo, generalmente en las piernas.

Tropismo celular: Atracción altamente específica de un virus a una célula.

Viroporina: Moléculas altamente hidrofóbicas, forman agregados que se integran en las membranas celulares, dando lugar a la formación de poros hidrofílicos.

(IL)-1 β : Proteína citocina que en los seres humanos está codificada por el gen IL1B.

ABREVIATURAS

D138Y: Sustitución del aminoácido Acido Aspártico en la posición 138 por el aminoácido Tirosina.

D614G: Sustitución del aminoácido Acido Aspártico en la posición 614 por el aminoácido Glicina.

de157/158: Delección de los aminoácidos de las posiciones 157 y 158.

E484K: Sustitución del aminoácido Acido Glutámico en la posición 484 por el aminoácido Lisina.

H655Y: Sustitución del aminoácido Histidina en la posición 655 por el aminoácido Tirosina.

P26S: Sustitución del aminoácido Prolina en la posición 26 por el aminoácido Serina.

P681H: Sustitución del aminoácido Prolina en la posición 681 por el aminoácido Histidina.

P681R: Sustitución del aminoácido Prolina en la posición 681 por el aminoácido Arginina.

K417T: Sustitución del aminoácido Lisina en la posición 417 por el aminoácido Treonina.

L452R: Sustitución del aminoácido Leucina en la posición 452 por el aminoácido Arginina.

N501Y: Sustitución del aminoácido Asparagina en la posición 501 por el aminoácido Tirosina.

R190S: Sustitución del aminoácido Arginina en la posición 190 por el aminoácido Serina.

T1027I: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 1027 por el aminoácido Isoleucina.

T19R: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 19 por el aminoácido Arginina.

T20N: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 20 por el aminoácido Asparagina.

T478K: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 478 por el aminoácido Lisina.

T484K: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 484 por el aminoácido Lisina.

T732A: Sustitución del aminoácido Treonina en la posición 732 por el aminoácido Alanina.

1. RESUMEN

La pandemia por SARS-CoV-2, ha dejado desafortunadamente millones de contagios y muertes. El genoma de este virus acumula diferentes mutaciones que provocan el incremento de contagios y gravedad de la enfermedad, en México se registran cerca de 345 mil defunciones y más de 7 millones de contagios con corte de información al 15 de diciembre del 2022. Por ello el objetivo de este trabajo fue identificar las mutaciones en el gen S denominadas; D614G, T478K, P681H, T732A, K417N, N501Y, E484K, E484Q, L452R y del 69/70, para determinar la variante preliminar y correlacionarlo con datos clínicos y severidad de pacientes positivos a COVID-19. Para ello se realizaron 250 hisopados nasofaríngeos de pacientes con síntomas relacionados a COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI), entre los meses de abril 2020 a julio del 2021. La extracción del material genético se realizó con kits comerciales, utilizando el método de extracción por columnas, el diagnóstico se llevó a cabo mediante RT-qPCR con la identificación de los genes ORF1ab, N, E y RNAsa P como control interno. Se seleccionaron 158 pacientes positivos a la infección por SARS-CoV-2, de los cuales se recopilaron datos tales como edad, sexo, comorbilidades, etc. Se utilizaron kits comerciales para la detección de las mutaciones. De los cuales observamos, una alta frecuencia la mutación D614G en 155/158 (98.1%), seguido de las mutaciones E484K con 101/158, T484K con 89/158, T732A en 77/158 y P681H en 65/158 con el 63.92% ,56.96%, 48.73% y 41.77% respectivamente. Asimismo, se determinó la variante de 148 pacientes de los cuales las más representativas fueron la B.1.1.519 que corresponde la variante mexicana (47.29%), Iota y Zeta (18.24%), Delta (10.81%), B.1 (16.21%), Gamma (5.7%) y Alfa (1.3%). Con los resultados obtenidos podemos inferir que analizar las mutaciones en el gen S del virus SARS-CoV-2 y correlacionarlas con la variante viral y la presencia de comorbilidades, es útil para tener un mejor seguimiento de la pandemia y dar un pronóstico más acertado sobre la evolución de la enfermedad COVID-19 en cada paciente.

2. INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2, es el agente etiológico de la enfermedad COVID-19, ha causado un gran número de contagios por su alta transmisibilidad, lo cual lo convierte en un reto de salud pública a nivel internacional. Aunado a esto, la acumulación de estas mutaciones ha provocado la aparición de variantes de preocupación (VOC) las cuales son un importante problema de salud pública, ya que repercuten en la transmisibilidad y gravedad de la enfermedad COVID-19. A lo largo de la pandemia, diferentes linajes virales han sido clasificados como variantes de preocupación, sin embargo, el método estándar para detectar dichas variantes es la secuenciación genética, el cual es un método costoso y difícil de mantener durante el transcurso de la pandemia. Para analizar esta problemática, es necesario introducir nuevas estrategias diagnósticas, basadas en métodos moleculares, que nos permitan identificar mutaciones específicas que se encuentren en la región que codifica para los aminoácidos de la proteína S, ya que esta es una proteína clave para el ingreso del virus a la célula huésped. En este sentido, la presente investigación se refiere a las mutaciones en el gen S del virus SARS-CoV-2, las cuales se reportaron en diferentes variantes de preocupación y de interés, con el fin de correlacionar la presencia de dichas mutaciones con la identificación preliminar de la variante viral para cada paciente y a su vez comparar con el expediente clínico para otorgar un pronóstico más acertado sobre la gravedad de la enfermedad.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del virus SARS-CoV-2 y de la enfermedad COVID-19

El virus SARS-CoV-2, agente etiológico de la actual pandemia por COVID-19, fue identificado por primera vez en diciembre del 2019 en Wuhan, provincia de Hubei en China. Perteneció al grupo de los coronavirus humanos (HCoV), estos virus se pueden dividir en HCoV de baja patogenicidad (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) los cuales causan enfermedades respiratorias leves, asociadas comúnmente a síntomas del resfriado común (Azkur *et al.*, 2020). En contraste con los HCoV de alta patogenicidad como el MERS-CoV (Síndrome respiratorio de Oriente Medio), SARS-CoV (Síndrome Respiratorio Agudo Grave) y SARS-CoV-2, pertenecientes también a esta familia, sin embargo, generan patologías graves como neumonía u otras lesiones pulmonares, lo cual convierte a estos virus y en particular al SARS-CoV-2 en un importante problema de salud pública de relevancia internacional (Kirtipal *et al.*, 2020).

La aparición del SARS-CoV-2 se considera la tercera introducción zoonótica de esta familia de virus, los cuales poseen similitudes de hasta el 80% como es el caso del SARS-CoV y SARS-CoV-2, (Nour *et al.*, 2020). Por lo cual es de especial importancia establecer estrategias que permitan identificar de manera temprana mutaciones en el genoma viral, que puedan provocar el desarrollo de progenies virales que afecten a la salud humana.

El genoma del SARS-CoV-2 contiene la información para codificar una variedad de proteínas (Figura 1) como Spike, N y M. Las cuales son indispensables en el proceso de infección viral (Figura 2), dicho proceso consta de una serie de pasos que van desde el reconocimiento, ingreso, replicación, ensamblaje y posterior liberación de nuevas copias virales. El primer paso se lleva a cabo tras el reconocimiento de la proteína de superficie viral denominada como Spike, mediante su dominio de unión al receptor RBD, el cual es reconocido por los receptores de membrana celular ACE-2 (enzima convertidora de angiotensina 2), en la nasofaringe y orofaringe, sin embargo, este receptor se encuentra en variedad de células y órganos, incluidos el intestino delgado, colon, riñón, hígado, endotelio vascular y células epiteliales pulmonares. Posterior a la entrada celular, es liberado el material genético viral el cual es replicado y traducido en proteínas accesorias y de membrana que junto con el ARN viral forman nucleocápsides que tras un proceso de ensamblaje son liberadas por exocitosis (Nour *et al.*, 2020).

Una vez completado el ciclo de replicación en las mucosas oral y nasal, la mayoría de los pacientes presentan síntomas leves como fiebre, dolor de garganta, mialgia, artralgia, tos seca y fatiga, entre los primeros 4 a 5 días después de la infección (Hu *et al.*, 2020). Sin embargo, en algunos casos el virus llega a vías respiratorias inferiores donde infecta células del epitelio pulmonar conocidas como neumocitos tipo II estas representan de 10 al 15% del total de células pulmonares. A medida que progresa la infección, el virus provoca en las células huésped un proceso de apoptosis (muerte celular programada) lo que resulta eventualmente en daños pulmonares que se conduce al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Nour *et al.*, 2020). Esta es una de las complicaciones más relevantes en la infección por SARS-CoV-2, además de ser consecuencia común del síndrome de tormenta de citocinas, el cual es una reacción inflamatoria excesiva provocada por grandes cantidades de citocinas secretadas en respuesta a una infección.

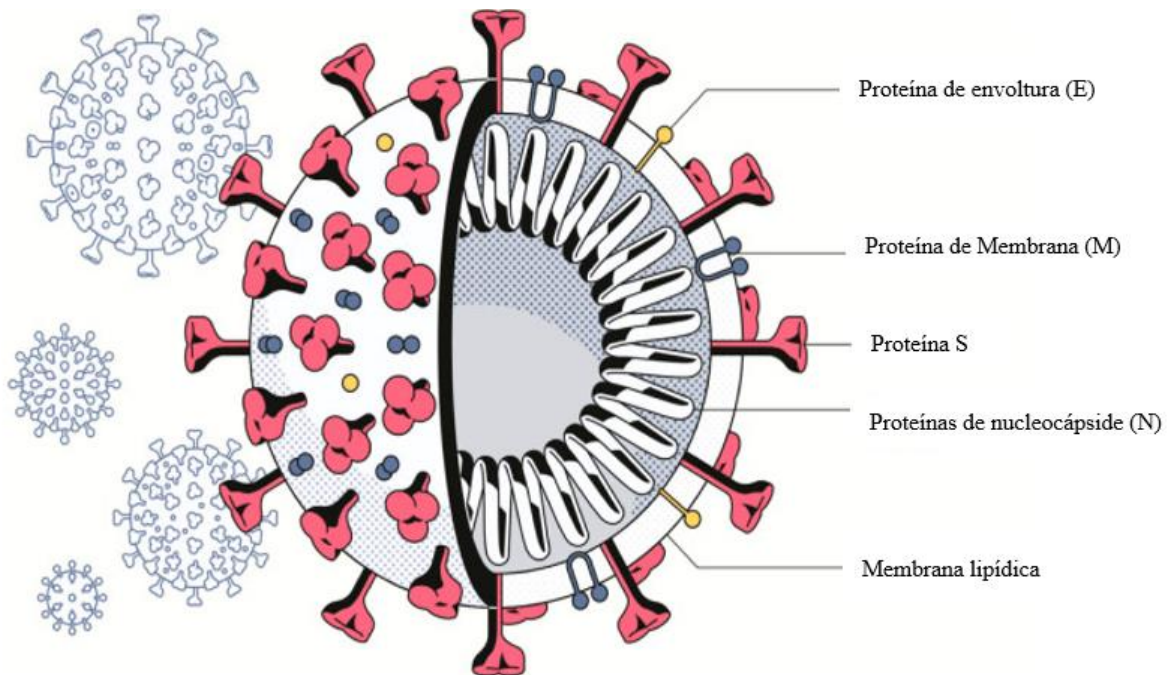


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. Tomado y modificado de The Economist., 2020.

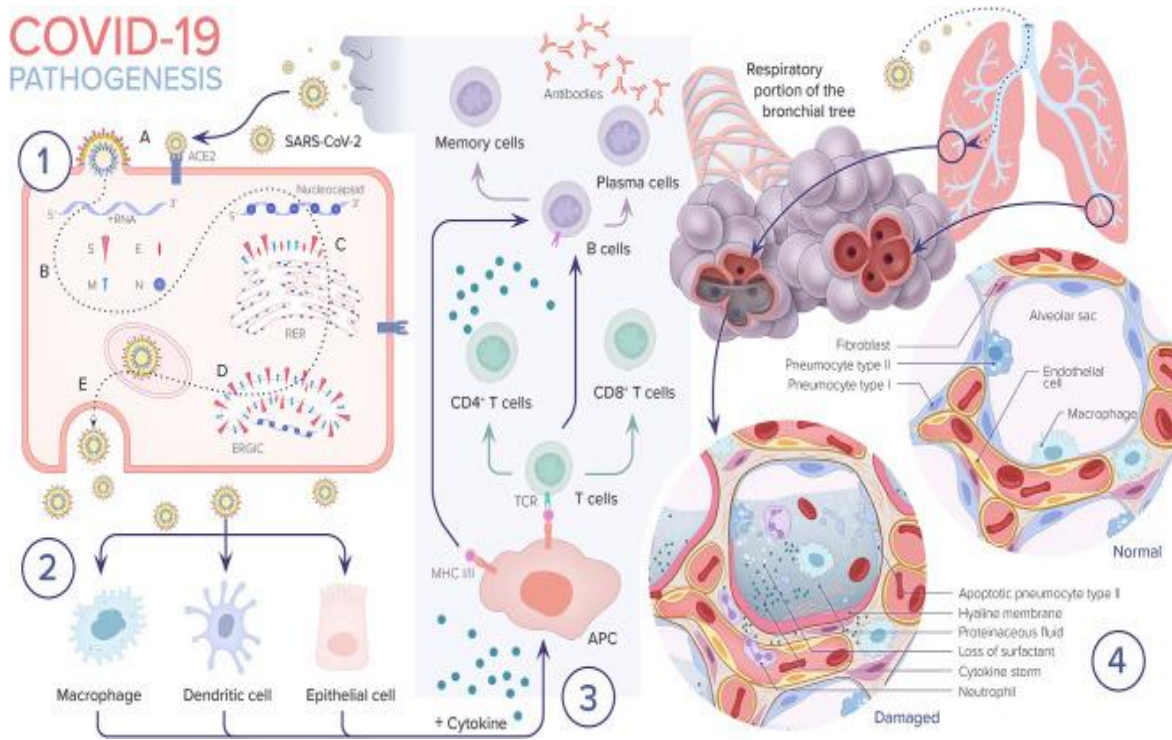


Figura 2. Proceso de Infección viral. 1) Ingreso del virus SARS-CoV-2 a través del receptor ACE-2, se ilustra el ensamblaje de las proteínas estructurales S, E, M y N. 2) Tipos celulares del sistema inmunitario innato que responden a la infección. 3) Respuesta inmunitaria Adaptativa, la célula presentadora de Antígenos (APC) presenta a los linfocitos el antígeno del virus SARS-CoV 2. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ responden a la infección. Activación de los linfocitos B generadores de anticuerpos. 4) Ingreso del virus a vías respiratorias inferiores, Daño pulmonar afectando a neumocitos tipo II y respuesta inmunitaria innata mediado por neutrófilos y Macrófagos. Tomado de (Chams *et al.*, 2020).

3.2 Inmunología y características clínicas de la enfermedad COVID-19.

La enfermedad COVID-19 muestra un perfil complejo con muchas presentaciones clínicas diferentes (Azkur *et al.*, 2020). Los pacientes pueden ser asintomáticos, experimentar síntomas leves, moderados o graves y presentar o no neumonía. Los casos asintomáticos son frecuentes, pero hasta la fecha existen escasas encuestas epidemiológicas que aporten un porcentaje claro de casos asintomáticos. Por otro lado, la patogenicidad de la enfermedad se asocia con la activación viral del inflammasoma en macrófagos y células epiteliales liberando citocinas proinflamatorias, interleucina (IL)-1 β e IL-18, que contribuyen a la gravedad de los síntomas de COVID-19. Además, la detección del ARN viral por parte del receptor tipo toll y una gran cantidad de citoquinas

proinflamatorias tienen un papel importante en el inicio de la inflamación inducida por virus.

Los casos graves de COVID-19 progresan al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en promedio alrededor de 8 a 9 días después del inicio de los síntomas. En este sentido, la neumonía grave asociada con el coronavirus (Figura 3) generalmente se relaciona con la rápida replicación viral, agregación extensa de células inflamatorias, producción elevada de mediadores inflamatorios y la inmunopatología inducida por el virus contribuye a la lesión pulmonar aguda (ALI) y al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Aunado a esto, la edad avanzada, comorbilidades, fiebre alta, neutrofilia, linfopenia, los índices relacionados con órganos diana elevados, la ferritina sérica y los indicadores relacionados con la función de la coagulación (PT y dímero D) se asocian significativamente con una mayor riesgo de desarrollar Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) (Wu *et al.*, 2020).

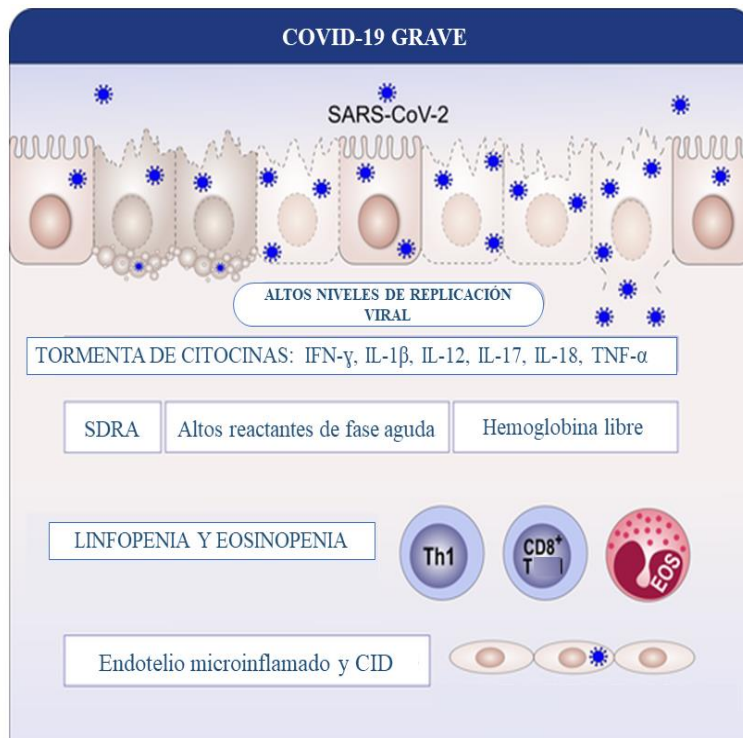


Figura 3. Patogenicidad de la enfermedad COVID-19 grave. En pacientes que desarrollan la enfermedad COVID-19 está caracterizada por altos niveles de replicación viral, debido a esto se puede generar una tormenta de citocinas caracterizada por INF- γ , IL-1 β , IL-7, IL-18 y TNF- α . En este sentido, otros efectos de la enfermedad grave de COVID-19 son el desarrollo de Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) Tomado y modificado de Azkur *et al.*, 2021.

3.3 Epidemiología de la infección por SARS-CoV-2 en México

De acuerdo con la OMS, en México se registraron los primeros casos de COVID-19 desde el 27 de febrero del 2020, y la confirmación oficial se publicó a fines de febrero. El 20 de abril de 2020, el gobierno mexicano declaró oficialmente la fase 3 de la epidemia. Con una población de casi 130 millones de habitantes, de los cuales 52% y 48% son mujeres y hombres, respectivamente, y una alta prevalencia de comorbilidades de alto riesgo como hipertensión, obesidad y diabetes, México es uno de los países más afectados de América, solo por detrás de Estados Unidos, Brasil, Perú y Chile (Parra-Bracamonte *et al.*, 2020).

Por otra parte, varias mediciones de la OMS reflejan el fuerte impacto de la enfermedad en el país, situándolo entre los de peor desempeño a nivel internacional de acuerdo con:

A) Cifras de casos y muertes confirmadas comparativamente altas, después de considerar las diferencias en el tamaño de la población y el número de pruebas realizadas.

B) Un exceso de mortalidad por todas las causas comparativamente alto, que refleja el impacto directo e indirecto del COVID-19.

C) Grandes desigualdades en la carga de enfermedad entre grupos sociales y regiones.

D) Tasas de infección y mortalidad muy elevadas entre trabajadores de la salud.

En este sentido, la secretaria de salud en su Informe Integral de COVID-19 en México, el cual integra la notificación de los casos totales acumulados, estos ascienden a 7,041,773, los cuales incluyen casos y defunciones con asociación o dictaminación clínica-epidemiológica desde la semana epidemiológica 1 del 2020 a la semana 35 de 2022 (Figura 4 y cuadro 1), con corte de información al 03 de septiembre del 2022.

Cuadro 1. Casos confirmados y tasa de incidencia por 1,000 habitantes en cada ola epidémica (Tomado del Informe COVID-19, Mexico-03 de septiembre de 2022).

<i>NUMERO OLA</i>	<i>CASOS CONFIRMADOS</i>	<i>TASA DE INCIDENCIA POR 1,000 HAB</i>
<i>PRIMERA OLA</i>	<i>813,366</i>	<i>6.4</i>
<i>SEGUNDA OLA</i>	<i>1,537,800</i>	<i>11.9</i>
<i>TERCERA OLA</i>	<i>1,376,284</i>	<i>10.7</i>
<i>CUARTA OLA</i>	<i>1,725,573</i>	<i>13.3</i>
<i>QUINTA OLA</i>	<i>1,225,516</i>	<i>9.4</i>

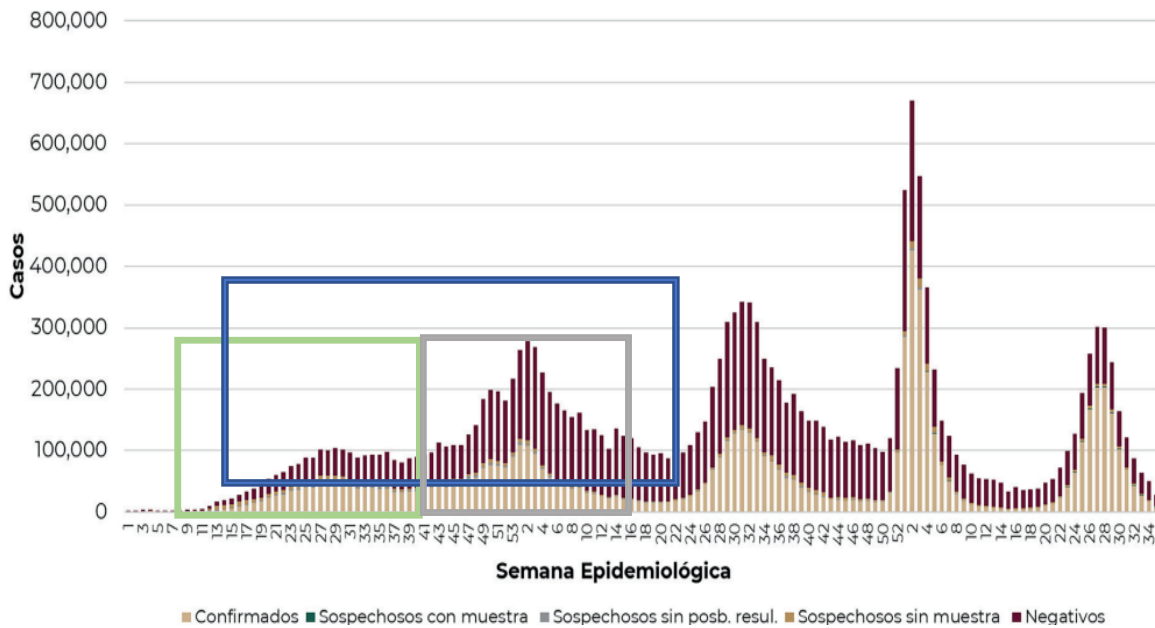


Figura 4. Casos confirmados, negativos, sospechosos con y sin muestra. Tomado y modificado de informe COVID-19, Mexico-03 de septiembre de 2022). Recuadro azul: semanas epidemiológicas que abarca el presente estudio. Recuadro verde: semanas epidemiológicas de la primera ola de contagios. Recuadro gris: Semanas epidemiológicas de la segunda ola de contagios.

3.3.1 Mortalidad de la Enfermedad COVID-19 en México.

Al corte de este informe, se han registrado 329,629 defunciones totales de COVID-19, incluyendo las confirmadas a SARS-CoV-2 por laboratorio, por antígeno y defunciones por asociación o dictaminación clínica-epidemiológica. Hasta el día de hoy, se tienen 13,957 defunciones sospechosas de COVID-19. En este sentido, Diez entidades concentran el 63.3% de las defunciones acumuladas en el país: Ciudad de México, Estado de México, Jalisco, Veracruz, Puebla, Nuevo León, Guanajuato, Baja California, Sonora y Chihuahua.

Numerosos estudios han asociado la edad avanzada, sexo y comorbilidades como factores de riesgo asociados a mortalidad en pacientes con COVID-19. En este sentido de acuerdo con lo reportado en un estudio de Parra-Bracamonte *et al.*, 2020, el 92 % de los pacientes que no sobrevivieron eran mayores de 41. Aunado a esto, la obesidad es una de las causas de morbilidad prevalentes en la población mexicana. Aunque existe información limitada sobre la asociación real de estos rasgos de comorbilidad con el riesgo de muerte en pacientes con COVID-19, la evidencia muestra que estas variaciones pueden estar relacionadas con la estructura poblacional y la prevalencia real de comorbilidad en cada país.

Por otra parte, la prevalencia de la hipertensión arterial, diabetes y obesidad fueron las comorbilidades más importantes encontradas en pacientes mexicanos positivos para COVID-19. La prevalencia de hipertensión en adultos fue del 18,4 % en 2018. Más alta en mujeres que en hombres (20,9 % frente a 15,3 %), lo que hace que la población sea especialmente vulnerable. Más importante aún, la prevalencia de hipertensión en pacientes positivos fue mayor que la media de la población.

Cuadro 2. Resumen acumulado 2020 y 2021. Tomado y modificado de (Exceso de Mortalidad en México – Coronavirus, Mexico-03 de septiembre de 2022.

Año	Defunciones esperadas acumuladas	Defunciones observadas (acumuladas)	Exceso de defunciones acumuladas	Porcentaje de exceso de defunciones acumuladas
2020	770,762	1,083,572	321,810	40.6%
2021	777,860	1,091,037	313,177	40.3%

El recuadro azul resalta el exceso de defunciones reportadas durante los años 2020 y 2021.

3.4 Características genéticas del virus SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 posee un ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 30 mil pares de bases (Figura 5) empaquetado en una envoltura proteica (Almehdi *et al.*, 2021). Presenta un número variable de marcos de lectura abiertos como el ORF1a y el ORF1b, los cuales son indispensables para la replicación viral y en conjunto corresponden a aproximadamente 2/3 partes del genoma viral traduciendo a proteínas no estructurales (nsps). Del tercio restante la mayor parte corresponde al marco de lectura abierto ORF 3, el cual contiene la información para codificar proteínas accesorias y estructurales. Las cuatro proteínas estructurales principales son: la proteína Spike (S), la proteína de envoltura (E), la proteína de matriz (M), y la proteína de núcleo cápside (N). Además, el SARS- CoV-2 contiene 6 proteínas accesorias codificadas por los genes ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 y ORF10 las cuales su función continúa siendo estudiada, sin embargo, algunas que se proponen son el evadir la respuesta inmune del huésped e inducir la apoptosis en las células infectadas (Giovanetti *et al.*, 2020).

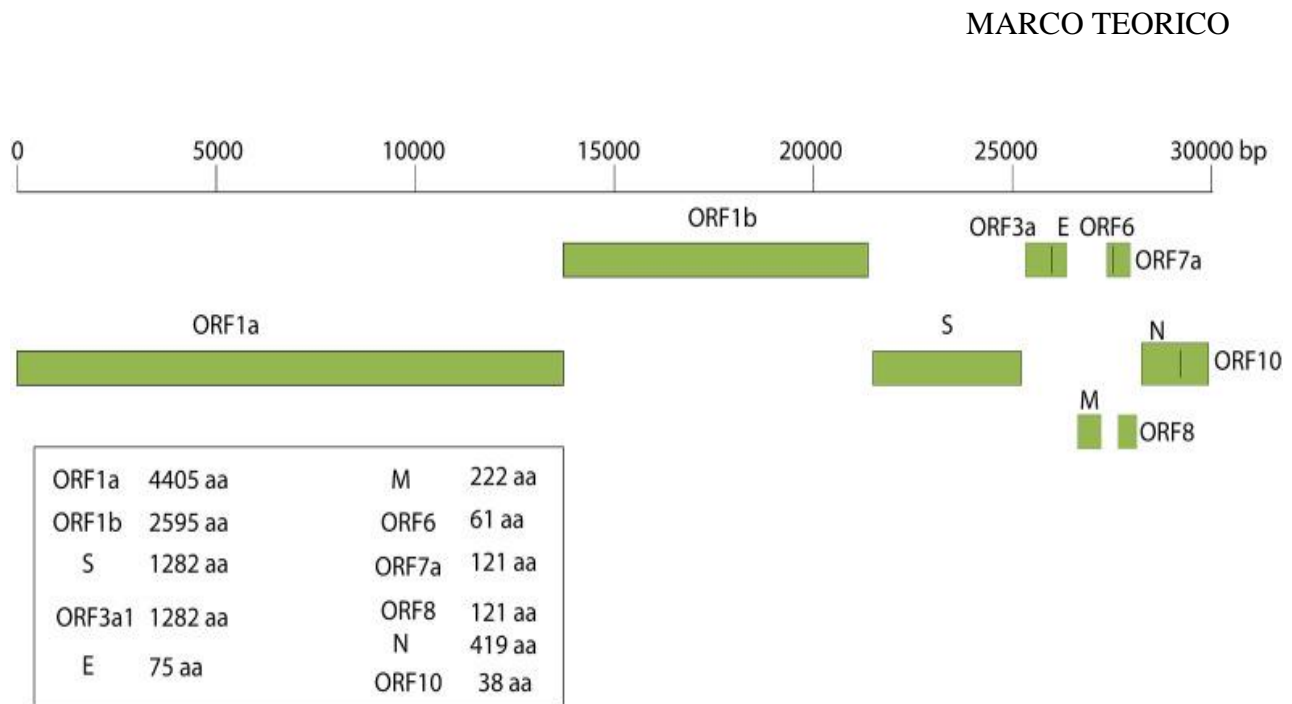


Figura 5. Representación esquemática del genoma del virus SARS-CoV-2. Los ORF1a y ORF1b ocupan cerca del 80% de la totalidad del genoma. En el recuadro inferior izquierdo se muestra la secuencia y la cantidad aproximada de aminoácidos que codifica. Tomado de Giovanetti *et al.*, 2021.

3.5. Métodos de diagnóstico del virus SARS-CoV-2

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa en tiempo Real (RT-qPCR) (Figura 6). como estándar de oro para la detección de SARS-CoV-2, esta técnica es una variación de la RT-PCR convencional, sin embargo, en esta variante, la amplificación y detección se realizan de manera simultánea mediante el uso de reporteros fluorescentes o sondas, utilizar esta técnica implica la capacidad de analizar cientos de muestras por día, con una alta sensibilidad (95-100%). Además, existen pruebas de diagnóstico rápido de detección de antígenos específicos (Ag-RDT) del SARS-CoV-2, las cuales identifican directamente las proteínas del SARS-CoV-2 producidas por la replicación del virus en las vías respiratorias. A diferencia de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos de referencia (NAAT), como la RT-qPCR, las Ag-RDT son una alternativa simple y rápida para identificar casos positivos (Agulló *et al.*, 2021).

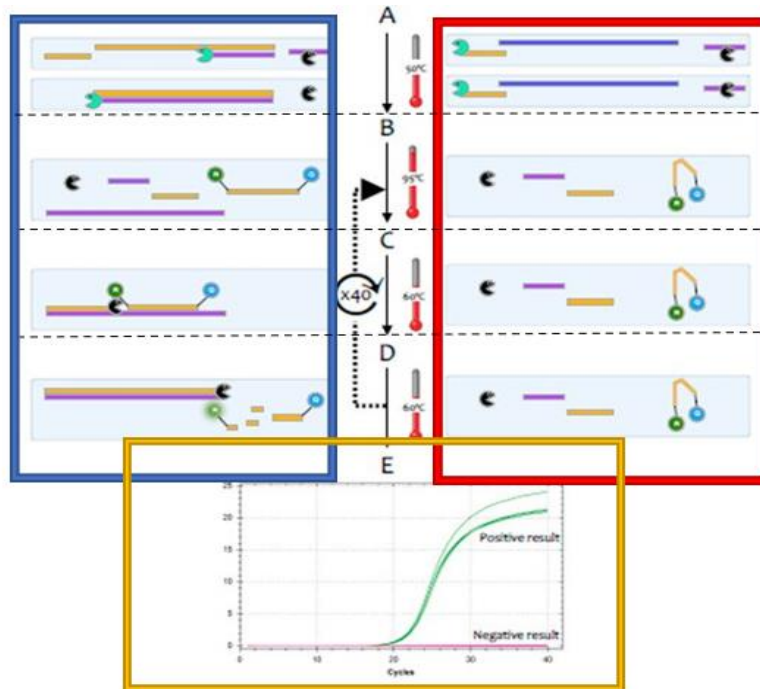


Figura 6. Generación de la fluorescencia durante una prueba de RT-qPCR. El recuadro azul del lado izquierdo ejemplifica una muestra con RNA del virus SARS-CoV-2 A) Temperatura utilizada para el paso de la **Retrotranscripción**: Se parte de una cadena de RNA y se obtiene DNA de cadena sencilla (DNAc) B) **Desnaturalización**: Se desnaturaliza el RNA, pero no el DNAc C) **Alineamiento**: Los primers y sondas reconocen a la cadena molde D) **Extensión**: A partir del reconocimiento de los primers, la enzima sintetiza nuevas cadenas e hidroliza la sonda para emitir la fluorescencia E) **Lectura**: Se analizan las curvas de amplificación obtenidas. tomado y modificado de (Bustin & Nolan, 2020).

3.6 Proteínas de estructura viral

3.6.1 Proteína N

Las funciones de la proteína N incluyen la replicación y transcripción del ARN viral, la formación y el mantenimiento del complejo ribonucleoproteico (RNP). Además, también se informa que la proteína N está involucrada en la interacción huésped-virus. Regulan el ciclo de la célula huésped, incluida la apoptosis, para facilitar la replicación y propagación del virus. En este sentido, se han informado tres señales de localización nuclear (NLS1–NLS3) y dos señales de exportación nuclear (NES1 y NLS2) en la proteína N del SARS-CoV-2, que se cree desempeñan un papel crucial en el ensamblaje de la proteína viral (Kadam *et al.*, 2021).

3.6.2 Proteína M

La glicoproteína M es el constituyente más abundante de los CoV. La interacción de la proteína M con la S y la E concilia la forma característica de la envoltura del virus. La proteína M es una proteína de membrana que se caracteriza por tres dominios transmembrana que tienen C-terminal en el interior y N-terminal en el exterior. El tercer dominio transmembrana contiene una región anfipática terminal (Kadam *et al.*, 2021).

A través de varias interacciones proteína-proteína, la proteína M juega un papel importante en el ensamblaje viral y su homeostasis (Lan *et al.*, 2020). También la proteína M pueden interactuar con los ARN que codifican información sobre las señales de empaquetamiento del genoma. Estos hallazgos respaldan su papel central en el ensamblaje de las partículas de virión. Asimismo, participa en la regulación de la replicación y el empaquetamiento del ARN en partículas virales (Kadam *et al.*, 2021).

3.6.3 Proteína E

Es la proteína más conservada en los CoVs, por lo tanto, muestra características y funciones comunes. Tiene actividad de canal iónico y una función de "oligomerización" que resulta en la formación de vioporina (Zhang *et al.*, 2014). Las vioporinas son capaces de transportar selectivamente iones como Ca^{2+} y participar en el ensamblaje y liberación de partículas virales. Además, participa en el aumento de la carga de plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE). Esto da como resultado un plegamiento incorrecto de proteínas que emerge en una condición conocida como respuesta de proteína desplegada (UPR), lo cual puede conducir a la apoptosis en la célula huésped (Kadam *et al.*, 2021).

3.6.4 Proteína S

Es una proteína trimérica conformada por aproximadamente 1273 aminoácidos (Figura 7.A.) que se componen de tres regiones (Figura 7.B.): la región del ectodominio, la región transmembrana y el dominio intracelular. La región del ectodominio tiene subdominios S1 y S2. El subdominio S1 de la proteína S actúa como un antígeno de superficie principal. Además, contiene dos subunidades, dominio N-terminal (NTD) y dominio C-terminal (CTD) (Ke *et al.*, 2020). El S1-CTD actúa como un dominio de unión al receptor (RBD). En este sentido, el RBD interactúa con los 18 residuos de ACE-2. Mientras que el

dominio S2 es una subunidad de fusión de membrana. Contiene el péptido de fusión (FP), la repetición heptada 1 (HR1), la hélice central (CH), el dominio conector (CD), la repetición heptada 2 (HR2) y el dominio transmembrana (TM). Tiene dos sitios de clivaje, uno en el límite S1/S2 (R685) y el segundo en S2' (R815). Los HR se trimerizan para formar una estructura enrollada y arrastran la envoltura del virus, así como la bicapa de la célula huésped, a una proximidad cercana, lo que facilita su fusión. En el límite de las subunidades S1 y S2, está presente un sitio de escisión de furina (RRAR). Este sitio distingue el SARS-CoV-2 del SARS-CoV y otros CoV. Otra característica notable del SARS-CoV-2 es la adición de un residuo de prolina al comienzo del sitio de escisión de furina (Wrapp *et al.*, 2020).

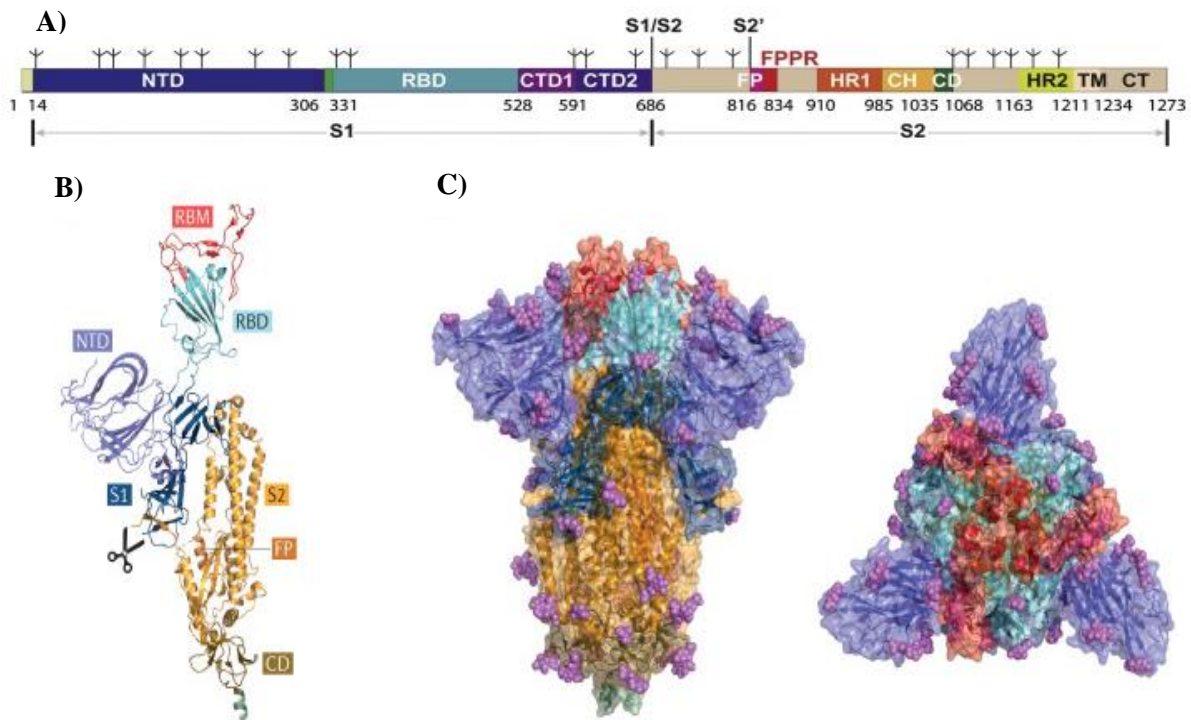


Figura 7. Organización de la proteína S. **A)** representación esquemática de la proteína S del virus SARS-CoV-2, con flechas negras en la parte inferior se esquematizan las subunidades S1 y S2. En la Subunidad S1 del aminoácido 14 al 306 el NTD: Domain, del 331 al 518 el Receptor Binding Domain (RBD), del 528 al 591 el CTD 1y del 591 al 686 el CTD2. En el subdominio S2 Tomado y modificado de Zhang *et al.*, 2021.1 2020 4.**B)** monómero de la proteína S, que muestra un dominio de unión al receptor (RBD), expuesto de manera vertical. **C)** Estructura de la proteína S con conformación cerrada vista de manera vertical del lado izquierdo, y una vista ortogonal del lado derecho. Los dominios están coloreados como en el panel B. Tomado y modificado de Harvey *et al.*,2022.

3.7 Mutaciones

Una mutación es una variación espontánea o inducida en el genoma, que genera un cambio permanente y heredable en la secuencia del ADN, en nucleótidos, o bien en la disposición del ADN en el genoma (Salazar *et al.*, 2020).

Las mutaciones puntuales ocurren en un par de bases o en un número reducido de bases adyacentes y puede deberse a modificaciones químicas del ADN que cambian una base nitrogenada por otra (Salazar *et al.*, 2020). Las mutaciones importantes para este estudio son las sustituciones y las deleciones, las primeras hacen referencia a una secuencia de ADN en la cual se cambia un nucleótido por otro; por ejemplo, el cambio de un nucleótido de citosina por uno de timina. Mientras que las mutaciones por pérdida de nucleótidos o deleciones, se produce cuando en una secuencia de ADN se pierde un nucleótido y no se sustituye por ningún otro, por lo que se modifica el marco de lectura abierto y, a partir de la mutación, la secuencia de nucleótidos (Salazar *et al.*, 2020).

3.8 Mutaciones en el genoma viral y evolución del SARS-CoV-2

Se ha propuesto que la sustitución de nucleótidos es uno de los mecanismos más importantes de evolución viral (Lauring y Andino., 2010). Generalmente estas sustituciones en los virus de ARN son rápidas, lo cual conduce a la acumulación de sustituciones de aminoácidos, lo que podría afectar el tropismo celular, la patogenicidad y transmisibilidad (Giovanetti *et al.*, 2020). Se propone que este mecanismo de sustitución genera cuasiespecies, es decir un número determinado de variantes que están genéticamente ligadas (Lauring y Andino 2010). Todos los virus, incluido el SARS-CoV-2 evolucionan con el tiempo, sin embargo, este virus presenta un mecanismo de corrección genético, debido a la presencia de una proteína no estructural (nsp14) con actividad exoribonucleasa (Eckerle *et al.*, 2007). Por ello su tasa de mutación es más baja en comparación de otros virus de ARN como el VIH-1 o la Influenza A (Choi *et al.*, 2021). De acuerdo con lo reportado por Grupta *et al.*, 2021 la tasa de mutación del virus SARS- CoV-2 es cerca de dos mutaciones por mes, aunado con la diseminación viral crónica produjo virus con múltiples mutaciones.

3.9 Variantes del virus SARS-CoV-2 y su nomenclatura

El virus SARS-CoV-2 ha evolucionado de manera continua, lo cual ha provocado la aparición de diferentes variantes alrededor del mundo. El organismo encargado de su clasificación y seguimiento es el Grupo Interagencial del SARS-CoV-2 (SIG) el cual las clasifica en variantes bajo monitoreo (VBM), variantes de interés (VOI), variantes de preocupación (VOC) y variantes de gran consecuencia (VOHC) tomando en cuenta características tales como la cantidad y ubicación de las sustituciones en el genoma que puedan afectar tanto los tratamientos de la enfermedad COVID-19, como también la transmisibilidad y reemplazo de otras variantes (CDC., 2021).

Para nombrar los diferentes linajes del SARS-CoV-2 los investigadores utilizan sistemas de nomenclatura por GISAID, Nextstrains y Pango, sin embargo, estos son nombres científicos complicados de transmitir a la población, por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el uso de letras del alfabeto griego, para nombrarlas. En este sentido los nombres de las variantes de preocupación son:

- Variante Delta o B.1.617.2 primer informe en India el Diciembre del 2020.
- Variante Alfa o B.1.1.7 se reportó primera vez en el Reino Unido a finales de diciembre del 2020.
- Variante Gama o P.1 se informó por primera vez en Brasil a principio de enero del 2021.
- Variante Beta o B.1.351 se informó por primera vez en Sudáfrica en diciembre del 2020.

3.9.1 Nomenclatura PANGO

Se han identificado tres variantes centrales (A, B y C) (Cuadro 3) del virus actual que difieren en su secuencia de aminoácidos. El tipo A ancestral y el tipo C mutado se encuentran en proporciones significativas fuera del este de Asia, principalmente en Europa y en el Estados Unidos. Por otra parte, el tipo B que ha mutado y se ha extendido es el más común en el este de Asia (Forster *et al.*, 2020).

Sin embargo, durante el transcurso de la pandemia surgieron más linajes virales, los cuales deben ser monitoreados de manera exhaustiva lo que dificulta el asignarles una nomenclatura adecuada. Para ello, se desarrolló una herramienta de comandos y una aplicación web de nombre pangolín la cual tiene como objetivo implementar una nomenclatura dinámica de los linajes del SARS-CoV-2. La aplicación web fue desarrollada por el Centro de Vigilancia Genómica de Patógenos, por otro lado, la herramienta de línea de comandos es un software de código abierto disponible bajo la Licencia Pública General GNU v3.0 (O'Toole *et al.*, 2021).

Cuadro 3. Características de los principales linajes PANGO (Tomado y modificado de: (O'Toole *et al.*, 2021).

LINAJE	PAISES MAS COMUNES	FECHA DE REPORTE	DESCRIPCIÓN
A	Estados Unidos de América 32,0 %, Emiratos Árabes Unidos 11,0 %, China 8,0 %, Alemania 7,0 %, Canadá 4,0 %	2019-12-30	Uno de los dos haplotipos originales de la pandemia (A y B). Muchas secuencias originarias de China y muchas exportaciones globales.
B	Estados Unidos de América 38,0%, Reino Unido 19,0%, China 7,0%, México 6,0%, Alemania 4,0%	2019-12-24	Uno de los dos haplotipos originales de la pandemia (y el primero en ser descubierto)
C	Sudáfrica 95,0 %, Zambia 3,0 %, Estados Unidos de América 1,0 %, Mozambique 0,0 %, Botswana 0,0 %	2020-04-16	Alias de B.1.1.1.1

LINAJE	PAISES MAS COMUNES	FECHA DE REPORTE	DESCRIPCIÓN
P.2	Brasil 59,0%, Estados Unidos de América 23,0%, Canadá 4,0%, Argentina 2,0%, Paraguay 2,0%	2020-04-13	linaje brasileño

3.9.2 Variantes de preocupación (VOC)

A partir del 15 de septiembre de 2021 se designaron cuatro linajes de SARS-CoV-2 como VOC (variantes alfa, beta, gamma y delta) (Figura 8).

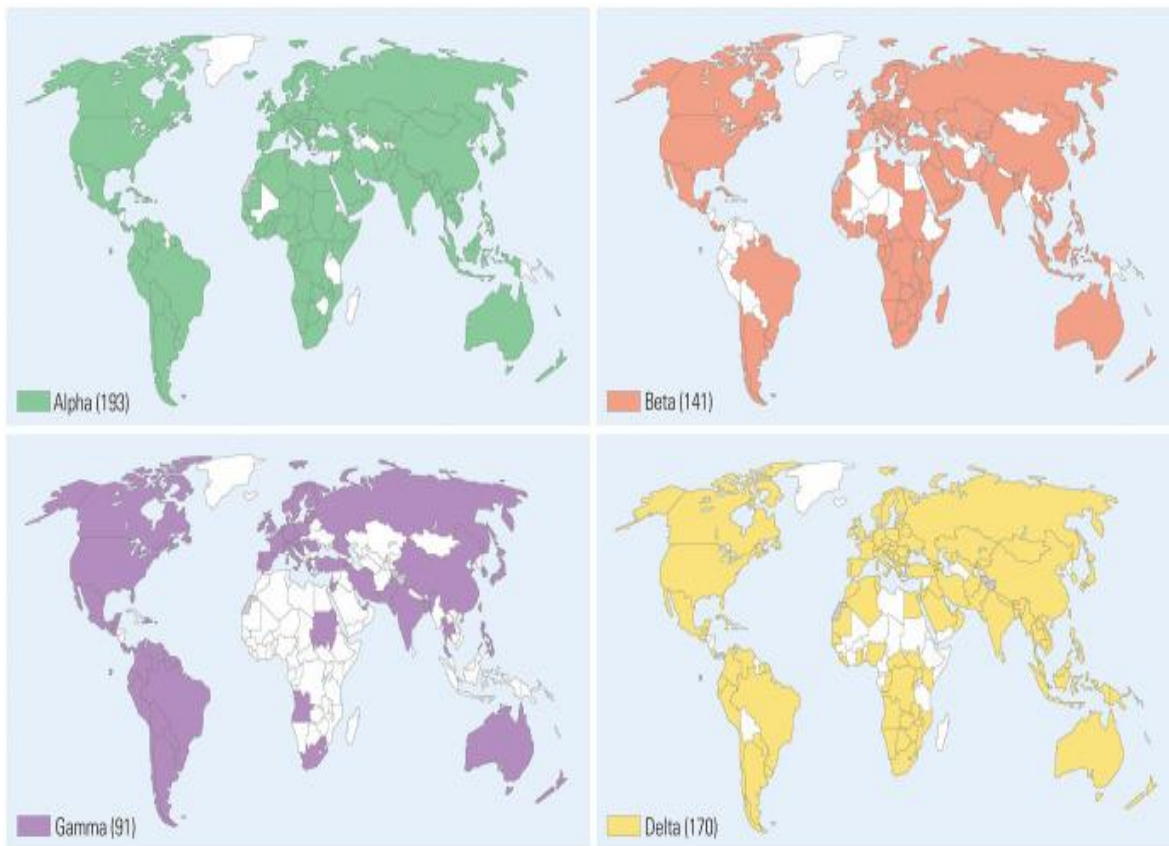


Figura 8. Regiones en las que se han informado variantes de preocupación (31 de agosto del 2021). Entre paréntesis, el número de países en las que se han encontrado dichas variantes. Tomado de Choi *et al.*, 2021.

3.9.5 Variante Gamma (P.1)

El linaje P.1 (Figura 11) corresponde a la variante gamma según la nomenclatura de la OMS. Se detectó por primera vez en cuatro viajeros que regresaban a Japón desde el estado de Amazonas en Brasil el 2 de enero de 2021. Incluye las mutaciones L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I y V1176F en la proteína S. En cuanto a la infectividad y la gravedad de la enfermedad, provocó un aumento abrupto en el número de hospitalizaciones y muertes por COVID-19 en Manaus, Brasil (CDC., 2021).

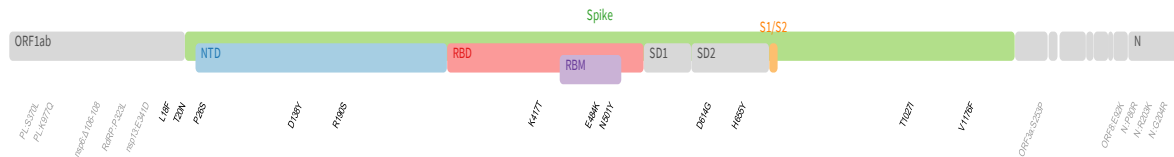


Figura 11. Estructura genómica de la variante Gamma, tomado de: Tzou., *et al* 2022.

3.9.6 Variante Beta (B.1.351)

La variante beta (Figura 12) incluye nueve mutaciones L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G y A701V en la proteína S, de las cuales tres mutaciones (K417N, E484K y N501Y) se encuentran en el RBD. La sustitución N501Y también se identificó en la variante alfa en el Reino Unido, y se ha demostrado previamente que la mutación mejora la afinidad de unión a ACE2 humana (CDC., 2021).

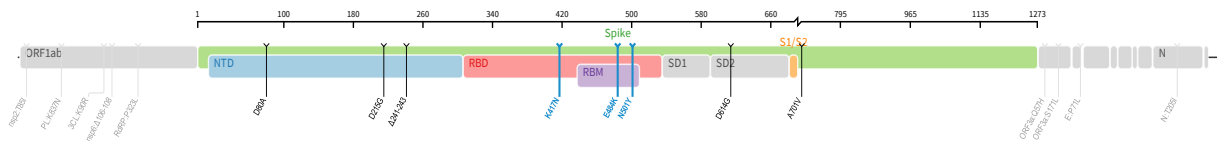


Figura 12. Estructura genómica de la variante Beta, tomado de: Tzou., *et al* 2022.

3.10 Métodos de detección de variantes del virus SARS-CoV-2

La aparición de variantes más transmisibles y/o más virulentas del SARS-CoV-2 ha desencadenado una vigilancia genómica intensiva que es costosa y difícil de mantener a largo plazo (Wang *et al.*, 2021) La detección de variantes del SARS-CoV-2 se basa predominantemente en la secuenciación de Sanger o la secuenciación de próxima generación (NGS) que requieren mucha mano de obra y un largo tiempo periodo de tiempo para obtener resultados. Sin embargo, el esfuerzo de secuenciación está muy sesgado, con ocho naciones principales contribuyendo a este esfuerzo, con más de 10 000 genomas secuenciados de cada uno y habiendo informado 82 % de todas las secuencias a nivel mundial (Tsui *et al.*, 2022). En contraste con la secuenciación, los enfoques basados en PCR han sido un enfoque más simple para estudiar COV específicos. Una prueba diagnóstica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) disponible comercialmente, se ha convertido en una prueba útil basada en PCR para rastrear la variante Alfa (B.1.1.7). Esto fue posible gracias al descubrimiento de que una delección (H69-V70) en la proteína Spike (S) resultó en una falla de amplificación del gen S (SGTF), mientras que la amplificación del objetivo de la nucleocápside (N) y el marco de lectura abierto (ORF) 1ab no se vieron afectados. (Thomas *et al.*, 2021).

La RT-qPCR (Figura 13) puede servir como un método rentable y rápido para monitorear la prevalencia de variantes mediante la amplificación de mutaciones características. En este sentido, en dicha detección es particularmente importante la región RBD, ya que se cree que esto determina la infectividad del SARS-CoV-2 Sin embargo, además de confirmar los resultados de la vigilancia basada en RT-qPCR, la NGS sirve para monitorear la aparición y la dinámica de nuevas variantes del SARS-CoV-2, así como la presencia de mutaciones clave, como E484K, presente en los linajes Beta (B.1.351) y Gamma (P.1) (Thomas *et al.*, 2021).

Aunque se han desarrollado varios ensayos de detección, persisten los desafíos diagnósticos, especialmente de las cepas variantes recién surgidas. Un ensayo preciso y sensible para la detección y diferenciación de las variantes, con un tiempo de respuesta rápido, puede servir como una importante herramienta de salud pública para el rastreo de variantes y las investigaciones epidemiológicas. (Thomas *et al.*, 2021).

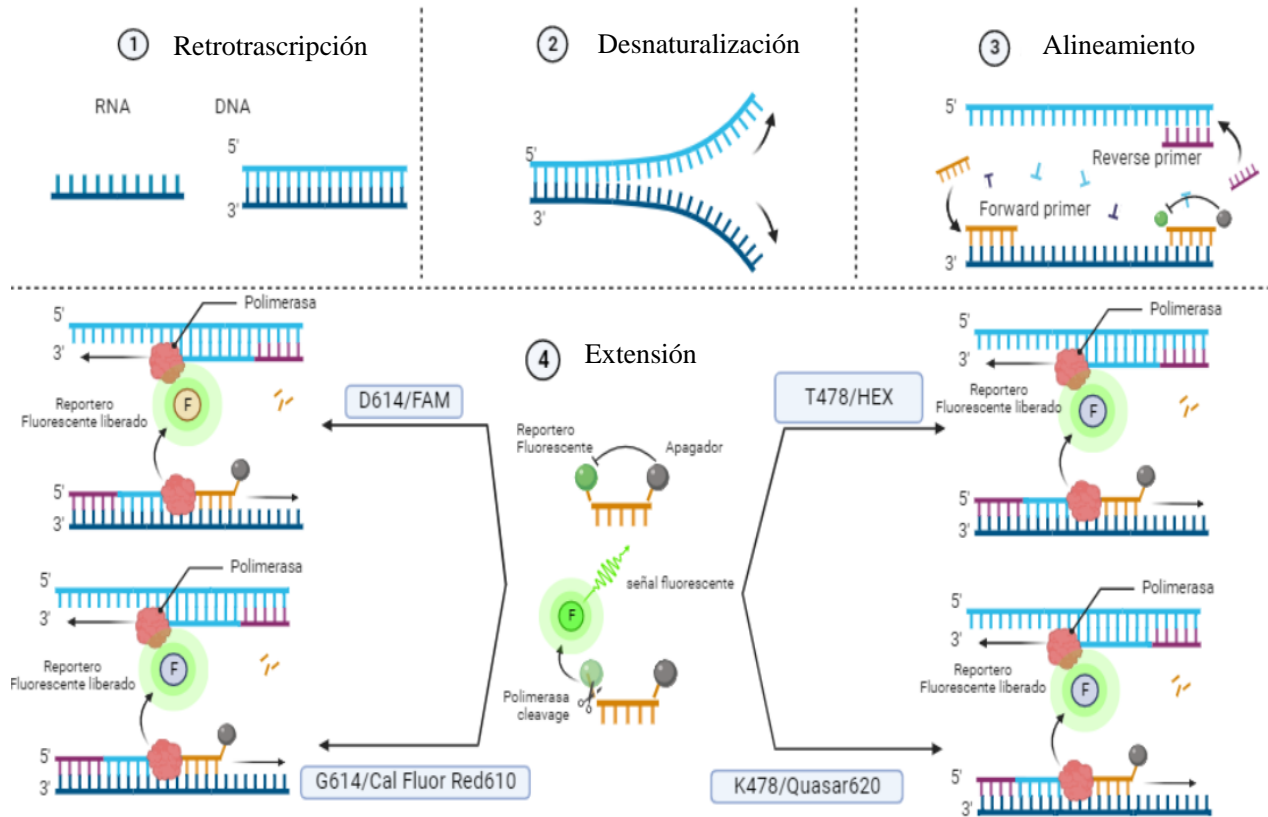


Figura 13. Ensayo de detección de mutaciones en el gen S del virus SARS-CoV-2. **1)** Retrotranscripción, en este paso la enzima retrotranscriptasa inversa va a sintetizar una cadena de ADN partiendo de una cadena molde de RNA vira. **2)** Desnaturalización, este paso consiste en dos etapas, la desnaturalización inicial para inactivar la polimerasa y una segunda desnaturalización para abrir la cadena de ADN recién sintetizada. **3)** Alineamiento, en este paso se alinean los primers (Forward y Reverse) a la cadena molde a la vez que se acopla la sonda a la región de interés. **4)** Extensión. La DNA polimerasa amplificara la región e hidrolizara la sonda, separándola del apagador y emitiendo de esta manera una señal fluorescente dependiendo de la secuencia de nucleótidos que hayan sido reconocidos por la sonda fluorescente.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acumulación de mutaciones en el genoma del virus SARS-CoV-2 han conducido a la generación de variantes de preocupación (VOC), las cuales repercuten en la transmisibilidad y gravedad de la enfermedad COVID-19. En este sentido es indispensable establecer un mejor seguimiento de dichas variantes, sin embargo, los métodos de detección son costosos y difíciles de mantener durante el transcurso de la pandemia, por ello esta investigación se centra en la identificación de mutaciones en el gen que codifica para la proteína S por métodos de RT-qPCR, y correlacionar dicha mutación para dar una identificación preliminar de la variante viral.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se espera que al identificar las mutaciones presentes en el gen S del virus SARS-CoV-2 se podrá distinguir la variante de manera preliminar y correlacionarla con los datos clínicos de los pacientes no vacunados, para determinar la posible gravedad de la enfermedad COVID-19.

6. JUSTIFICACIÓN

La acumulación de mutaciones en el genoma del virus SARS-CoV-2 han conducido a la generación de variantes de preocupación (VOC), las cuales repercuten en la transmisibilidad y gravedad de la enfermedad COVID-19. En este sentido es indispensable establecer un mejor seguimiento de dichas variantes, sin embargo, los métodos de detección son costosos y difíciles de mantener durante el transcurso de la pandemia, por ello esta investigación se centra en la identificación de mutaciones en el gen que codifica para la proteína S por métodos de RT-qPCR, y correlacionar dicha mutación para dar una identificación preliminar de la variante viral.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Identificar mediante RT-qPCR las mutaciones D614G, T478K, P681H, T732A, K417N, N501Y, E484K, E484Q, L452R y del 69/70 presente en el gen S del virus SARS-CoV-2 de los pacientes no vacunados con enfermedad grave y moderada de COVID-19.

7.2 Objetivos Particulares

- 1.- Identificar la presencia del virus SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR en los pacientes con sintomatología respiratoria asociada a COVID-19.
- 2.- Realizar una base de datos de los pacientes positivos a SARS-CoV-2, clasificándolos en moderados y graves de acuerdo con sus características clínicas.
- 3.- Identificar mediante RT-qPCR las mutaciones D614G, T478K, P681H, T732A, K417N, N501Y, E484K, E484Q, L452R y del 69/70 de los pacientes de los grupos moderados y graves.
- 4.-Correlacionar las mutaciones encontradas en el gen S del virus SARS-CoV-2, para identificar de manera preliminar las variantes Alfa, Beta, Gamma, Delta, Kappa, Épsilon, Eta, Iota, P.2, B.1.1.222, B.1.1.519 y B.1.
- 5.- Contrastar los datos clínicos para entender las posibles causas de la gravedad de la enfermedad en la población mexicana.

8. METODOLOGÍA

8.1 Población de Estudio

Se tomaron hisopados nasofaríngeos de pacientes con síntomas respiratorios asociados a COVID-19 en el HRAEI de abril del 2020 a julio del 2021.

8.1.1 Criterio de inclusión

- Pacientes con sintomatología respiratoria asociada a COVID-19 tales como: Tos, dolor de cabeza, fiebre, etc.
- Pacientes mayores de 18 y hasta 94 años de sexo indistinto.

8.1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con enfermedades oncológicas o hematológicas.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con inmunodeficiencias (VIH, trasplantes recientes).

8.2 MATERIAL Y METODO

8.2.1 Toma de muestra

Se realizaron hisopados nasofaríngeos de pacientes con síntomas relacionados a la enfermedad COVID-19 tales como: Dolor de cabeza, fiebre, tos, etc. Para ello se siguió el protocolo de toma de muestra recomendado por el INDRE (Figura 14). Se colocó el equipo de protección personal completo, y se sugirió al paciente la posición que debe adoptar para ingresar el hisopo adecuadamente, se recuperó la muestra y se colocó en tubo falcón con capacidad de 15 mL con 2 mL de medio de transporte Universal (Véase Anexo 1).

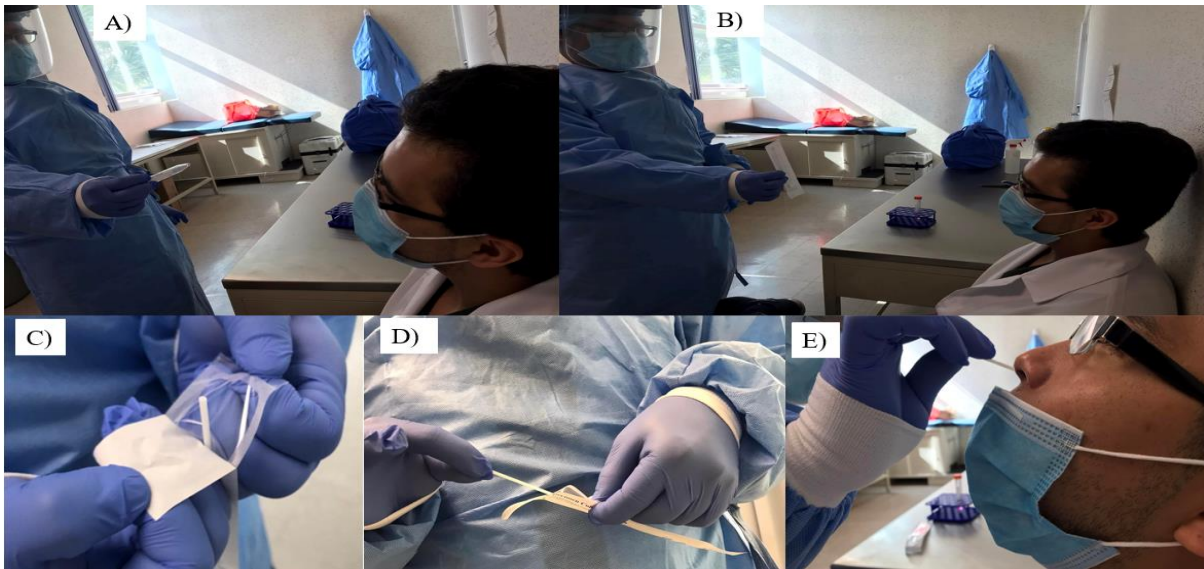


Figura 14. Procedimiento de toma de muestra por hisopado nasofaríngeo. **A)** Se corroboran los datos del paciente. **B)** Se le indica al paciente que todo el material utilizado está limpio y estéril. **C)** Abrir el hisopo por la parte inferior del empaque cuidando de no tocar el área que será introducida en la fosa nasal u bucal del paciente. **D)** Retirar el hisopo con cuidado tomándolo del extremo. **E)** Indicarle al paciente la posición que debe tomar, inclinando su cabeza y descubriéndose su nariz, introducir el hisopo aproximadamente cinco centímetros dentro de la fosa nasal y posteriormente girar de 3 a 5 veces en dirección a las manecillas del reloj, retirar el hisopo y colocarlo en el medio de transporte universal para su posterior extracción de ácidos nucleicos.

8.2.2 Extracción de Ácidos Nucleicos

La extracción de ARN viral se realizó, con el equipo de protección completo personal (EPP) completo de acuerdo con las especificaciones del INDRE y en una campana de bioseguridad vertical clase II, bajo condiciones de esterilidad. Se siguieron las especificaciones del Kit de extracción de Fast-Gene (Nippon Genetics, Alemania No. Cat: FG-80006), el cual consiste en la obtención del material genético a través del método de columnas de separación. Para dicha extracción, después de la obtención del hisopado nasofaríngeo en 2 mL medio de transporte universal en un tubo Falcon de 15 mL, rotulado con los datos del paciente (nombre, edad y fecha de nacimiento) se dio un vortex a la muestra por 5 segundos, se colocaron 300 uL de muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregó 500 μ L de buffer de lisis posteriormente se dio vortex a la muestra por 5 segundos para homogeneizarla, se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 700 μ L de Buffer de unión, se transfirió la muestra una columna de separación y se centrifugo a 8,000

rpm x 1 min, este paso se realizó dos veces, para los lavados se colocaron 500 μ L de Buffer de lavado y se centrifugo a 8000 rpm se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 uL de Buffer de lavado 2, para el secado se centrifugo la muestra a 14,000 rpm x 1 min, la elución se realizó con 50 μ L de agua libre de nucleasas y se centrifugo a 8,000 rpm x 1min, posteriormente el material genético se almaceno a -80°C hasta su uso.

8.2.3 Detección molecular del virus SARS-CoV-2

8.2.3.1 Amplificación mediante RT-qPCR

La amplificación del material genético se realizó, utilizando el protocolo de RT-qPCR siguiendo las especificaciones del Kit COVID-19 Real Time Multiplex RT-PCR de LabSystems Diagnostics (LabSystems Diagnostics, Finlandia No. Cat: 8100512) el cual amplifica cuatro genes, tres de ellos virales, nucleocápside N, E, ORF 1ab, y uno de control interno la RNAsa P. Para ello en microtubos para PCR (Thermo Fisher Scientific, U.S.A. No Cat: AB1182). Se colocaron 13 μ L de Reaction Mix master A y 4 μ L de Probe B Probe Mix, posteriormente se adicionaron 8 μ L de muestra para cada tubo, se configuro el ciclado y los canales en un termociclador CFX-96TM BioRad (Bio-Rad, U.S.A Modelo: C1000 Thermal Cycler) de acuerdo con el protocolo del proveedor (Véase cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Ciclos de amplificación para la detección molecular del SARS-CoV-2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Proceso
45°C	20min	1	Retrotranscripción
95°C	3min	1	Desnaturalización inicial
95°C	15sec	45	Desnaturalización
63°C	30sec		Alineamiento/ extensión

Cuadro 5. Fluoroforos y genes blancos para la detección molecular del SARS-CoV-2.

Fluoroforos	Gen Blanco
FAM	E
HEX	ORF1ab
Texas Red	N
CY5	RNAsaP (Control Interno)

8.2.3.2 Análisis de las curvas de amplificación para la detección del virus SARS-CoV-2.

Para determinar el resultado de la detección molecular del virus SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, es necesario que las curvas de amplificación (Figura 15) cumplan con ciertas características, tales como la amplificación de los genes utilizados para determinar la presencia viral (gen E, ORF 1ab y N) así como también la amplificación del control interno (RNAsa P), con unidades de fluorescencia ≥ 100 .

La figura 15 muestra un resultado positivo de detección molecular para el virus SARS-CoV-2. Es importante destacar la amplificación de los cuatro canales de fluorescencia lo que indica la presencia de los genes blanco-necesarios para el diagnóstico N, E, ORF1ab y el control interno RNAsa P, por lo cual se puede interpretar la presencia de partículas virales del SARS-CoV-2. En cambio, si solo se detectaba la amplificación de RNAsa P la muestra se determinaba como negativa para SARS-CoV-2.

8.2.4 Detección de mutaciones e identificación de variantes virales

Se realizó una segunda amplificación utilizando los Kits master mut 6 y master mut SARS-CoV-2 (GENES2LIFE, México, Ref: M41G2LVM y G2LMSC-14) para identificar aquellas muestras que presentaban mutaciones D614G, T478K, P681H, T732A, K417N, N501Y, E484K, E484Q, L452R y del 69/70. Para ello se siguió el protocolo del fabricante el cual divide la detección de las mutaciones en ensayos independientes.

Se descongelaron los Primers Mix y el Buffer StarQ 5X y se colocaron en una gradilla fría (2-8°C), se realizó el cálculo para las reacciones necesarias (Cuadro 7) ($R_x = n+3$, donde n es

el número de muestras a analizar más dos reacciones para control y una reacción de exceso), una vez realizado dicho calculo se procedió con la preparación de la Master Mix y se dispense en los microtubos para qPCR (Thermo Fisher Scientific, U.S.A. No Cat: AB1182).

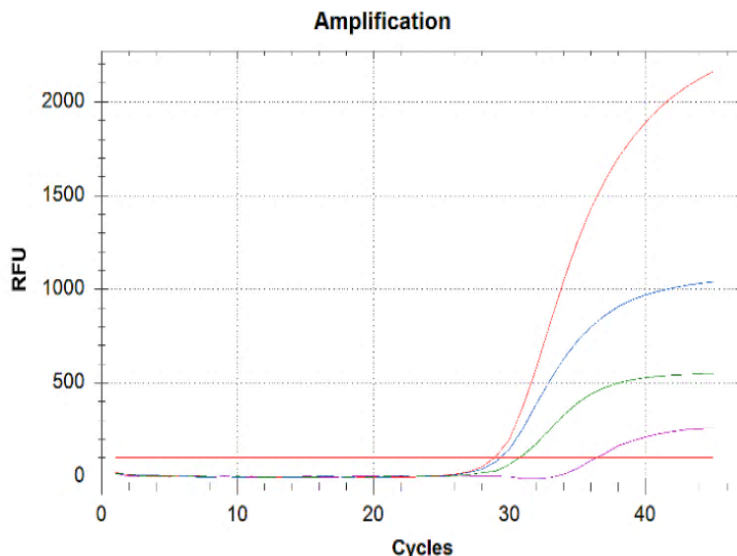


Figura 15. Resultado positivo para la detección molecular del virus SARS-CoV-2. Se observa la emisión de la fluorescencia para los canales Cy5 (Control Interno- RNAsa P), FAM (gen E), HEX (ORF1ab) y Texas Red (gen N).

Cuadro 7. Preparación de la Master Mix para la PCR (Tomado y modificado de master mut 6 y master mut SARS-CoV-2 (GENES2LIFE)).

Componente	Volumen por reacción
Enzima StarQ	0.5 µL
Buffer StarQ 5X	4 µL
732 primer Mix	2 µL
Agua libre de nucleasas	8.5 µL
Muestra*	5 µL
Volumen total	20 µL

*La muestra se agregó después de dispensar la Master Mix en cada microtubo para PCR.

Una vez preparadas las reacciones, se programó en un termociclador CFX-96™ BioRad (Bio-Rad, U.S.A Modelo: C1000 Thermal Cycler protocolo de amplificación recomendado por el fabricante (Véase Cuadro 8).

Cuadro 8. Protocolo de termociclado para los KITS MASTER MUT 6 y MASTER MUT SARS-CoV-2 (Tomado y modificado de master mut 6 y master mut SARS-CoV-2 (GENES2LIFE).

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 minutos	50°C
1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95°C
40	Desnaturalización	15 segundos	95°C
	Alineamiento	10 segundos	58°C
	Extensión (lectura de datos)	30 segundos	66°C

La detección de las sustituciones consiste en un ensayo con 4 sondas fluorescentes (Figura 16) que se analizan en dos etapas independientes para cada una de las mutaciones. Para la sustitución T478K se utilizaron dos sondas, una marcada con HEX que detecta la secuencia original marcada en la posición 478 y otra marcada con Quasar 670 que hibrida con las secuencias virales que tienen la mutación T478K. mientras que para la detección D614G se utiliza una sonda marcada con FAM que detecta la secuencia original en la posición 614 y la última sonda marcada con Cal Flúor Red 610 que hibrida con la secuencia que tiene la mutación D614G (Véase cuadro 10 para el resto de las mutaciones).

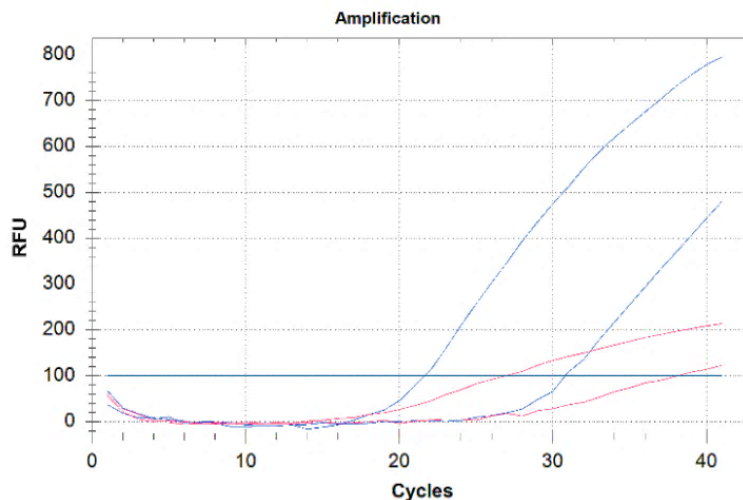


Figura 16. Resultado positivo para las mutaciones D614G, T478K, P681H y T732A. marcadas en los canales Cal Red 610 y Quasar 670 en las reacciones de MASTER-MUT 6.

Posteriormente se correlacionaron las mutaciones amplificadas para la identificación preliminar de las variantes Alfa, Beta, Gamma, Delta, Kappa, Épsilon, Eta, Iota, B.1.1.519, B.1.1.222, y P.2 de acuerdo con las especificaciones de los kits de detección (cuadro 10).

8.2.5 Base de datos

8.2.5.1 Recopilación de datos clínicos

Se reviso el expediente electrónico de cada paciente con la plataforma de SALUDNESS con la finalidad de recopilar la información relevante para el estudio incluyendo los datos de verificación personal: información de contacto, nombre, edad, fecha de diagnóstico, síntomas, días de evolución, Dímero D, saturación de oxígeno, datos de Biometría Hemática: leucocitos totales y porcentaje de eosinófilos. A si como también se incluyó información referente a posibles comorbilidades en las cuales se incluyeron las siguientes: diabetes mellitus tipo II, enfermedad renal crónica, obesidad, hipertensión arterial secundaria, lupus eritematoso sistemático, posteriormente se agruparon a los pacientes en moderados o graves siguiendo criterios como (Cuadro 9) SaO₂ (Gandhi *et al* 2020), días de hospitalización, requerimiento de oxígeno, etc.

Cuadro 9. Criterios para la agrupación de pacientes positivos a COVID-19 en el HRAEI, en el periodo de abril del 2020 a julio del 202.

Pacientes Hospitalizados con enfermedad moderada	Pacientes Hospitalizados con enfermedad grave
Pacientes que acudieron a realizarse prueba de PCR con resultado positivo y pacientes hospitalizados.	Hospitalizados en *UCI o en Urgencias COVID con ventilación mecánica invasiva
CORADS < 3	CORADS ≥ 3
*SaO ₂ ≥ 90%	*SaO ₂ ≤ 80%

*UCI: Unidad de cuidados Intensivos, SaO₂: Saturación de oxígeno.

8.2.4 Análisis de datos

Con la información recopilada de la plataforma de SALUDNESS, se realizó una correlación de las características clínicas (edad, sexo, diabetes Mellitus, obesidad, hipertensión, etc.) con los resultados obtenidos de la identificación preliminar de cada variante (Alfa, Beta, Gamma, Delta, Kappa, Épsilon, Eta, Iota, P.2, B.1.1.222, B.1.1.519 y B.1) Por último, se realizó un análisis estadístico con “*t*”-student, y ANOVA para las variables cuantitativas (Dímero D, conteo de leucocitos totales, porcentaje de eosinófilos, etc.) mientras que para las variables cualitativas (sexo, comorbilidades, etc.) se realizó una prueba de Xi cuadrada.

METODOLOGIA

Cuadro 10. Correlación entre la mutación en el gen S del virus SARS-CoV-2 y la variante identificada de manera preliminar (Tomado y modificado de: GENES2LIFE).

MASTER MUT SARS-CoV-2								MÁSTER MUT 6				Identificación Preliminar
REACCIÓN MUT 1				REACCIÓN MUT 2				REACCIÓN MUT 6				
FAM	HEX	Cal Fluor Red 610	QUASAR 670	FAM	HEX	Cal Fluor Red 670	QUASAR 670	Cal Fluor Red 610	Quasar 670	Quasar 670	Cal Fluor Red 610	
L452R	DEL 69/70	T732A	T478K	K417N	N501Y	E484K	E484Q	T732A	P681H	T478K	D614G	
N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+	-	-	-	-	N/A
+	+	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	N/A
-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	Alfa (B.1.1.7)
-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	Beta (B.1.351)
-	-	-	-	V*	+	+	-	-	-	-	+	Gamma (P.1)
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Delta (B.1.617.2)
+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Kappa (B.1.617.1)
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Épsilon (B.1.427)
-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Eta (B.1.525)
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Iota (B.1.526)
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	B.1.1.222.
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Zeta (P.2)
-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Mexicana (B.1.1.519)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	B.1

V*: Presente solo en algunos virus de este linaje. Entre paréntesis se especifica el linaje PANGO. Recuadro azul: Mutaciones en el gen S del virus SARS-CoV-2 positivas para cada variante.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se diagnosticaron a 250 pacientes con sintomatología respiratoria como fiebre, tos, mialgia, artralgia, rinorrea, cefalea, etc, asociada a COVID-19, de abril 2020 a julio del 2021 de los cuales el 89.2% (223/250) fueron positivos y el 10.8 % negativo, a la infección por el virus SARS-CoV-2 (Figura 16). Posteriormente se seleccionaron aquellas muestras que tuvieran un $CT \leq 30$ (158), de los cuales el 51.89% (n=82) fueron hombres, mientras que el 48.11% (n=76) fueron mujeres (Figura 17 y cuadro 10). Lo cual concuerda con lo reportado actualmente en el seguimiento realizado por el CONACYT y el gobierno de México, donde se establece que el 53.22% de casos positivos para la población masculina con respecto al 46.88% correspondiente a la población femenina.

En este sentido, los resultados obtenidos también reflejan el periodo de la pandemia en la que se llevó a cabo el muestreo ya que el “Comunicado Técnico Diario COVID-19 en MÉXICO” de la Secretaria de Salud, del 30 de abril del 2020 en la república mexicana se registraron 19,224 casos, siendo la Ciudad de México y el Estado de México las entidades con más casos positivos (>3000).

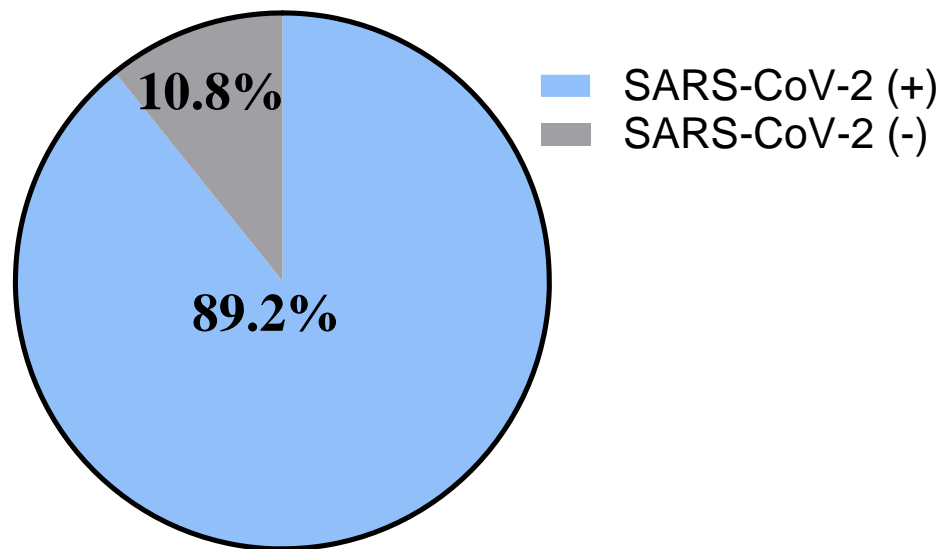


Figura 17. Porcentaje de pacientes positivos y negativos para la detección molecular del virus SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR.

También es importante mencionar que, de acuerdo con Acosta *et al.*, 2021 dentro del Estado de México, los municipios conurbados del Área Metropolitana del Valle de México (AMVM) son los que presentaron mayor cantidad de contagios. Lo que se refleja con la tasa de positividad de nuestros resultados, pues el municipio donde se encuentra ubicado el HRAEI, pertenece a los AMVM.

Con respecto a las edades, la media de los pacientes masculinos fue de 47.9 ± 14.6 con un mínimo de 22 y máximo de 82. Mientras que para las mujeres la media de edad fue de 52.5 ± 16.3 un valor mínimo de 22 y máximo de 91. Para representar lo anterior se realizó una pirámide poblacional (Véase Figura 18) con rangos de edad de 5 años. Es importante destacar, la mayor frecuencia tanto para pacientes masculinos fue de 30 a 35 ($n=12$), mientras que para los femeninos de 30 a 35 y de 65 a 70 ($n=10$). En relación con lo anterior, una investigación reportada por (Ascencio-Montiel *et al.*, 2022) menciona una tasa de incidencia más alta en personas de 40 a 59 años, durante las primeras dos oleadas epidémicas. Por otra parte, el CONACYT a través de su Tablero Oficial de Datos Covid-19 del Gobierno de México” menciona una mayor incidencia de casos positivos a COVID-19 en hombres y mujeres de 25 a 29 años. Las diferencias del rango de edad con mayor incidencia, entre estas investigaciones pueden deberse al periodo epidémico en el cual se recabaron las muestras, pues el tablero oficial de datos COVID-19 recaba información de casos positivos durante toda el transcurso de la pandemia, sin hacer distinción entre oleadas epidemiológicas,

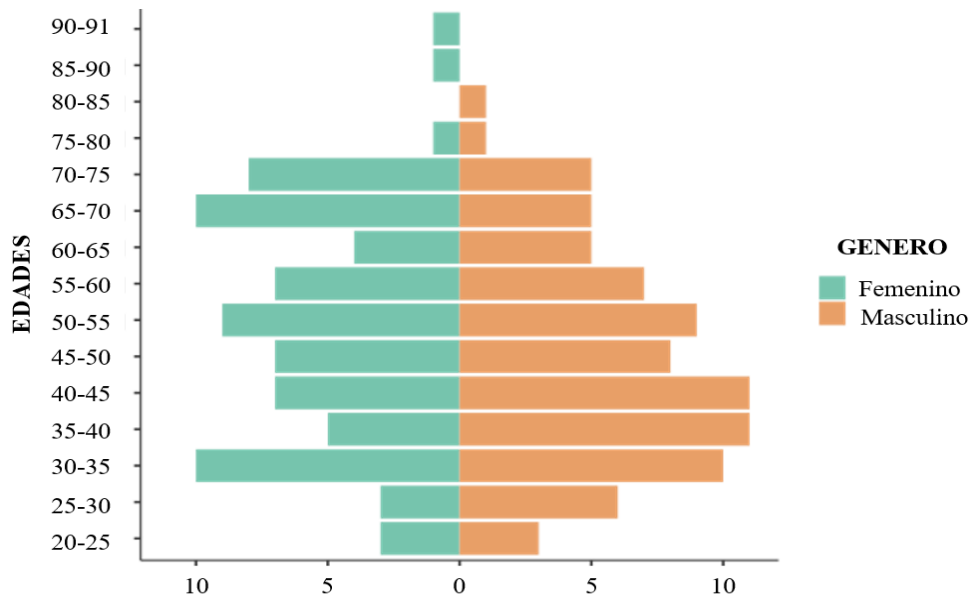


Figura 18. Pirámide poblacional de los pacientes COVID-19 positivos por grupo de edad en intervalos de 5 años, separados por sexo (Femenino y Masculino).

mientras que la investigación realizado por (Ascencio-Montiel *et al.*, 2022) analiza los casos confirmados de COVID-19 por laboratorios del Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Línea (SINOLAVE) desde el 29 de marzo de 2020 hasta el 27 de agosto de 2022, por otra parte, que nuestro estudio abarca las fechas de abril del 2020 a Julio del 2021.

Sobre la posible relación entre la gravedad de la COVID-19 y el sexo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.524$) al realizar una prueba de χ^2 con intervalo de confianza del 95% entre los pacientes graves masculinos y femeninos (Véase cuadro 10 y Figura 19). En este sentido, diversas investigaciones sugieren un desequilibrio en la gravedad de la enfermedad entre los sexos (Alwani *et al.*, 2021) refiriendo una mayor tasa de mortalidad en hombres.

Dichas investigaciones, atribuyen explicaciones multifactoriales a este efecto, por ejemplo, una expresión mayor de la proteína TMPRSS2 en las células epiteliales bronco-alveolares en los hombres en comparación con las mujeres (Asselta., *et al* 2020), por otro parte, existe evidencia que muestra que las mujeres difieren en su reconocimiento y respuesta innata a las infecciones virales, y desarrollan una mayor respuesta inmune inflamatoria y humoral, como resultado, tanto la prevalencia como la intensidad de las infecciones virales suelen ser menores para las mujeres (Alwani *et al.*, 2021). Sin embargo, los resultados de la presente investigación no reflejan estas diferencias, por lo que es necesario complementar estos resultados con más estudios.

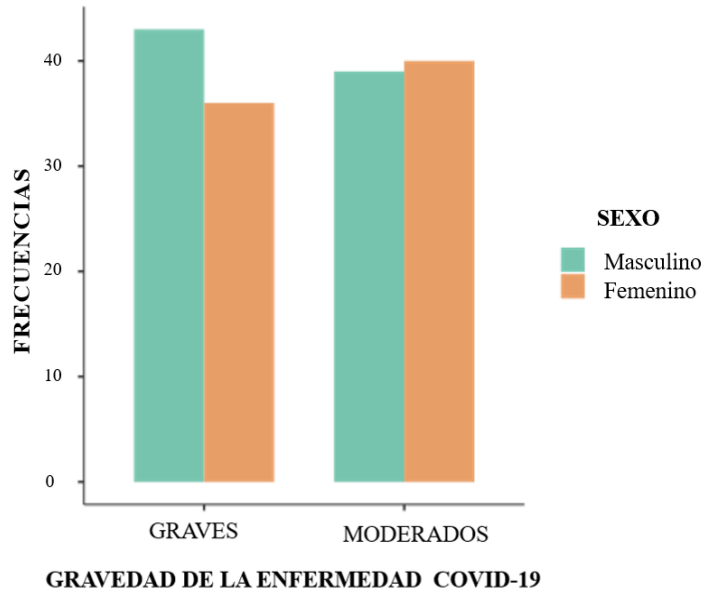


Figura 19. Frecuencia pacientes masculinos y femeninos con enfermedad COVID-19 grave y Moderada.

En relación con la edad de los pacientes moderados y graves (Figura 20), la media del grupo de pacientes con enfermedad grave fue de 58.6 ± 12.8 , mientras que la media de los pacientes con enfermedad moderada fue de 41.4 ± 13.3 . Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los grupos con *U* de *Mann-Whitney* en intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 10. Sexo y gravedad de pacientes positivos a COVID-19 en México del HRAEI de abril del 2020 a julio del 2021.

Gravedad de la COVID-19	SEXO	
	Masculino	Femenino
GRAVE	43	36
(%)	54.4	45.6
MODERADO	39	40
(%)	24.68	25.31

En este sentido, de acuerdo con la investigación de Ioannidis *et al.* El envejecimiento es un factor de riesgo prominente de enfermedad grave y muerte por COVID-19. (2020). En dicha investigación menciona que las personas <65 años tienen un riesgo de muerte por COVID-19 de hasta 100 veces menor que las personas ≥ 65 años en los países desarrollados. Dicha diferencia puede atribuirse a la relación entre la edad avanzada con el desarrollo de enfermedad grave, por ejemplo, la investigación de (Chen *et al.*, 2021) menciona la disminución y la desregulación de la función inmunológica, inmunosenescencia e inflamación en la contribución a una mayor vulnerabilidad en adultos mayores a COVID-19. También es importante destacar, que el envejecimiento incluye cambios a nivel de celular, tisular y orgánico que contribuyen a la morbilidad, y mortalidad en la población. Estas características del envejecimiento interfieren con todos los aspectos de las funciones inmunológicas e interactuar directa o indirectamente con la infección viral (Salimi & Hamlyn, 2020).

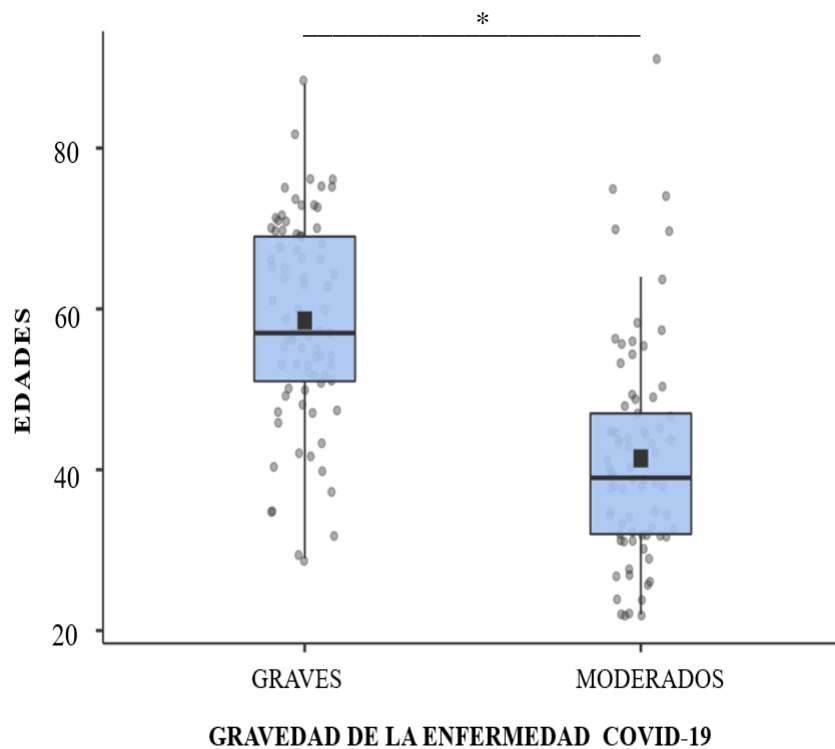


Figura 20. Edades de pacientes COVID-19 con enfermedad grave y Moderada. Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) con la prueba de U de Mann-Whitney.

Mediante la plataforma de SALUDNESS se recopiló la información de Dímero D (ug/mL), cantidad de leucocitos totales (células/uL) y porcentajes de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos, en el cuadro 11 se presenta un resumen de dichas características. Así como también se obtuvieron las frecuencias de comorbilidades, a saber; obesidad, hipertensión, diabetes mellitus, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

Cuadro 11. Características de pacientes positivos a COVID-19 en México del HRAEI de abril del 2020 a julio del 2021.

Característica clínica	Grupo	n	Media	Mediana	Moda	D.E	Min	Max
Edad (años)	GRAVE	79	58.6	57	53	12.8	29	88
	MODERADO	79	41.4	39	32	32	22	91
SaO2 (%)	GRAVE	78	61.8	21.17	60.0	19.24	1	86
	MODERADO	67	91.5	0.838	94.0	6.86	60	100
Dímero D (ug/mL)	GRAVE	62	9124	3330	50000	14021	369	50000
	MODERADO	28	2999	1059	8973	4789	397	22759
Neutrófilos (%)	GRAVE	73	84.8	90.3	95.0	20.0	0	98.1
	MODERADO	42	42	81.7	88.0	15.0	30.9	98
Monocitos (%)	GRAVE	73	3.39	3.00	2.00	2.40	0	10.1
	MODERADO	43	6.07	5.20	3.00	3.37	1.00	17.7
Eosinófilos (%)	GRAVE	73	0.361	0	0	0.870	0	0.530
	MODERADO	43	0.570	0.100	0	1.025	0	4.50
Basófilos (%)	GRAVE	73	0.115	0	0	0.378	0	3.0
	MODERADO	43	0.195	0.100	0	0.273	0	1.0
Leucocitos (cel/uL)	GRAVE	74	13.94	13.30	11.4	5.59	1.70	32.8
	MODERADO	44	9.22	8.90	5.5	3.84	2.00	16.6

Con color rojo se señalan los valores con diferencias estadísticamente significativas

En el grupo de pacientes graves, los valores de Dímero D fueron $\bar{x} = 9124 \pm 14021$, mientras que para los pacientes con enfermedad COVID-19 moderada $\bar{x} = 2999 \pm 4789$ (Figura 21). Los resultados de la presente investigación reflejan una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.002$) entre los pacientes graves y moderados con la prueba *U* de *Mann-Whitney*, intervalo de confianza del 95%. Diferentes investigaciones mencionan la relación en el aumento en las concentraciones de Dímero D con un mal pronóstico en la COVID-19 (Rostami & Mansouritorghabeh, 2020), en este sentido, la prueba del dímero D generalmente se usa para excluir un diagnóstico de trombosis venosa profunda (TVP) y embolia pulmonar (EP) y confirmar el diagnóstico de coagulación intravascular diseminada (CID). Varios estudios han demostrado que la COVID-19 predispone a los pacientes a la trombosis, tanto en arterias como en venas. Por lo tanto, las personas con COVID-19 también presentan un riesgo de TVP, tromboembolismo venoso (TEV) y posible EP. Los resultados de nuestra investigación van acordes con esta relación.

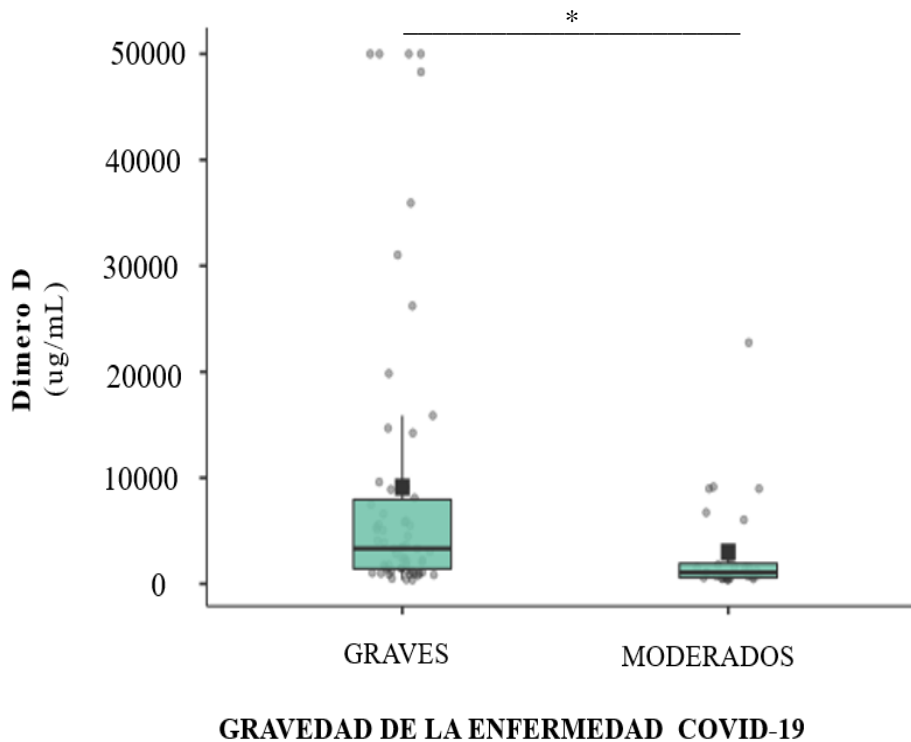


Figura 21. Resultado de Dímero D de pacientes con enfermedad moderada y grave. Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de *U* de *Mann-Whitney*.

En relación con las células del sistema inmunitario (Figura 22), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos graves y moderados, para los valores de leucocitos totales (cel/uL) ($p=0.001$), porcentaje de neutrófilos ($p=0.001$) monocitos ($p=0.001$), basófilos ($p=0.013$) y eosinófilos ($p=0.048$) con la prueba *U* de *Mann-Whitney*, intervalo de confianza del 95%.

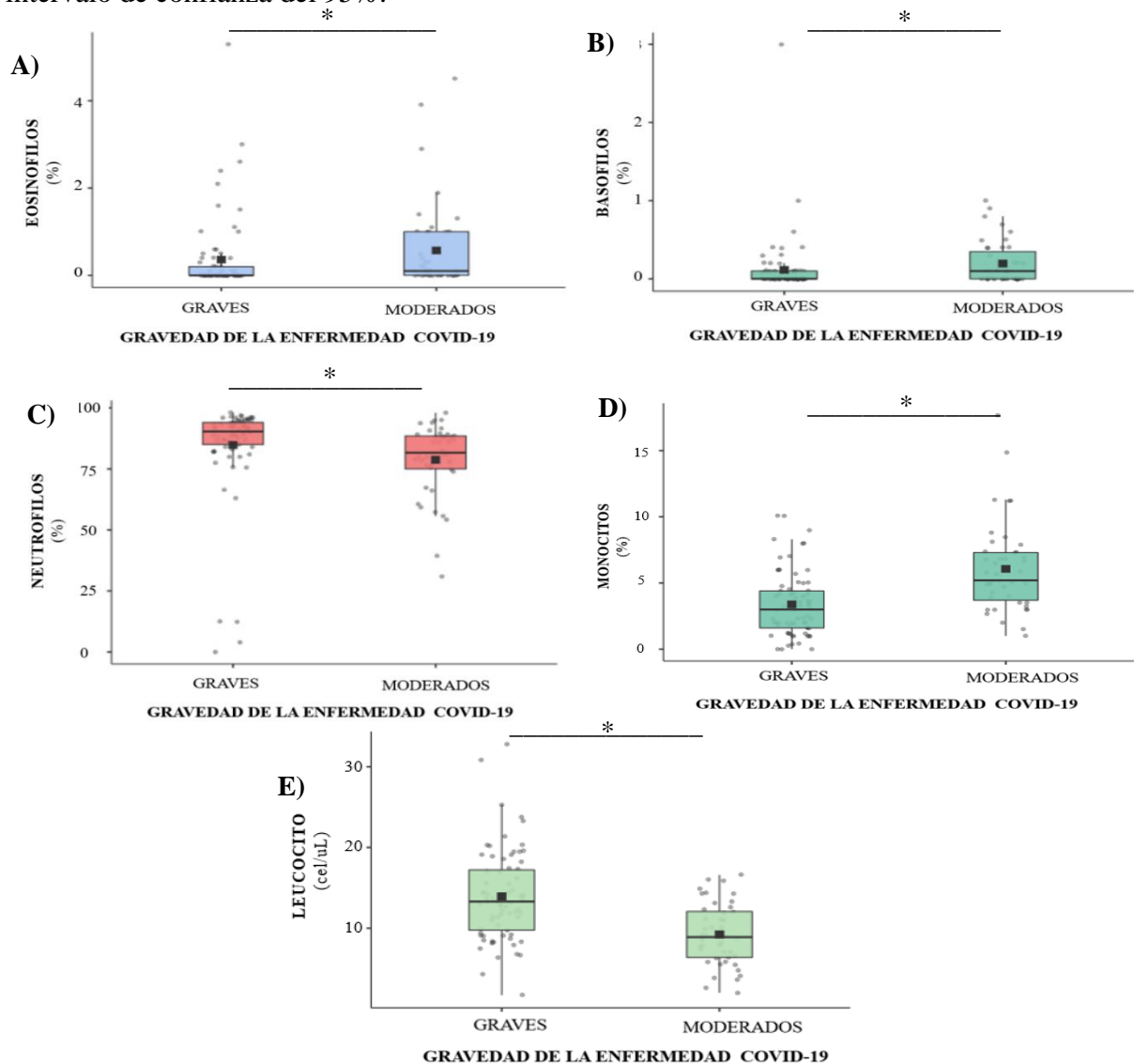


Figura 22. Cantidad de diferentes células inmunitarias en Biometrías Hemáticas de pacientes COVID-19 con enfermedad grave y moderada. **A)** Porcentaje de Eosinófilos **B)** Porcentaje de Basófilos **C)** Porcentaje de Neutrófilos **D)** Porcentaje de monocitos **E)** Leucocitos (10^3 cel/uL). Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de *U* de *Mann-Whitney*.

Aunque la relación entre la gravedad de la COVID-19 y dichos valores aún no está del todo clara, diferentes autores señalan que los casos graves de COVID-19 tienen un menor número de linfocitos, un mayor número de leucocitos, una mayor proporción de neutrófilos-linfocitos, así como una menor proporción de monocitos y eosinófilos (Jafarzadeh *et al.*, 2020). La reciente investigación de (Lindsley *et al.*, 2020) menciona que la eosinopenia se asocia con el deterioro respiratorio agudo durante la infección por SARS-CoV-2. Los eosinófilos son células proinflamatorias, principalmente debido a sus gránulos, que están repletos de proteínas citotóxicas, incluida la peroxidasa de eosinófilos y ARNasas. La evidente disminución de eosinófilos en el grupo de pacientes graves en la presente investigación está acorde con los resultados de dichas investigaciones, ya que los pacientes graves, presentaron un menor porcentaje de diferentes células inmunitarias, probablemente debido a que el virus SARS-CoV-2 interfiere con varios componentes de la respuesta inmunitaria innata como los componentes humorales (sistemas de coagulación, interferones, quimiocinas, anticuerpos, etc) y celulares (células NK, células presentadoras de antígeno, etc), ya que la proteína Spike, presenta posibles sitios neutralizantes, reconocimientos de glicanos y citocinas reclutadoras de neutrófilos (Boechat *et al.*, 2021).

Por otra parte, la neutrofilia se correlaciona con un estado hiperinflamatorio y la tormenta de citocinas, parte integral del mecanismo patogénico de la COVID-19. Los neutrófilos están involucrados en muchas enfermedades respiratorias virales asociadas con el SDRA. (Lindsley *et al.*, 2020). Aunado a esto, una minoría de pacientes presenta leucocitosis, apoyada por neutrofilia: este hallazgo parece correlacionarse con un curso más severo (Bjerregaard *et al.*, 2017). A medida que avanza el COVID-19, la cantidad de neutrófilos circulantes aumenta gradualmente; por lo tanto, la neutrofilia se ha identificado como un marcador de enfermedad grave, a su vez los pacientes graves en esta investigación presentaron porcentajes más elevados de neutrófilos, lo cual está en relación con esta hipótesis.

De acuerdo con Palladino, 2021 la infección por SARS-CoV-2 de los monocitos, afecta directamente las respuestas inmunitarias adaptativas antivirales. Por lo tanto, interferir con la infección de los monocitos y la subsiguiente activación de la producción de citoquinas y las vías de señalización mediadas por citoquinas también puede atenuar la hiperinflamación

sistémica. Los pacientes con una alta proporción de monocitos tienen un mejor pronóstico de recuperación y alta hospitalaria. Lo cual se correlaciona con nuestros resultados, pues los pacientes moderados presentaron mayor porcentaje de monocitos con respecto a los graves.

Una minoría de pacientes presenta leucocitosis, apoyada por neutrofilia: este hallazgo parece correlacionarse con un curso más severo (Yamaha *et al* 2020). A medida que avanza el COVID-19, la cantidad de neutrófilos circulantes aumenta gradualmente; por lo tanto, la neutrofilia se ha identificado como un marcador de enfermedad respiratoria grave y un mal resultado (Zhang *et al.*, 2020). Los leucocitos y los neutrófilos fueron significativamente más altos en los pacientes infectados con COVID-19 graves que en los no graves. Además, junto con la progresión de la enfermedad de COVID-19, los recuentos de leucocitos y neutrófilos aumentaron en los grupos graves (Soraya & Ulhaq., 2020). Tanto el porcentaje de neutrófilos elevado, como el aumento en el conteo total de leucocitos de los pacientes con enfermedad grave en nuestra investigación están acorde con esta hipótesis.

Por otra parte, los monocitos constituyen alrededor del 5-9% del total de leucocitos periféricos y permanecen en la circulación durante 1-2 días, los basófilos abandonan la circulación para migrar a los sitios inflamatorios durante la inflamación alérgica u infección, mejorando las respuestas de memoria inmunológica al unirse a los antígenos en su superficie. Los basófilos como los eosinófilos pueden producir IL-4, que es una citocina importante para estimular la proliferación de células B y T activadas (Bjerregaard *et al.*, 2017) Por lo tanto, la disminución de los recuentos de basófilos y eosinófilos en pacientes con COVID-19 puede explicar la disminución del recuento de leucocitos totales.

Con respecto a las mutaciones identificadas (Figura 23 y Anexo 2) en las muestras positivas a la detección molecular del virus SARS-CoV-2 (n=158). Es de destacar el elevado porcentaje de pacientes con la mutación D614G, 98.1% (155/158), seguido de las mutaciones E484K 63.92%, T484K 56.96%, T732A 48.73% y P681H 41.77% con el (101/158), (89/158, 77/158 y 65/158) respectivamente.

Con relación a lo anterior, un estudio publicado por Tao., *et al* 2021, menciona que el primer indicio de una selección evolutiva en el genoma del SARS-CoV-2, surgió con las variantes que contenían la mutación D614G y que alcanzaron una prevalencia de casi el 100% en junio del 2020. En este estudio la mutación D614G está presente en el 98.1% de las muestras

analizadas, lo cual no solo refuerza lo mencionado por Tao., *et al* 2021 sino que también hace evidente lo reportado por Yurkovetskiy *et al.*, 2020 donde menciona que aquellos virus con la sustitución D614G, tienen niveles más altos de replicación en las vías respiratorias humanas, lo que a su vez puede relacionarse con su mayor infectividad. La siguiente mutación con mayor frecuencia fue E484K (101/158), de acuerdo con Tao., *et al* 2021 está presente en las variantes de preocupación Beta y Gamma, a su vez en las variantes de interés Eta, Theta y Zeta, lo cual podría explicar su alta prevalencia en las muestras de la presente investigación.

Por otra parte, las mutaciones T478K, T732A y P681H, están asociadas a las variantes de

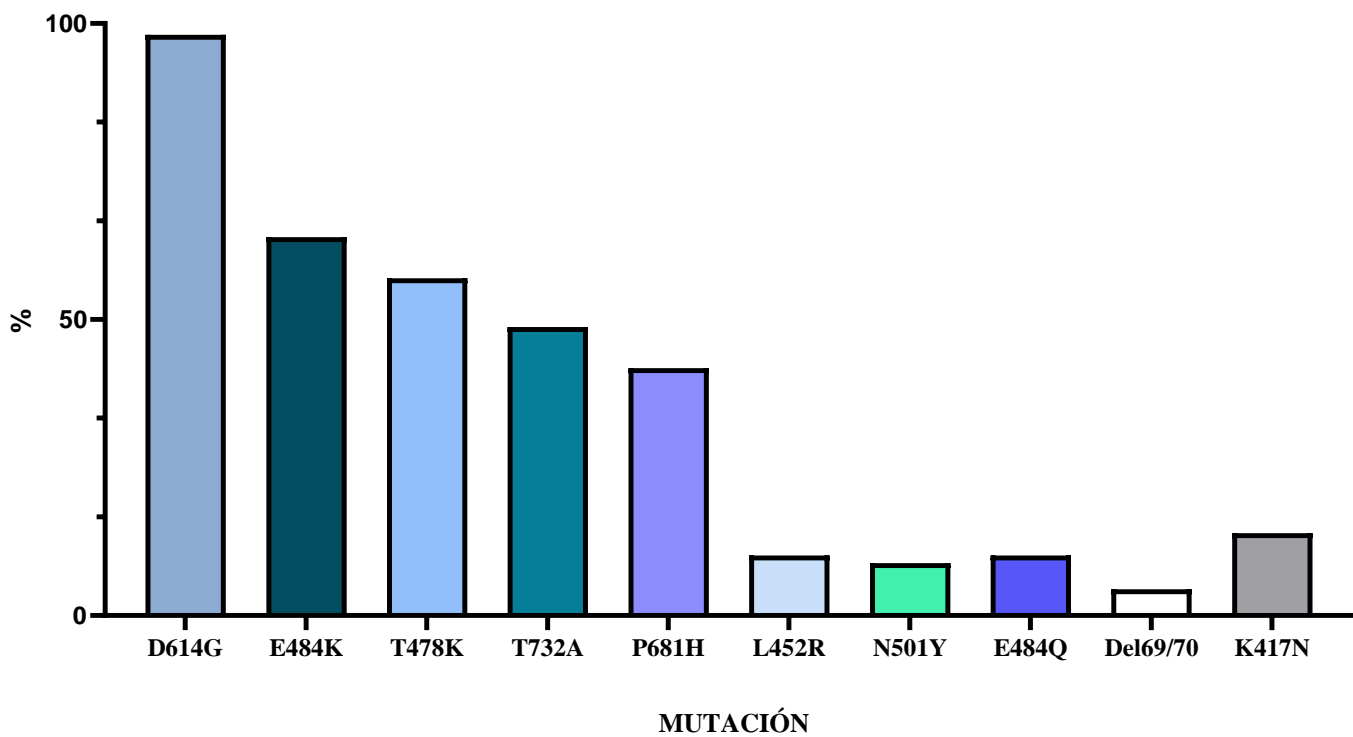


Figura 23. Porcentaje de Mutaciones en el gen S, identificadas mediante RT-qPCR.

preocupación Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2) y a la variante de interés “mexicana” (B.1.1.519), en este sentido un estudio publicado por (Cedro-Tanda *et al.*, 2021) menciona a la sustitución S: P681H (Sustitución del aminoácido Prolina en la posición 681 por Histidina), se encuentra adyacente a los aminoácidos 682–685, que corresponden a un sitio de escisión de furina en el sitio de unión S1/S2, donde cuanto más básica es la cadena de aminoácidos, más eficazmente la furina la reconoce y la corta. Lo cual explica la frecuencia en 65/158 pacientes de esta sustitución en nuestro estudio, pues de acuerdo con Alcon *et al.*,

2020 la proteasa furina es la principal desencadenante del proceso de fusión de membranas a través de la escisión proteolítica, lo que pudo haber provocado una mayor capacidad infectiva, con respecto al resto de las mutaciones analizadas.

Por otra parte, la sustitución T478K de acuerdo con un estudio publicado por (Di Giacomo *et al.*, 2021) muestra una prevalencia notable en México, donde constituye el 52.8% de todos los genomas de SARS-CoV-2 secuenciados. Con respecto a la mutación T732A la reciente investigación de (Barona-Gómez *et al.*, 2021) menciona, que más de un tercio de las secuencias disponibles del virus SARS-CoV-2 a nivel nacional presentan dicha mutación, lo que se correlaciona con nuestros resultados obtenidos con una alta frecuencia en 77/158 de esta mutación, lo cual refuerza la hipótesis de la mejora de la capacidad infectiva de los virus que presenten la sustitución.

La correlación de las mutaciones con el Kit Master Mut-SARS-CoV-2 de acuerdo con el periodo epidémico y los datos de secuenciaciones obtenidos de Covariants (Hodcroft *et al.*, 2022). y CoV linages (O'Toole *et al.*, 2021) la mutación L452R (sustitución de Lisina en la posición 452 por Arginina) se asoció con la variante de preocupación Delta (B.1.617.2) y las variantes de interés Épsilon (B.1.429) y Kappa (B.1.617.1), Sin embargo, su frecuencia de 16/158 fue menor en comparación con las sustituciones descritas anteriormente, en este sentido, estudios publicados por Chen *et al.*, 2020 y Teng *et al.*, 2021 mencionan que la mutación L452R puede estabilizar la interacción entre la proteína de punta y su receptor ACE2 humano, por lo tanto, aumentar la infectividad no obstante (Deng *et al.*, 2021) menciona que el residuo L452 no contacta directamente con el receptor ACE2, por lo que L452R tienen una infectividad ligeramente reducida en comparación con pseudovirus que presentan otras sustituciones. De esta manera podemos explicar por qué a pesar de que esta sustitución otorgue una ventaja en cuanto a infectividad, es menor con respecto a la otorgada por las sustituciones D614G, T478K, T732A y P681H.

En cuanto a la mutación N501Y (sustitución de Asparagina en la posición 501 por Tirosina) fue asociada a las variantes de preocupación Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.3151) y Gamma (P.1), tuvo un porcentaje de 9.5% en 15/158 del total de muestras analizadas, en este sentido, la investigación publicada Por Mistry *et al.*, 2022 menciona que el residuo N501 es importante para la interacción ACE2 lo que muestra que el aumento de la transmisibilidad observado en

la variante Beta se debe a N501Y u otras alteraciones en el virus. Los resultados en la presente investigación no permiten asociar la presencia de la sustitución N501Y con una mayor transmisibilidad debido a su baja frecuencia (15/158).

Las mutaciones E484Q (sustitución de ácido glutámico en la posición 484 por glutamina) y K417N (sustitución de Lisina en la posición 417 por Arginina) se presentaron en 10.1% y 13.9% respectivamente lo que equivale a 16/158 y 22/158. La mutación E484Q fue asociada a la variante de interés Kappa (B.1.617.1) mientras que K417N fue asociada a las variantes de preocupación Beta (B.1.351) y Gamma (P.1) sin embargo ambas sustituciones presentaron una baja frecuencia (16/158 y 22/158 respectivamente) en comparación con el resto de las mutaciones analizadas en este estudio. De acuerdo con Mistry *et al.*, 202 los residuos de aminoácidos E484 y K417 no se prevé que tengan un papel importante en cuanto a la infectividad e incluso pueden reducir la afinidad de unión. Los resultados presentes en esta investigación refuerzan dicha hipótesis. Por último, la delección 69/70 se presentó en el 8.2% (13/158) y fue asociada a la variante de preocupación Alfa (B.1.1.7). Una investigación realizada por Peterson *et al.*, 2022 menciona que la importancia de esta delección está directamente relacionada con fallas en el objetivo del gen S en ensayos de diagnóstico clínico. Aunado a esto Tao *et al.*, 2020 refiere que las eliminaciones presentes en las posiciones 69/70 parecen estar asociadas con una mayor replicación viral. Sin embargo, con los resultados obtenidos en la presente investigación, no es posible establecer una relación entre dicha delección con un aumento en la infectividad.

Se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA no paramétrica (Kruskall-Wallis) con un intervalo de confianza del 95%, para buscar diferencias en leucocitos totales (cel/uL), porcentaje de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos, así como también la concentración de Dímero D (ng/mL), posteriormente se realizaron comparaciones por pares DSCF (Dwass-Steel-Christchlow-Fligner) con respecto a los resultados positivos, negativos o N/A (No amplifica) de cada mutación.

Para la sustitución P618H se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el conteo de leucocitos totales ($p=0.001$), porcentajes de Neutrófilos ($p=0.004$) y monocitos ($p=0.001$) entre los grupos negativos y positivos. La sustitución T478K presento diferencias

estadísticamente significativas porcentajes de monocitos ($p=0.004$) entre los grupos negativos y positivos. Para la mutación T732A se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el conteo de leucocitos totales ($p=0.001$), porcentajes de Neutrófilos ($p=0.040$) y monocitos ($p=0.006$) entre los grupos negativos y positivos.

De esta manera podemos establecer una relación entre las muestras con resultado negativo y positivo, es decir aquellos pacientes que presentaban un linaje viral que mantenía, los nucleótidos que codifican para los aminoácidos de la secuencia original del gen S (S: P681, T478 y T732) mantenían niveles más altos de células relacionadas con el sistema inmunitario (monocitos y neutrófilos) y un conteo mayor de leucocitos totales. En comparación con aquellos pacientes que presentaron las sustituciones S: H681, K478, R732.

Por otra parte, la mutación K417N, mostro diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de monocitos entre los tres grupos ($p=0.002$ y $p=0.003$) entre el grupo negativo, positivo y no amplificados. En este sentido aquellos resultados que no amplificaron con las sondas comerciales para la detección de la secuencia original y de las sustituciones podemos inferir que el no amplificar, puede deberse a 3 situaciones: 1) La secuencia de nucleótidos es diferente en ambas secuencias (la que da origen al aminoácido Wild-type y la que da origen a la sustitución.) 2) La secuencia de aminoácidos desapareció por un proceso de delección. 3) Las muestras se desnaturalizaron en el proceso. Sin embargo, para identificar cuál de estas situaciones ocurrió con cada una de las muestras con resultado N/A, es necesario la secuenciación total del genoma viral para cada una.

La mutación N501Y presento diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de neutrófilos ($p=0.005$) y monocitos ($p=0.0015$), entre los grupos con resultado negativo y aquellos que no amplificaron. De igual manera las mutaciones E484Q y la delección 69/70 presentaron diferencias estadísticamente significativas para los porcentajes de neutrófilos y monocitos entre los grupos negativo y no amplificado ($p=0.003$; $p=0.0012$ y $p=0.001$; $p=0.004$, respectivamente). No fue posible realizar este análisis para la mutación D614G debido a su alta prevalencia (155/158) en este periodo epidémico y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas para la mutación E484K.

Por último, la mutación L452R presento diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos entre los grupos con resultado positivo a la sustitución y aquellos que no

amplificaron ($p=0.0001$) y para el porcentaje de monocitos en los tres grupos ($p=0.001$ y $p=0.008$).

En relación con lo descrito anteriormente, una investigación publicada por Kumar *et al.*, 2020 menciona que los factores de virulencia específicos del SARS-CoV-2 se dirigen principalmente contra las respuestas inmunitarias del huésped, a su vez la enfermedad grave de COVID-19 está acompañada de múltiples marcadores de respuesta inmunitaria innata como diferentes interleucinas, inmunoglobulinas y eosinófilos. El porcentaje de eosinófilos no se vio afectado de manera significativa por la presencia de las sustituciones revisadas en esta investigación, lo que indica que estas mutaciones no afectan la eosinopenia asociada la infección por SARS-CoV-2. Caso contrario con los porcentajes de Neutrófilos y monocitos que se vieron afectados por la presencia o ausencia de las sustituciones (S: 452R, 681H, 478K, 732A y 417N). La neutrofilia, como ya se ha discreto anteriormente parece estar asociada con el desarrollo de COVID-19 grave, por lo tanto, estas sustituciones podrían estar implicadas en un desarrollo de síntomas graves de la enfermedad. También el porcentaje de monocitos se vio alterado por la presencia de dichas mutaciones, es importante mencionar que de acuerdo con (Jafarzadeh *et al.*, 2020) el número de monocitos clásicos circundantes disminuye en pacientes con COVID-19, esta reducción parece estar asociada también a las sustituciones que presentes en el gen S del virus SARS-CoV-2.

Por otra parte el número de leucocitos totales se vio afectado de manera estadísticamente significativa con la presencia o ausencia de todas las sustituciones analizadas en este estudio con excepción de la sustitución E484Q, del 69/70 y D614G en relación a esto, las investigaciones recientes, (Ren *et al.*, 2022) asocian la sustitución E484Q con resistencia a la neutralización por plasma convaleciente y un escape inmunológico, mas no con el desarrollo de síntomas graves de la enfermedad, mientras la investigación de (Takano *et al.*, 2021) asocia la delección 69/70 con resistencia al antiviral remdesivir y podría conducir a la evasión de la inmunidad y provocar una excreción viral prolongada. (2021). Los resultados de esta investigación no permiten correlacionar las sustituciones E484Q y la delección 69/70 con el desarrollo de síntomas graves de la COVID-19 ni con una alteración en el conteo de leucocitos totales.

Para el análisis de las concentraciones de Dímero D se realizaron pruebas de ANOVA no

paramétricas (Kruskall-Wallis) con un intervalo de confianza del 95% y posteriormente se hicieron comparaciones por pares DSCF (Dwass-Steel-Christlow-Fligner) con respecto a los resultados positivos, negativos o N/A (No amplifica) de cada mutación. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la mutación N501Y entre los grupos positivos con respecto a los que no amplificaron ($p=0.0058$), para la delección 69/70 se encontraron diferencias entre los grupos Negativos y No amplificados ($p=0.0024$). Mientras que para la sustitución K417N se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos negativo y positivo ($p=0.0013$).

En este sentido (Rostami & Mansouritorghabeh, 2020), menciona que el aumento del dímero D tiene una conexión significativa con la mortalidad debido a el hecho de que la trombosis puede ocurrir en varios órganos con la subsiguiente insuficiencia orgánica en casos graves de COVID-19. Sumado a esto, una revisión publicada por (Vidali *et al.*, 2020) menciona que la correlación entre el dímero D elevado y la mayor tasa de condiciones asociadas con un mal pronóstico, es herramienta potencialmente útil para prevenir complicaciones, en este sentido, identificar las mutaciones N501Y y K417N en etapas tempranas de la enfermedad COVID-19 y realizar pruebas de Dímero D de manera rutinaria podrían complementarse para tener un mejor seguimiento de los pacientes infectados con alguna de las variantes del virus SARS-CoV-2.

Para analizar las edades, se realizaron pruebas de ANOVA de un Factor y ANOVA no paramétrica (Kruskall Wallis) con un intervalo de confianza del 95%, posteriormente se realizaron pruebas post hoc de Tukey-Kramer y comparaciones por pares DSCF (Dwass-Steel-Christlow-Fligner) para los resultados positivos, negativos o N/A (No amplifica) de cada mutación. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los grupos negativo y positivo de las sustituciones T478K, P681H, y T732A (Figura 24) ($p=0.002$, <0.001 y <0.001 respectivamente). La sustitución K417N y la delección 69/70 presentaron diferencias significativas solo entre los grupos negativos con respecto a los no amplifica ($p=0.02$ y 0.0026 , respectivamente). Mientras que las mutaciones N501Y y L452R presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las edades de los no amplificados con respecto a los paciente negativos y positivos ($p=0.004$; $p=0.007$ y $p=0.002$;

$p=0.007$, respectivamente). Las sustituciones D614G, E484K y E484Q no presentaron diferencias significativas con respecto a las edades.

Esta diferencia entre la edad de los pacientes en las muestras positivas para las sustituciones S: 681H,732A y 478K con respecto a aquellas muestras que codifican para los aminoácidos de la secuencia ancestral, podría explicar, el desarrollo de síntomas graves entre los pacientes, sin embargo, es importante mencionar que estas mutaciones están relacionadas con la variante “mexicana” (B.1.1.519), y a su vez, un estudio publicado por (Cedro-Tanda *et al.*, 2021) en la cual realiza una revisión de casos clínicos completos, menciona una tendencia general al aumento de la gravedad de la enfermedad con el incremento en la edad, además

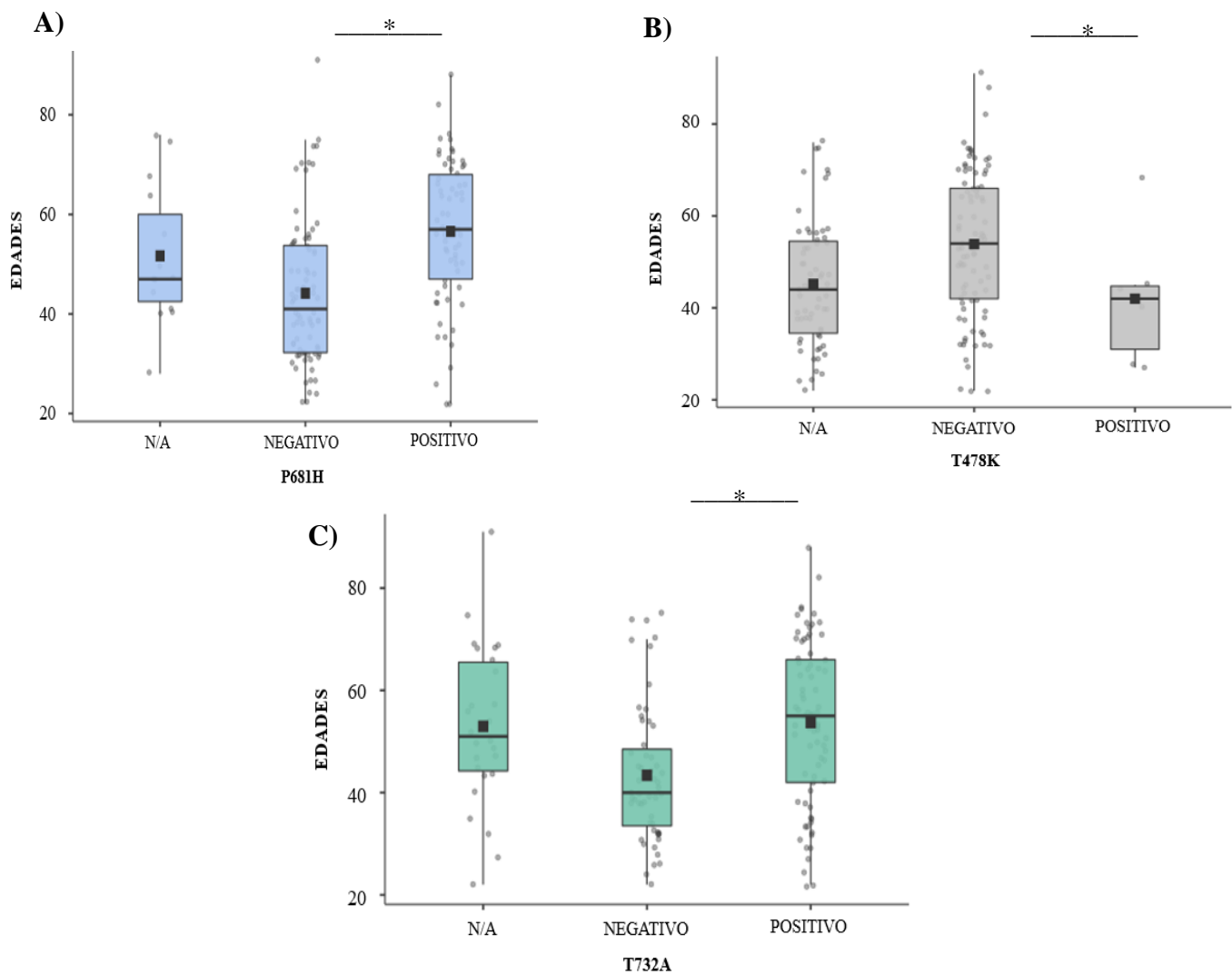


Figura 24. Edades de pacientes con respecto al resultado de detección para diferentes mutaciones A) P681H, B) T478K y C)732A. Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de U de Kruskal Wallis.

refiere una asociación entre la infección por B.1.1.519 con los pacientes que desarrollaron enfermedad grave y/o muerte. Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con estas hipótesis. Al contrario de lo reportado por (Di Giacomo., *et al* 2021) donde menciona que T478K no parece estar significativamente asociado con la edad del paciente.

Posteriormente se realizó una correlación entre los resultados obtenidos para la identificación de las mutaciones en el gen que codifica para la proteína S, con el cuadro de identificación preliminar de variantes incluida en los Kits de detección Master Mut-6 y Master Mut SARS-CoV-2, modificada con los datos actuales de las secuenciaciones de las variantes del virus SARS-CoV-2 obtenidas de las bases de datos de Cov.variants, Cov.linages y outbreak.info ((Latif *et al.*, 2022) las cuales utilizan la información de secuencias genómicas de GISAID. Los resultados obtenidos demuestran que la variante del virus con mayor prevalencia fue la “mexicana” (B.1.1.519) con una frecuencia de 73/158 lo que corresponde a el 46.2% de las muestras analizadas, seguida de las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) 27/158 y B.1 24/158 lo que equivale al 17.3 y 15.4% respectivamente, por ultimo las variantes Gamma con 9/158 y Alfa con 2/158 lo que equivale a 1.3% y 5.7% respectivamente (Figura 25).

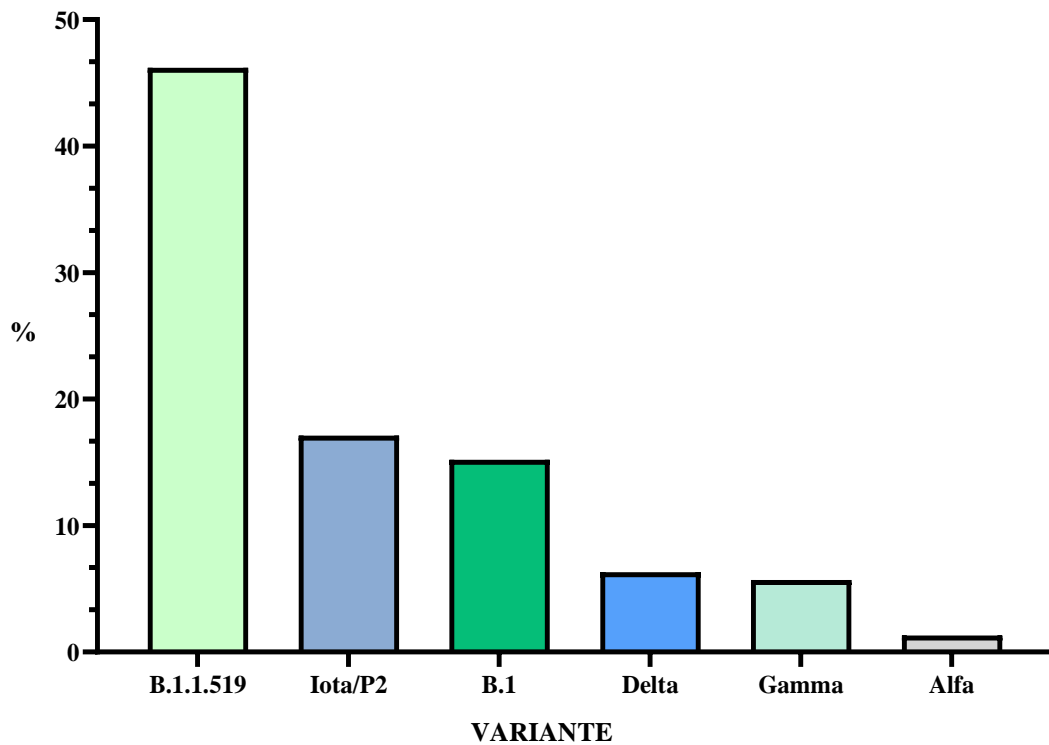


Figura 25. Porcentaje de variantes identificadas de manera preliminar mediante la detección molecular de mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2.

Con respecto a este método de detección de variantes virales, una investigación publicada por (Peterson *et al.*, 2022) menciona que este enfoque es adecuado para la implementación en un entorno de alto rendimiento, pero el hecho de que este método de detección se limite a un pequeño número de mutaciones específicas es un gran inconveniente. Cada vez que se detectan nuevos COV, que portan diferentes mutaciones de interés, es necesario adaptar la prueba, desarrollar y validar nuevos conjuntos de cebadores/sonda específicos. Sin embargo, los métodos que se basan en la determinación de la secuencia de la región RBD, no presentan ese inconveniente, lo que los convierte en una herramienta muy práctica para la detección de variantes virales.

Es importante destacar la alta frecuencia (73/158) de la variante “mexicana” (B.1.1.519) en el periodo epidémico que abarca la presente investigación (Primera ola y segunda ola de contagios de COVID-19), en este sentido una, investigación publicada por (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2021) describe que la variante B.1.1.519 no se había detectado en México antes de octubre de 2020, cuando se encontró en la Ciudad de México, y el análisis filogeográfico sugirió que la variante B.1.1.519 surgió a mediados de septiembre de 2020. En contraste con lo que reporta Barona y colaboradores (2021) donde mencionan que la secuencia más temprana reportada con estas tres mutaciones fue en el sureste de Oaxaca en julio del 2020 (México/OAX-InDRE_258/2020, GISAID EPI ISL 1054990). Las primeras muestras recolectadas en esta investigación con resultado positivo para las sustituciones en el gen S para los aminoácidos P681H, T732A y T478K, lo que a su vez indica la detección preliminar de la variante B.1.1.519 son de mediados de abril del 2020, por lo que podemos inferir que este linaje estuvo presente en etapas más tempranas de la pandemia. De igual importancia Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2021 menciona que en la Ciudad de México esta variante superó a las preexistentes entre octubre de 2020 y febrero de 2021, y este aumento también se observó en otras regiones del país, representando más del 50% de los virus caracterizados en algunos estados durante el primer trimestre de 2021. En este sentido, las muestras recolectadas en esta investigación corresponden principalmente a la población del Valle de México (Ciudad de México y área Metropolitana) lo cual sugieren que el hecho de que la variante B.1.1.519 superó a las preexistentes ocurrió previo a lo sugerido en las últimas investigaciones. Además, que los resultados obtenidos en la presente investigación refuerzan

la hipótesis de que el linaje B.1.1.519 haya superado a las preexistentes en octubre del 2020 e incluso antes.

Por otra parte, para el periodo epidémico analizado en la presente investigación, las mutaciones E484K y D614G se asociaron a las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2), por lo cual no fue posible distinguir entre ambos linajes, lo que se relaciona con lo publicado por Peterson., *et al* 2022. Sin embargo, de acuerdo con la base de datos outbreak.info, la variante Zeta fue reportada por primera vez el 13 de abril del 2020 y represento <0.5% de las secuencias genómicas del virus SARS-CoV-2 reportadas a nivel mundial. Mientras que para la variante Iota (B.1.526) el primer genoma detectado en México para fue el 15 de mayo del 2021. Los resultados de la presente investigación refieren una baja frecuencia (27/158) de ambas variantes en la primera y segunda ola de contagios, sin embargo, siguieron una presencia de estos linajes virales desde principios de mayo del 2020 antes de lo detectado mediante secuenciación.

La presencia de la mutación D614G se asoció con todas las variantes, sin embargo, aquellas muestras que presentaron únicamente esta sustitución fueron identificadas de manera preliminar con el linaje B.1, con respecto a esto (Rambaut *et al.*, 2020) menciona que B.1 fue el linaje global predominante, que comprende el gran brote italiano y también está asociado con muchos brotes I en Europa y fue exportado a varias áreas del mundo. Aunado a esto (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2021) menciona una frecuencia decreciente del linaje B.1 que había predominado en México en 2020, al pasar de 284/783 (36.27 %) entre marzo y septiembre a 26/1098 (2.37 %) en febrero de 2021. Los resultados de esta investigación corroboran este periodo de transición entre la dominancia del linaje B.1 portador de la mutación D614G en el gen que codifica para la proteína S, al linaje B.1.1.519 el cual presenta las sustituciones D614G, P681H, T478K y T732A y a su vez es posible asociar entonces la presencia de las mutaciones P681H, T478K y T732A con una mayor infectividad.

En la presente investigación, las variantes Gamma (P.1) y Alfa (B.1.1.7) presentaron frecuencias bajas 9/158 y 2/158 respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado en la investigación de Zárate *et al.*, 2022, donde menciona que el linaje B.1.1.7 se detectó por primera vez en México durante diciembre de 2020, mostrando un aumento lento y progresivo en su frecuencia de circulación, que alcanzó su máximo en mayo de 2021 (18.8% de todas las

secuencias reportadas) pero nunca llegó a ser predominante. Por otra parte, de acuerdo con outbreak.info la variante Gamma fue detectada por primera vez en México en abril del 2020 alcanzando una prevalencia acumulada del 1% de todas las secuencias recopiladas desde su aparición. Nuestros resultados concuerdan con la baja prevalencia de la variante Gamma en México. Además, apuntan a que tanto la variante Alfa como la variante Gamma a pesar de presentar sustituciones en la proteína S (D614G, E484K, N501Y y K417N) que se han asociado con una mayor infectividad, no desarrollaron una prevalencia alta en México durante la primera ola de contagios, con respecto a esto, (Zárate *et al.*, 2022) sugiere que B.1.1.519 tiene una aptitud más alta que otras variantes que circulan en México y puede haber limitado la propagación de otras variantes.

Las sustituciones L452R, T732A, T478K y D614G en la proteína S fueron asociadas con la identificación preliminar de la variante Delta (B.1.617) obteniendo una frecuencia de 10/158 lo que corresponde al 6.3% de las muestras analizadas. La baja frecuencia de esta variante en nuestro estudio puede deberse a las pocas muestras recolectas en el periodo epidémico en el que es reconocido el primer caso de esta variante en México. A pesar de esto, presenta una frecuencia mayor a los linajes Gamma (P.1) y Alfa (B.1.1.7), lo cual podría demostrar su mayor capacidad infectiva. Por otra parte, también es importante mencionar que los pacientes con enfermedad Moderada que fueron identificados con esta variante presentaron un promedio de edad de 45 años y solo uno de estos pacientes presentaba comorbilidades, por lo que el resultado de mayor frecuencia de pacientes moderados con la variante Delta (Figura 26), que pacientes graves de esta misma variante no pueden ser concluyente por lo que es necesario realizar más investigaciones.

Por otra parte, el 8.2% de las muestras no fue posible asociarlas con un linaje de manera preliminar, esto debido a que presentaron combinaciones diferentes de mutaciones en la proteína S. En este sentido, es importante reconocer que el virus SARS-CoV-2 desarrollo diferentes mutaciones, las cuales no necesariamente fueron asociadas con un linaje viral distinto, por lo que es recomendable realizar un análisis de mutaciones más extenso para estas muestras, o bien secuenciación.

Una vez realizada la identificación preliminar de estas variantes, basándonos en la detección de sustituciones en el gen que codifica para los aminoácidos que conforman la proteína Spike,

se llevó a cabo la agrupación de los pacientes con síntomas de enfermedad COVID-19 grave y moderada (Figura 16). De los 73 pacientes infectados con el virus SARS-CoV-2 con la identificación preliminar de la variante “mexicana” (B.1.1.519) el 69.9% desarrollaron enfermedad grave de COVID-19(51/73) mientras que el 30.1% (22/73) presentaron enfermedad moderada. Para las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2), el 25.9% de los pacientes desarrollaron síntomas graves (7/27) y 74.1% moderados (20/27). Para la variante B.1 13/24 54.2% fueron graves (13/24) y 45.8% moderados (11/24). Para la variante Delta se obtuvieron 20% de pacientes con enfermedad grave (2/10) y 80% de los pacientes con enfermedad moderada. De los pacientes con la variante Alfa el 50% desarrollo enfermedad grave y el 50% enfermedad moderada (1/1 respectivamente) para la variante Gamma, 11% de los pacientes desarrollaron síntomas graves (1/9), mientras que el 88.9% (8/9) enfermedad moderada. Por último, de los pacientes con una variante viral sin identificación preliminar el 30.8% desarrollaron COVID-19 grave (4/13) mientras que el 69.2% moderado (9/13).

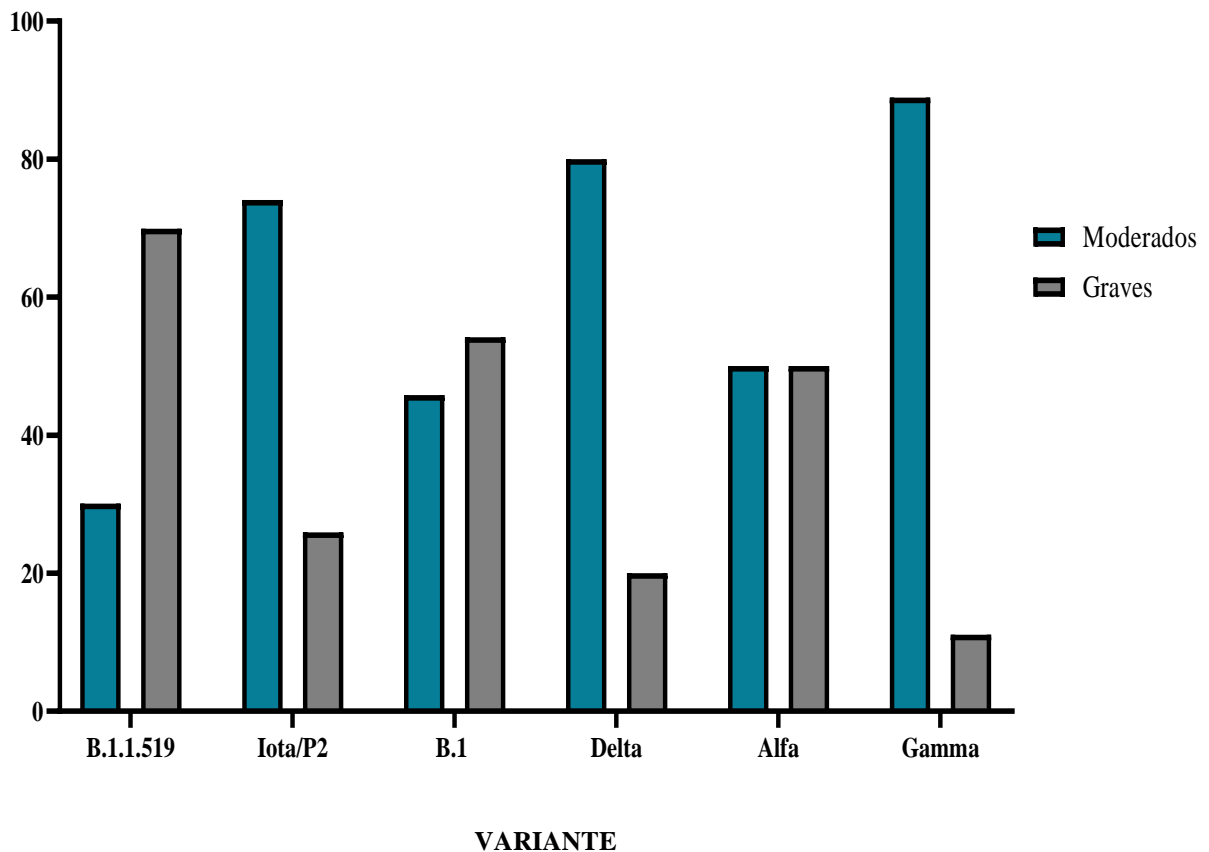


Figura 26. Variantes identificadas de manera preliminar mediante la detección molecular de mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2 en pacientes moderados y graves de la enfermedad COVID-19.

Por otra parte, con los resultados de la presente investigación, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$) entre la variante viral y el desarrollo de COVID-19 grave, con la prueba de χ^2 con intervalo de confianza del 95%. Por lo que, para identificar si esta diferencia era provocada por alguna de las otras variables analizadas en la presente investigación se realizaron pruebas de ANOVA paramétrica para las edades (Figura 27) de cada variante viral mientras que para la cantidad de leucocitos totales (cel/mL) (Figura 28) se realizó la prueba de ANOVA con una prueba post hoc de Games-Howel y para la concentración de Dímero D (Figura 29) una prueba estadística de ANOVA no paramétrica Kruskal-Wallis, todas las pruebas se realizaron con un intervalo de confianza del 95%.

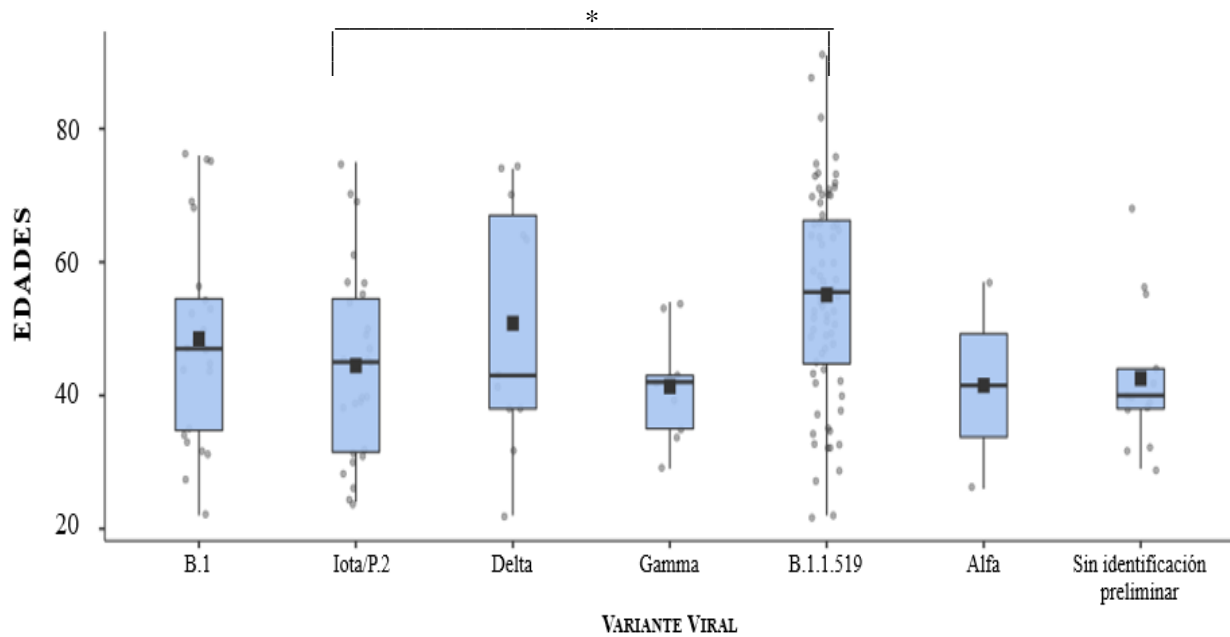


Figura 27. Edades de pacientes positivos a COVID-19 con diferentes variantes del virus SARS-CoV-2. Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de U de Kruskal Wallis.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.033$) entre las edades de los Es importante señalar que las edades de los pacientes con la identificación preliminar de infección de la variante “mexicana” (B.1.1.519) del virus SARS-CoV-2 con respecto a los identificados con los linajes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.033$). En este sentido, es importante señalar que estos

grupos fueron aquellos que presentaron mayor cantidad de pacientes 73 y 24 respectivamente. A la vez que no fue posible diferenciar entre los linajes (B.1.526) y Zeta (P.2) mediante las mutaciones presentes en el gen que codifica para la proteína S (D614G y E484K), el no separar entre estos linajes, podría estar provocando esta diferencia. Por lo que es necesario incluir el análisis de otras mutaciones a las descritas en la presente investigación para hacer esta separación o bien una secuenciación completa del genoma viral.

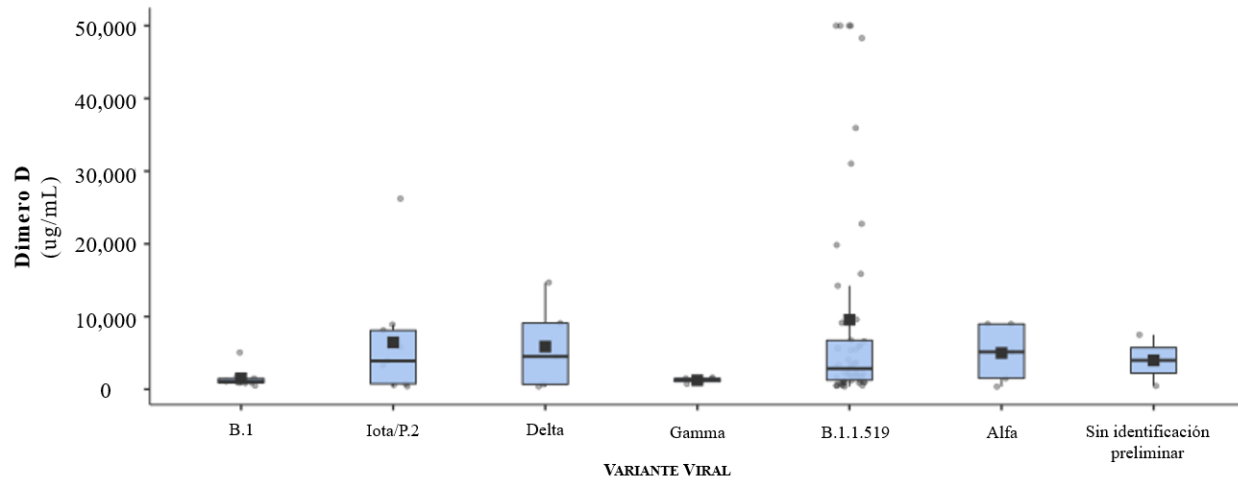


Figura 28. Valores de Dímero D de pacientes COVID-19 positivos con diferentes variantes del virus SARS-CoV-2.

Por otra parte, al analizar las concentraciones de Dímero de (ug/mL), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.19$) entre los grupos de cada variante viral, con respecto a esto, podemos inferir que la presencia de los conjuntos de mutaciones asociados con cada variante no influye con la concentración de Dímero D. En este sentido, una investigación publicada por (Ritchie *et al.*, 2022) refiere que aquellos pacientes con la variante Alfa (B.1.1.7), los niveles de dímero D mejoran en comparación con los pacientes que no son Alfa (B.1.1.7), a pesar del aumento en su mortalidad. Sin embargo, nuestros resultados no parecen apoyar dicha hipótesis, por el contrario, se puede inferir, que, al analizar el conjunto de mutaciones para la detección preliminar de cada variante, no hay una relación entre esta y un aumento en la concentración de Dímero D. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las mutaciones N501Y, K417N y del 69/70 presentaron diferencias estadísticamente significativas al analizarlas individualmente, por lo que es importante realizar futuras investigaciones que puedan esclarecer esta posible relación.

El análisis estadístico para la cantidad de leucocitos totales (cel/uL) reveló diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0042$) entre los pacientes con la identificación preliminar de las variantes B.1.1.519 y los identificados con linajes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2). Es importante mencionar que esta diferencia puede ser provocada por cada una de las mutaciones presentes en el gen S del virus SARS-CoV-2 en la variante B.1.1.519 (D614G, T478K, P681H y T732A), ya que 3 de estas mutaciones presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron analizadas de manera individual, lo que sugiere que sus identificaciones, tanto de manera individual, como en conjunto en la variante “mexicana” o en otros linajes virales provocan un aumento en la cantidad de células totales en este parámetro. También es importante mencionar que estos dos grupos presentaron diferencias significativas con respecto a las edades (Figura 27), por lo que es necesario complementar esta investigación para identificar si esta diferencia en el conteo de leucocitos es producto directo de las mutaciones presentes en cada una de las variantes identificadas de

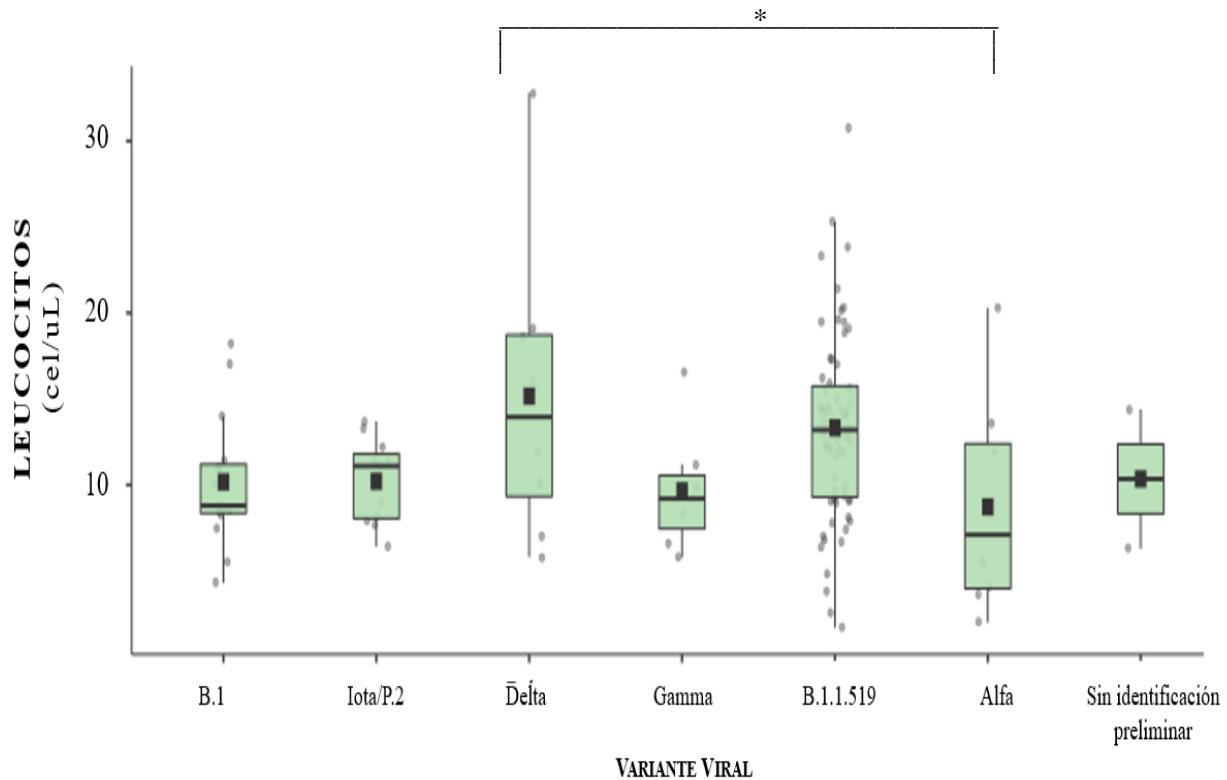


Figura 29. Leucocitos totales presentes en pacientes infectados con las variantes del virus SARS-CoV-2 identificadas de manera preliminar mediante sus mutaciones en el gen S. Con * se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de U de *Kruskall Wallis*.

manera preliminar o, por el contrario, es producto de la diferencia en las edades de estos grupos. Por otro lado, de las mutaciones presentes en las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) (D614G y E484K) únicamente la sustitución de Acido aspártico por Lisina en la posición 484 mostro diferencias significativas en su análisis individual, lo que podría indicar que es esta mutación por si sola y no su agrupación con D614G es lo que afecta el valor de leucocitos totales.

A su vez es importante mencionar que durante este periodo epidémico un porcentaje elevado de los pacientes que acudían a los servicios de salud, presentaban síntomas de enfermedad grave y muchos de ellos fallecían en un corto periodo de tiempo, por lo cual existe una elevada proporción de datos faltantes en estudios rutinarios, a lo que (Acosta *et al.*,2021) menciona que en el HRAEI en la citología hemática es del 17.95%, en la bioquímica sérica es de 20.51% y en los marcadores inflamatorios es de 32.49%. Por lo cual se requieren estudios complementarios que tenga una menor proporción de datos faltantes para que los resultados obtenidos sean más robustos.

También se realizaron pruebas estadísticas de χ^2 con un intervalo de confianza del 95% para identificar si existió relación entre la variante viral identificada de manera preeliminar, con respecto a alguna comorbilidad de los pacientes a saber: Obesidad (Figura 30), Diabetes Mellitus (Figura 31), Hipertensión (Figura 32) y Enfermedad Renal Crónica.

Del total de muestras analizadas para la identificación de las mutaciones presentes en el gen S del virus SARS CoV-2 el 8.4% (13/158) presentaron obesidad como comorbilidad distribuida entre las variantes del virus SARS-CoV-2 de la siguiente manera, para la variante B.1 de los pacientes graves el 15.4% (2/13) tubo obesidad como comorbilidad y el 9.1% (1/11) de los pacientes moderados. Para las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) el 14.3% de los pacientes graves (1/7) y el 5% de los pacientes moderados (1/20). Para la variante Delta el 33.33% de los pacientes graves (1/3) por otro lado, no se encontraron pacientes moderados con comorbilidades. Para las muestras identificadas como variante Gamma no hubo pacientes graves con esta comorbilidad. Con respecto a los pacientes con identificación preliminar de la variante B.1.1.519 el 8% (4/50) de los pacientes graves presentaron obesidad mientras que el 9.2% de los pacientes moderados (2/22) presentaron esta condición. Para los dos pacientes identificados de manera preliminar con la infección de la variante Alfa del virus SARS-CoV-2, ninguno presento obesidad como comorbilidad, por último, de los pacientes con una variante viral sin identificación preliminar solo 1 de los 4 pacientes graves presento esta comorbilidad mientras que ninguno de los pacientes con enfermedad moderada la presento.

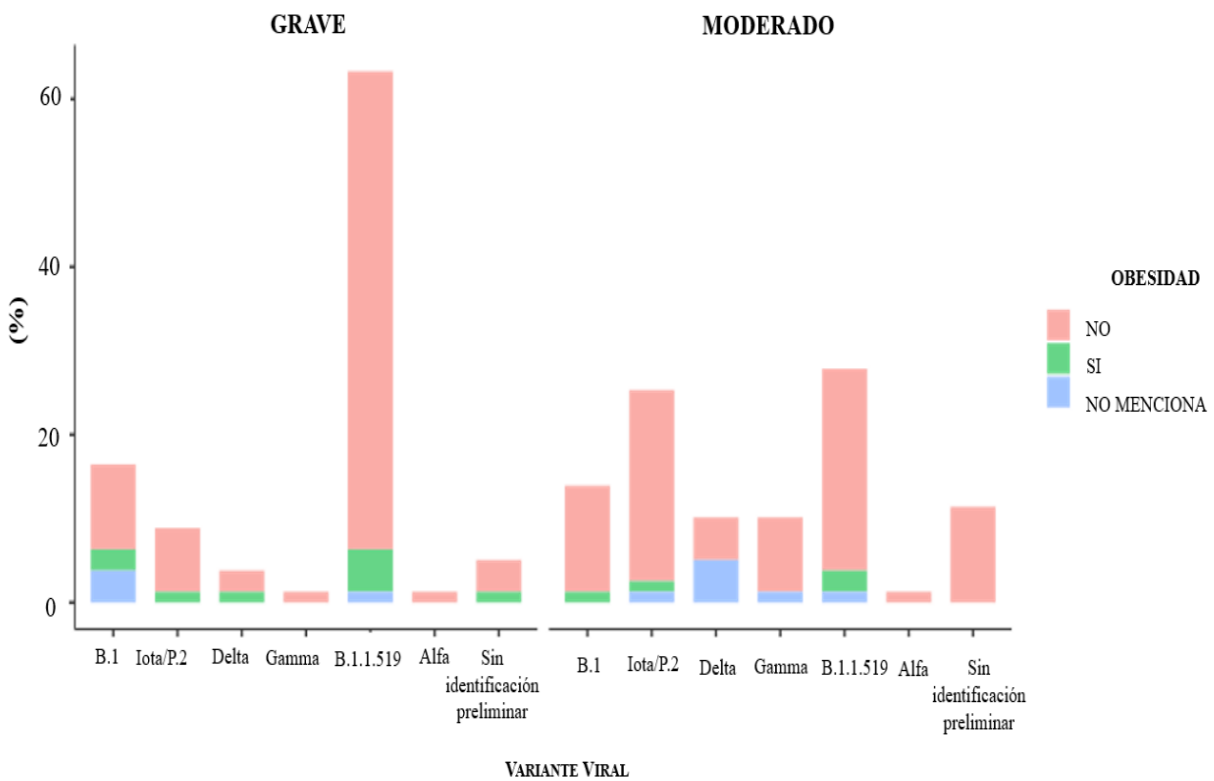


Figura 30. Porcentaje de pacientes con enfermedad grave o moderada positivos a cada variante del virus SARS-CoV-2 y su relación con la comorbilidad de obesidad.

En este sentido, el desarrollo de la enfermedad COVID-19 grave y la obesidad, ha sido referida en diferentes investigaciones, por ejemplo (Zou *et al.*, 2020.) menciona la obesidad afecta la función pulmonar de múltiples maneras, entre ellas las relacionadas con aspectos mecánicos e inflamatorios, lo que hace que los pacientes con obesidad sean más propensos a sufrir síntomas respiratorios y progresar a insuficiencia respiratoria. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.25$) entre la presencia de obesidad como comorbilidad, la variante viral y el desarrollo de síntomas graves de COVID-19. Podemos inferir con este resultado que en nuestra población de estudio, no hay evidencia para establecer una relación entre la presencia de la comorbilidad obesidad con respecto a la variante viral identificada de manera preliminar y el desarrollo de enfermedad COVID-19 grave, sin embargo también es necesario mencionar que las recientes investigaciones muestran la progresión de la obesidad, a obesidad mórbida aumenta el riesgo de ventilación mecánica y admisión a Unidad de Cuidado Intensivos (UCI) (de Leeuw *et al.*, 2021) en este sentido, la presente investigación no refleja estas distinciones entre la gravedad de esta comorbilidad, por lo que es necesario en futuras investigaciones delimitar de manera

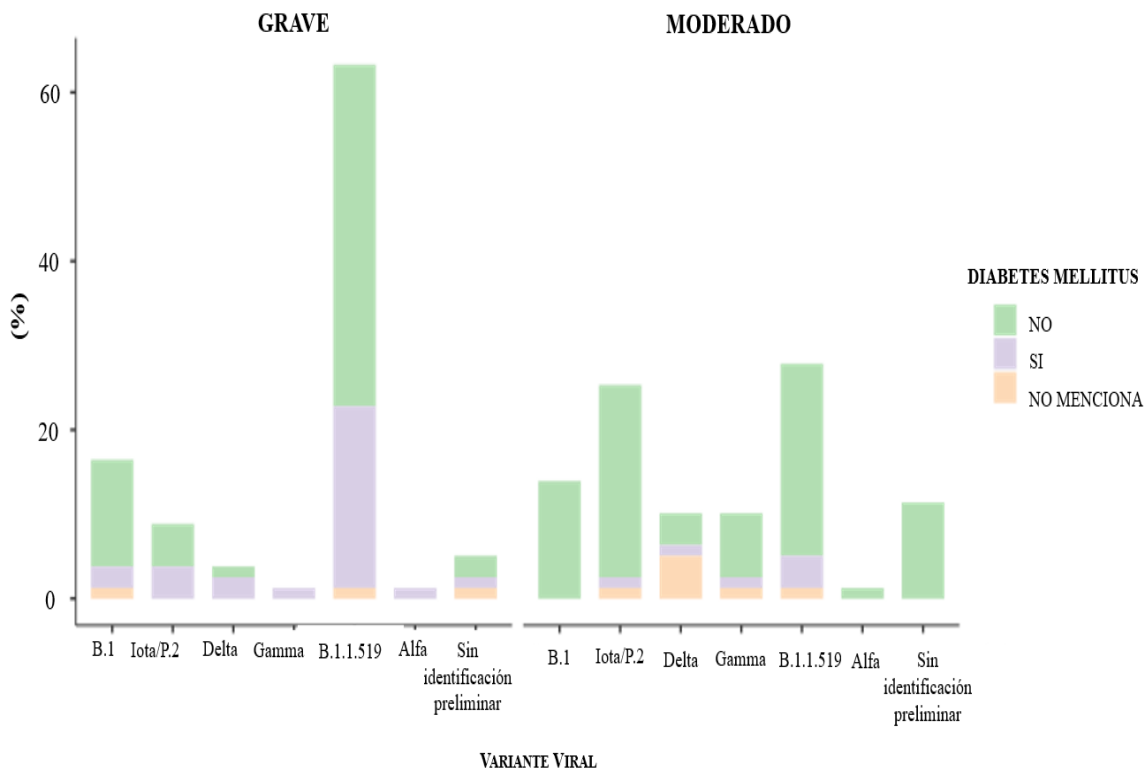


Figura 31. Porcentaje de pacientes con enfermedad grave o moderada positivos a cada variante del virus SARS-CoV-2 y su relación con la comorbilidad de Diabetes Mellitus.

estrictita el índice de masa corporal que será tomado para cada subdivisión de esta comorbilidad. Aunado a esto, el no encontrar diferencias estadísticamente significativas, puede deberse a la poca frecuencia (13/158) de pacientes con esta condición por lo que es necesario realizar estudios complementarios con una mayor frecuencia de pacientes con esta comorbilidad.

Por otra parte, la comorbilidad de diabetes mellitus en el total de nuestras muestras analizadas, tenía una frecuencia 33/158 (20.9%) distribuida entre las variantes virales de la siguiente manera; para los pacientes graves identificados con el linaje B.1, 15.4% (2/13), ninguno de los moderados. Para los pacientes graves identificados con los linajes Zeta (P.2) y Iota (B.1.236) el 42.9% (3/7) y en los moderados 5% (1/20). Para la variante Delta el 66.7% de los pacientes graves presentaron esta condición (2/3) y el 12.5% de los moderados (1/8). Para la variante Gamma el único paciente grave presentó esta comorbilidad, mientras que de los 8 pacientes moderados solo 1 presentó la condición (12.5%). En el linaje B.1.1.519 “variante mexicana” se presentó en 34% de los pacientes graves (32/50) y en el 13.6% de los pacientes moderados (3/22). Para las dos muestras identificadas con el linaje Alfa, una de ellas identificada como grave, presentó la comorbilidad, mientras que la moderada no lo presentó. De los pacientes graves con una variante viral sin identificación preliminar el 25% presentó esta comorbilidad (1/4), mientras que ninguno de los moderados tuvo diabetes mellitus. Al realizar el análisis estadístico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variantes Zeta (P.2) y Iota (B.1.236) ($p=0.048$) con el desarrollo de enfermedad grave de COVID-19.

Es importante mencionar que nuestro país tiene una alta prevalencia de Diabetes Mellitus (ENSANUT 2018). De ahí la importancia de profundizar en la fisiopatogenia y el resultado en la COVID-19. Diferentes investigaciones refieren la asociación entre esta comorbilidad y un mal pronóstico para las personas infectadas con el virus SARS-CoV-2. Por ejemplo, Zhou *et al* 2020 menciona que personas con diabetes tienen un mayor riesgo de diversas infecciones agudas y crónicas en comparación con las personas no diabéticas. A su vez que en la serie más grande informada por el centro chino para el control y la prevención de enfermedades que comprende 72 314 casos de COVID-19, los pacientes diabéticos tenían una mortalidad más alta (7,3 % en diabetes frente a 2,3 % de la población general). Además, datos recientes de Italia mostraron que más de dos tercios de los fallecidos por COVID-19

tenían diabetes. Los resultados de la presente investigación concuerdan con estas hipótesis, y apuntan a una relación entre los pacientes infectados por las variantes Zeta (P.2) y Iota (B.1.236) y con la comorbilidad de Diabetes Mellitus presenten mayor probabilidad de desarrollar síntomas graves de la enfermedad. En este sentido, de acuerdo con Zhou *et al.*, 2020 las personas con diabetes generalmente se ven afectadas por inflamación crónica de bajo grado, lo que podría facilitar las tormentas de citoquinas, y a su vez la gravedad de la enfermedad y/o muerte. Por otra parte, Guo *et al.*, 2020 indicaron que el recuento absoluto de linfocitos en pacientes diabéticos es significativamente más bajo que en aquellos sin diabetes, mientras que el recuento de neutrófilos es notablemente más alto. Esta investigación también aporta información en este sentido, pues al describir el efecto de las sustituciones D614G y E484K ambas presentes en los linajes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2). y no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de neutrófilos ni en el conteo de leucocitos totales, indica que la gravedad de los pacientes infectados con estas variantes sea provocada por la Diabetes Mellitus.

Es importante mencionar que, de acuerdo con Acosta *et al.*, 2021. Existe la controversia de si es la Diabetes Mellitus un factor de riesgo independiente para desarrollar peores resultados en los pacientes con COVID-19, o si es la suma de comorbilidades asociadas a una mayor edad y un estado de salud previo debilitado el que explica estos desenlaces. En nuestra investigación, el grupo con identificación para las variantes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) presento también diferencias estadísticamente significativas al analizar sus edades, por lo cual es necesario realizar estudios complementarios que puedan aportar más información al respecto. A su vez uno de los datos a analizar es si la diabetes está controlada o no al momento de contraer la infección por SARS-CoV-2. Esto debido a que los niveles de hemoglobina glucosilada (Hb A1c) > 9% han sido asociados a un incremento del 60% de riesgo de hospitalización y gravedad por neumonía bacteriana lo cual podría dificultar aún más la COVID-19. También, de acuerdo con Acosta *et al.*, 2021, es necesario considerar la posibilidad de subdiagnostico de diabetes, para evitar una clasificación errónea de los sujetos sin esta comorbilidad. Sin embargo, el subdiagnostico de diabetes no fue una variable a analizar en la presente investigación, por lo cual se sugiere tomarla en cuenta para futuros estudios.

Además, una de las consideraciones más importante a evaluar es el papel de los fármacos

hipoglucemiantes, pues de acuerdo con Acosta *et al.*, 2021 la metformina tiene efectos inmunomoduladores y antiproliferativos que han demostrado en tener un efecto protector a la neumonía en modelos murinos. Por ello, en futuras investigación dentro del paciente con diagnóstico diabético se debe agregar también el fármaco utilizado para el control glucémico.

Por otra parte, del total de muestras analizadas, la comorbilidad de hipertensión se presentó en 24.1% de los pacientes (38/158). Aquellos identificados para la infección por el linaje B.1, con síntomas de enfermedad grave de COVID-19 el 38.5% (5/13) presentaba esta comorbilidad y ninguno de los moderados. En el caso de infección por los linajes Zeta (P.2) y Iota (B.1.236) el 28.6% (2/7) mientras que ninguno de los moderados presentó esta condición. Para la variante Delta el 100% de los pacientes con enfermedad grave presentaron esta condición (3/3) mientras que ninguno de los moderados (0/8). De los pacientes graves identificados con infección por la variante Gamma el 100% presentó hipertensión como comorbilidad (1/1) a diferencia del 12.5% de los moderados (1/8). Los pacientes con enfermedad grave de COVID-19 identificados con infección por la variante B.1.1.519 el 46% presentaba hipertensión (23/50) mientras que solo el 9.1% (2/22) de los moderados presentaba esta comorbilidad. Para la variante Alfa, ninguno de los pacientes presentó esta comorbilidad. De aquellos pacientes con infección por una variante del virus SARS-CoV-2 sin identificación preliminar solo 1 de los pacientes moderados presentó hipertensión 11.1% (1/9).

El análisis estadístico χ^2 con 95% de significancia, demostró diferencias estadísticamente significativas para los pacientes con hipertensión e infectados con las variantes B.1 ($p=0.034$), Delta ($p=0.004$), B.1.1.519 ($p=0.01$), linajes Zeta (P.2) y Iota (B.1.236) ($p=0.04$), con respecto a aquellos que no presentaban esta comorbilidad e infectados con otras variantes. Es importante mencionar que las variantes que no presentaron diferencias estadísticamente significativas Gamma, Alfa y aquellas sin identificación preliminar tienen las mutaciones E484K, N501Y, 69/70 y D614G, el análisis individual de estas mutaciones presentó diferencias en cuanto a aquellos que no amplificaron y los negativos, por lo que con estos resultados podemos inferir que la sustitución de aminoácidos en estas variantes, tampoco son causantes de un aumento de la gravedad de la enfermedad de pacientes con hipertensión como comorbilidad.

Por otro lado, el 78.5% de los pacientes fueron identificados de manera preliminar con la infección de las variantes B.1, B.1.1.519, Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) por lo que es necesario aumenta la cantidad de pacientes analizados, con resultado positivos para el resto de las variantes y así identificar si esta diferencia con respecto a la comorbilidad de hipertensión es exclusiva para estos linajes.

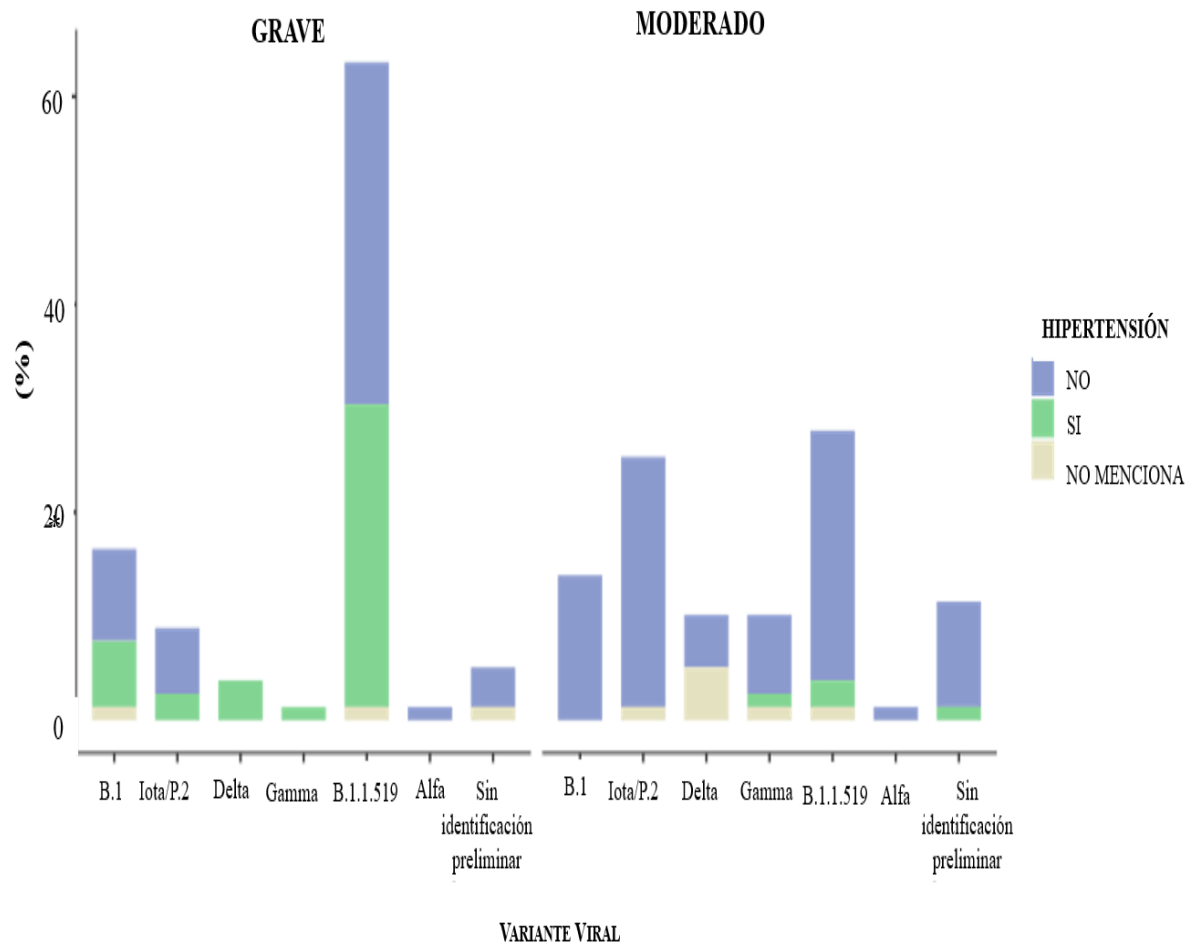


Figura 32. Porcentaje de pacientes con enfermedad grave o moderada positivos a cada variante del virus SARS-CoV-2 y su relación con la comorbilidad de hipertensión.

No obstante, debemos mencionar que, de acuerdo con Acosta *et al.*, 2021. Aunque todos los estudios coinciden con el hallazgo de que los pacientes con comorbilidades y COVID-19 tienen formas más graves de la enfermedad, los datos son menos claros cuando se intenta analizar si cada una de estas comorbilidades incrementa el riesgo de forma independiente.

Por lo cual existe la necesidad de agregar la ausencia de las comorbilidades, unas de otras para reforzar los resultados de esta y otras investigaciones.

El análisis de las defunciones (Figura 33) con respecto a las variantes identificadas de manera preliminar obtuvo los siguientes resultados, de las 24 muestras identificadas para el linaje B.1, el 54.2% desarrollaron enfermedad grave (13/24) de los cuales fallecieron el 92.3% (12/13). Para los linajes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) de las 27 muestras totales el 25.9% desarrollo enfermedad grave (7/27), de los cuales fallecieron el 85.7% (6/7), para la variante Delta del el 30% desarrollo enfermedad grave (3/10), de los cuales falleció el 100%. Para los identificados con la variante Gamma el 11.1% (1/9) desarrollo síntomas graves, el cual también falleció. De los 72 pacientes identificados con infección por la variante B.1.1.519 el 69.4% desarrollo síntomas graves (50/72), de los cuales fallecieron el 94% (47/50). El único paciente identificado con la variante Alfa, que desarrollo síntomas graves de la enfermedad COVID-19 falleció. Por último, aquellas muestras que no tuvieron identificación preliminar el 30.8% desarrollo síntomas graves (4/13) de los cuales falleció el 75% (3/4). El análisis total refiere que, de los 79 pacientes con enfermedad grave, el 92.4% falleció (73/79).

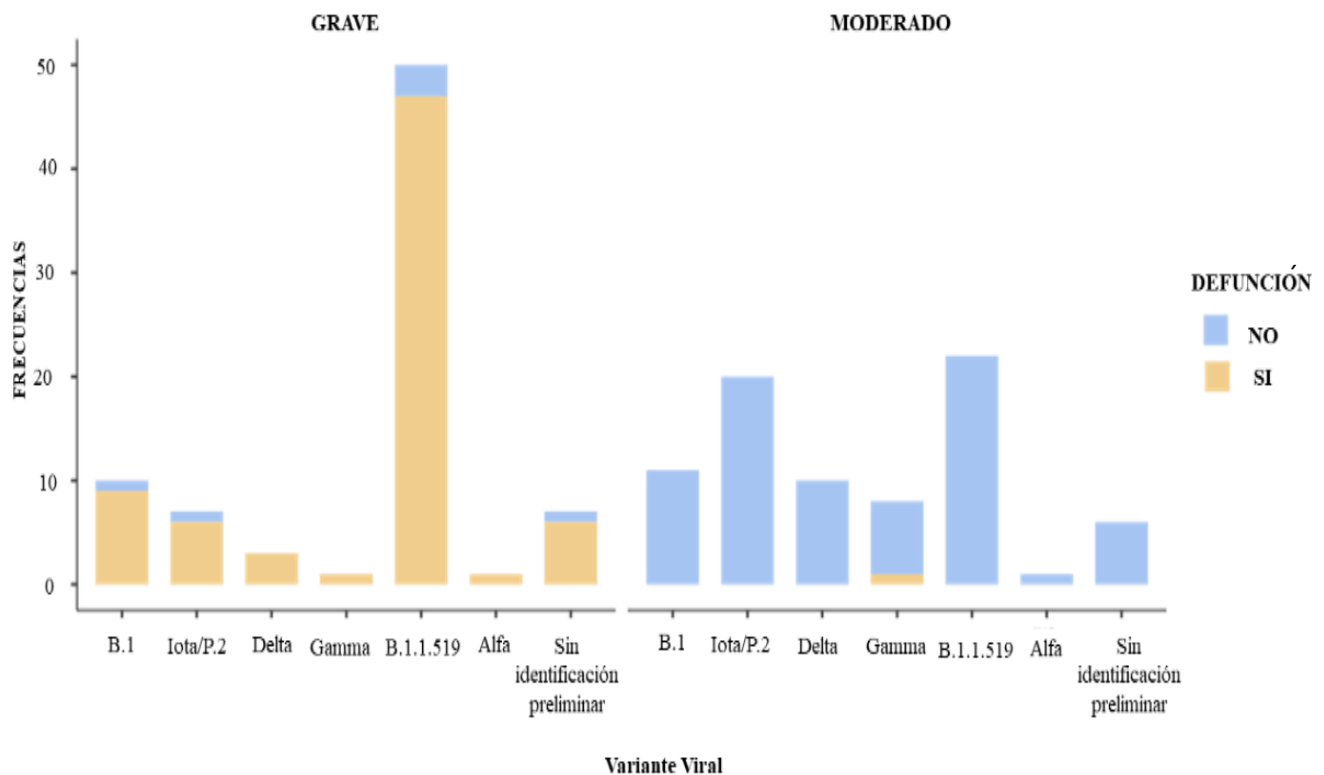


Figura 33. Frecuencias de pacientes fallecidos con enfermedad grave o moderada de COVID-19 positivos a cada variante del virus SARS-CoV-2.

Es importante mencionar, que de acuerdo a la última actualización del Monitoreo de comorbilidades en las defunciones confirmadas COVID-19 en México publicado el 18 de Noviembre del 2021 por el Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental UNAM el 44% de las personas que no presentaban comorbilidades aun así fallecieron por COVID-19, sin embargo al contrastar este dato con el porcentaje de pacientes que presentaban hipertensión como comorbilidad y fallecieron por COVID-19 el porcentaje asciende al 66%. De acuerdo con este informe la hipertensión fue la comorbilidad que presentó mayor porcentaje de defunciones, lo cual concuerda con nuestros resultados, pues la comorbilidad de hipertensión demostró diferencias estadísticamente significativas para el desarrollo de enfermedad grave.

También, de acuerdo a un estudio publicado por Acosta *et al.*, 2021 que recopila a 668 adultos con detección molecular del SARS-CoV-2 en el HRAEI menciona una tasa de letalidad del 52.4%. Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo reportado por Acosta *et al.*, 2021 sin embargo ambos datos contrastan con lo reportado a nivel estatal con una tasa de letalidad del 35.95% a lo cual menciona que la diferencia se puede deber a que el HRAEI se trata de un centro de referencia, el cual recibe pacientes canalizados de distintas instancias de atención a la salud, en particular hospitales regionales de oriente del Valle de México, en este sentido, el hecho de requerir atención hospitalaria especializada es en sí mismo una característica que puede intervenir en las observaciones realizadas en estos estudios.

10. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación permiten hacer las siguientes inferencias:

- 1.-El 89.2% de los pacientes con síntomas respiratorios fueron positivos a COVID-19 (223/250) con la prueba de RT-qPCR para la detección del virus SARS-CoV-2.
- 2.- Las características clínicas como SaO² y CORADS son útiles para clasificar a los pacientes COVID-19.
- 3.-La mutación D614G estaba presente en la mayoría de los pacientes (98.1%) (155/158) con infección por el virus SARS-CoV-2 en la primera ola de contagios de COVID-19. A su vez, las mutaciones E484K, T478K, P681H y T732A estaban presentes en frecuencias elevadas de pacientes, lo cual puede significar una ventaja infectiva.
4. -No es posible diferenciar entre los linajes Iota (B.1.526) y Zeta (P.2) utilizando únicamente las mutaciones E484K y D614G presente en el gen que codifica para la proteína S. Para distinguir entre los linajes, se recomienda incluir paneles de mutaciones de genes que codifique para otras proteínas estructurales por ejemplo N o M, a su vez que las mutaciones. Las mutaciones, T478K, P681H, T732A, K417N, N501Y, E484Q, L452R y del 69/70 presente en el genoma del virus SARS-CoV-2 en la región que codifica para la proteína S permiten distinguir entre varios linajes virales.
- 5.-La alta tasa de contagios de COVID-19 en la región del Valle de México, durante la primera ola de contagios, fue producto de las variantes B.1, B.1.1.519, Iota (B.1.526) y Zeta (P.2).Las variantes Alfa, Beta y Gamma se presentaron en pocas frecuencias, lo cual nos permite inferir que no presentaron ventajas infectivas con relación a las otras variantes.
- 6.- Realizar estudios como Biometría hemática y Dímero D de manera rutinaria para los pacientes COVID-19, permite detectar posibles casos de enfermedad grave.

11.REFERENCIAS

- 1.-Agulló, V., Fernández-González, M., Ortiz de la Tabla, V., Gonzalo-Jiménez, N., García, J. A., Masiá, M. & Gutiérrez, F. (2021). Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study. *Journal of Infection*, 82(5), 186-230. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.12.007>
- 2.-Asselta, R., Paraboschi, E. M., Mantovani, A. & Duga, S. (2020). ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Aging*, 12(11), 10087-10098. <https://doi.org/10.18632/aging.103415>
- Abdul Aleem, Abdul Bari Akbar Samad & Amy K. Slenker. (2021). *Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)*. StatPearls Publishing, 01, 01.
- 3.-Alcón Calderón, María Mercedes; Jiménez Ruiz, Antonio (2020) Identificación de dianas terapéuticas contra la infección por SARS-CoV-2. *dianas 9 (2): e202009fa01*. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa01](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa01) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa01>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>
- 4.-Aleem, A., Akbar Samad, A. B., & Slenker, A. K. (2022). *Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)*. (Vol. 1). StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>
- 5.-Almehdi, A. M., Khoder, G., Alchakee, A. S., Alsayyid, A. T., Sarg, N. H., & Soliman, S. S. M. (2021). SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection*, 49(5), 855–876. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01677-8>
- 6.-Alwani, M., Yassin, A., Al-Zoubi, R. M., Aboumarzouk, O. M., Nettleship, J., Kelly, D., AL-Qudimat, A. R. & Shabsigh, R. (2021). Sex-based differences in severity and mortality in COVID-19. *Reviews in Medical Virology*, 31(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.2223>
- 7.-Araf, Y., Akter, F., Tang, Y., Fatemi, R., Parvez, M. S. A., Zheng, C., & Hossain, M. G.

(2022). Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.27588>

8.-Ascencio-Montiel, I. D. J., Ovalle-Luna, O. D., Rascón-Pacheco, R. A., Borja-Aburto, V. H. & Chowell, G. (2022). Comparative epidemiology of five waves of COVID-19 in Mexico, March 2020–August 2022. *BMC Infectious Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07800-w>

9.-Azkur, A. K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M., Veen, W., Brügggen, M., O'Mahony, L., Gao, Y., Nadeau, K. & Akdis, C. A. (2020, julio). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 75(7), 1564-1581. <https://doi.org/10.1111/all.14364>

10.-Barona-Gómez, F., Delaye, L., Díaz-Valenzuela, E., Plisson, F., Cruz-Pérez, A., Díaz-Sánchez, M., García-Sepúlveda, C. A., Sanchez-Flores, A., Pérez-Abreu, R., Valencia-Valdespino, F. J., Vega-Magaña, N., Muñoz-Valle, J. F., García-González, O. P., Bernal-Silva, S., Comas-García, A. & Cibrián-Jaramillo, A. (2021). Phylogenomics and population genomics of SARS-CoV-2 in Mexico during the pre-vaccination stage reveals variants of interest B.1.1.28.4 and B.1.1.222 or B.1.1.519 and the nucleocapsid mutation S194L associated with symptoms. *Microbial Genomics*, 7(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000684>

11.- Boechat, J., Chora, I., Morais, A. & Delgado, L. (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. *Pulmonology*, 27(5), 423-437. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008>

12.-Bjerregaard, A., Laing, I. A., Backer, V., Sverrild, A., Khoo, S. K., Chidlow, G., Sikazwe, C., Smith, D. W., Le Souëf, P. & Porsbjerg, C. (2017). High fractional exhaled nitric oxide and sputum eosinophils are associated with an increased risk of future virus-induced exacerbations: A prospective cohort study. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(8), 1007-1013. <https://doi.org/10.1111/cea.12935>

- 13.-Bloemen, M., Rector, A., Swinnen, J., Ranst, M. V., Maes, P., Vanmechelen, B. & Wollants, E. (2022, junio). Fast detection of SARS-CoV-2 variants including Omicron using one-step RT-PCR and Sanger sequencing. *Journal of Virological Methods*, 304, 114512. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114512>
- 14.- Bustin, S. A. & Nolan, T. (2020). RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3004. <https://doi.org/10.3390/ijms21083004>
- 15.-Cedro-Tanda, A., Gómez-Romero, L., Alcaraz, N., de Anda-Jauregui, G., Peñaloza, F., Moreno, B., Escobar-Arazola, M. A., Ramirez-Vega, O. A., Munguia-Garza, P., Garcia-Cardenas, F., Cisneros-Villanueva, M., Moreno-Camacho, J. L., Rodriguez-Gallegos, J., Luna-Ruiz Esparza, M. A., Fernández Rojas, M. A., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., Campos-Romero, A., Angulo, O., . . . Herrera, L. A. (2021b). The Evolutionary Landscape of SARS-CoV-2 Variant B.1.1.519 and Its Clinical Impact in Mexico City. *Viruses*, 13(11), 2182. <https://doi.org/10.3390/v13112182>
- 16.-Chams, N., Chams, S., Badran, R., Shams, A., Araj, A., Raad, M., Mukhopadhyay, S., Stroberg, E., Duval, E. J., Barton, L. M., & Hajj Hussein, I. (2020). COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00383>
- 17.-Chen, J., Wang, R., Wang, M. & Wei, G. W. (2020). Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *Journal of Molecular Biology*, 432(19), 5212-5226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.009>
- 18.-Chen, Y., Klein, S. L., Garibaldi, B. T., Li, H., Wu, C., Osevala, N. M., Li, T., Margolick, J. B., Pawelec, G. & Leng, S. X. (2021). Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Research Reviews*, 65, 101205. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101205>

- 19.-Choi, J. Y., & Smith, D. M. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Medical Journal*, 62(11), 961. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>
- 20.-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología & Centro de Investigación en Ciencias de Información Geoespacial. (2020, marzo). COVID-19 Tablero México: <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>
- 21.-Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). (2020, 11 febrero). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-omicron-variant.html>
- 22.-COVID-19 Tablero México. (s. f.). COVID - 19 Tablero México. Tomado el 30 de octubre de 2022, de <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>
- 23.- de Leeuw, A. J. M., Oude Luttikhuis, M. A. M., Wellen, A. C., Müller, C. & Calkhoven, C. F. (2021). Obesity and its impact on COVID-19. *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02072-4>
- 24.-Di Giacomo, S., Mercatelli, D., Rakhimov, A. & Giorgi, F. M. (2021). Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *Journal of Medical Virology*, 93(9), 5638-5643. <https://doi.org/10.1002/jmv.27062>
- 25.-Duarte, C. M., Jamil, T., Gojobori, T. & Alam, I. (2021, agosto). Detection of SARS-CoV-2 variants requires urgent global coordination. *International Journal of Infectious Diseases*, 109, 50-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.027>
- 26.-Eckerle, L. D., Lu, X., Sperry, S. M., Choi, L., & Denison, M. R. (2007). High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants. *Journal of Virology*, 81(22), 12135–12144. <https://doi.org/10.1128/jvi.01296-07>
- 27.-Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (s. f.). ENCUESTAS.

<https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut100k2018/index.php>

Exceso de Mortalidad en México – Coronavirus. (s. f.). <https://coronavirus.gob.mx/exceso-de-mortalidad-en-mexico/>

28.-Forster, P., Forster, L., Renfrew, C. & Forster, M. (2020, 8 abril). Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9241-9243. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004999117>

29.-Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., & Ciccozzi, M. (2021). Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>

30.-Graudenzi, A. (2022, junio). Early detection and improved genomic surveillance of SARS-CoV-2 variants from deep sequencing data. *iScience*, 25(6), 104487. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104487>

31.-Guo, W., Li, M., Dong, Y., Zhou, H., Zhang, Z., Tian, C., Qin, R., Wang, H., Shen, Y., Du, K., Zhao, L., Fan, H., Luo, S. & Hu, D. (2020). Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID -19. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(7). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3319>

32.-Gupta, R. K. (2021). Will SARS-CoV-2 variants of concern affect the promise of vaccines? *Nature Reviews Immunology*, 21(6), 340–341. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00556-5>

33.-Gandhi, R. T., Lynch, J. B. & del Rio, C. (2020). Mild or Moderate Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1757-1766. <https://doi.org/10.1056/nejmcp2009249>

34.-Gustavo Acosta Altamirano. et al (2021). ESTRATEGIAS DEL HRAEI ANTE EL RETO COVID-19 (Primera edición,2021, Vol. 1).

https://issuu.com/liderazgoexperienciamedica/docs/libro_hraei_al_22_oct_2020__issu

35.-Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>

36.-He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., & Wei, X. (2021). SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm*, 2(4), 838–845. <https://doi.org/10.1002/mco2.110>

37.-Hodcroft, E. (2022). CoVariants. <https://covariants.org>/Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

38.-Ioannidis, J. P., Axfors, C. & Contopoulos-Ioannidis, D. G. (2020). Population-level COVID-19 mortality risk for non-elderly individuals overall and for non-elderly individuals without underlying diseases in pandemic epicenters. *Environmental Research*, 188, 109890. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109890>

39.-Jafarzadeh, A., Chauhan, P., Saha, B., Jafarzadeh, S. & Nemati, M. (2020). Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: Lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. *Life Sciences*, 257, 118102. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118102>

40.-Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A. & Barvkar, V. T. (2021, 18 enero). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, 61(3), 180-202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>

41.-Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Lu, J. M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H. G., Scheres, S.

- H. W., Bartenschlager, R. & Briggs, J. A. G. (2020). Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, 588(7838), 498-502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- 42.-Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
- 43.-Kumar, A., Prasoon, P., Kumari, C., Pareek, V., Faiq, M. A., Narayan, R. K., Kulandhasamy, M. & Kant, K. (2020). SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(3), 1343-1350. <https://doi.org/10.1002/jmv.26615>
- 44.-Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L. & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- 45.-Latif, A. A., Mullen, J. L., Alkuzweny, M., Hufbauer, E., Tsueng, G., Haag, E., Zeller, M., Aceves, C. M., Zaiets, K., Cano, M., Zhou, J., Qian, Z., Sattler, R., Matteson, N. L., Levy, J. I., Lee, R. T., Freitas, L., Maurer-Stroh, S., . . . Hughes, L. D. (2022). Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. <https://doi.org/10.1101/2022.01.27.22269965>
- 46.-Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Li, M., Lou, F., & Fan, H. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern Delta: a great challenge to prevention and control of COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00767-1>.
- 47.-Lindsley, A. W., Schwartz, J. T. & Rothenberg, M. E. (2020). Eosinophil responses

during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.021>

48.-Mistry, P., Barmania, F., Mellet, J., Peta, K., Strydom, A., Viljoen, I. M., James, W., Gordon, S. & Pepper, M. S. (2022b). SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.809244>

49.-O'Toole, I., Scher, E., Underwood, A., Jackson, B., Hill, V., McCrone, J. T., Colquhoun, R., Ruis, C., Abu-Dahab, K., Taylor, B., Yeats, C., Du Plessis, L., Maloney, D., Medd, N., Attwood, S. W., Aanensen, D. M., Holmes, E. C., Pybus, O. G. & Rambaut, A. (2021). Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evolution*. <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>

50.-Palladino, M. (2021). Complete blood count alterations in COVID-19 patients. *Biochimica medica*, 31(3), 403-415. <https://doi.org/10.11613/bm.2021.030501>

51.-Peterson, S. W., Lidder, R., Daigle, J., Wonitowy, Q., Dueck, C., Nagasawa, A., Mulvey, M. R. & Mangat, C. S. (2022). RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69–70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples. *Science of The Total Environment*, 810, 151283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151283>

52.-Pillay, T. S. (2020, 6 mayo). Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *Journal of Clinical Pathology*, 73(7), 366-369. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206658>

53.- Thomas, E., Delabat, S., Carattini, Y. L. & Andrews, D. M. (2021). SARS-CoV-2 and Variant Diagnostic Testing Approaches in the United States. *Viruses*, 13(12), 2492. <https://doi.org/10.3390/v13122492>

54.-Rodríguez-Maldonado, A. P., Vázquez-Pérez, J. A., Cedro-Tanda, A., Taboada, B., Boukadida, C., Wong-Arámbula, C., Nuñez-García, T. E., Cruz-Ortiz, N., Barrera-Badillo,

G., Hernández-Rivas, L., López-Martínez, I., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., Alcaraz, N., Peñaloza-Figueroa, F., Gonzalez-Barrera, D., Rangel-DeLeon, D., Herrera-Montalvo, L. A., Mejía-Nepomuceno, F., . . . Ramírez-González, J. E. (2021). Emergence and spread of the potential variant of interest (VOI) B.1.1.519 of SARS-CoV-2 predominantly present in Mexico. *Archives of Virology*, 166(11), 3173-3177. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05208-6>

55.-Rostami, M. & Mansouritorghabeh, H. (2020). D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. *Expert Review of Hematology*, 13(11), 1265-1275. <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1831383>

56.-Salazar Montes, A. M., Sandoval Rodríguez, A. S., & Armendáriz Borunda, J. S. (2022). *Biología Molecular. Fundamentos Y Aplicaciones En Ciencias (1.a ed.)*. MCGRAW HILL EDDUCATION.

57.-Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. (2022). Análisis situacional de la epidemia en México. Todo sobre el COVID-19. Tomado el 1 de septiembre de 2022, de <https://coronavirus.gob.mx/analisis-situacional-de-la-epidemia-en-mexico/>

58.-Taboada, B., Zárate, S., García-López, R., Muñoz-Medina, J. E., Sanchez-Flores, A., Herrera-Estrella, A., Boukadida, C., Gómez-Gil, B., Selem Mojica, N., Rosales-Rivera, M., Salas-Lais, A. G., Gutiérrez-Ríos, R. M., Loza, A., Rivera-Gutierrez, X., Vazquez-Perez, J. A., Matías-Florentino, M., Pérez-García, M., Ávila-Ríos, S., Hurtado, J. M., . . . Arias, C. F. (2022). Dominance of Three Sublineages of the SARS-CoV-2 Delta Variant in Mexico. *Viruses*, 14(6), 1165. <https://doi.org/10.3390/v14061165>

59.-Takano, K., Watanabe, Y., Hariu, M. & Seki, M. (2021). Detection of Representative Mutant Strains and a Case of Prolonged Infection by SARS-CoV-2 with Spike 69/70 Deletion in Japan. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 2579-2581. <https://doi.org/10.2147/idr.s320658>

60.-Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D. & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*, 22(12), 757-773. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>

61.-Teng, S., Sobitan, A., Rhoades, R., Liu, D. & Tang, Q. (2020). Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Briefings in Bioinformatics*, 22(2), 1239-1253. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa233>

62.-The Economist. (2020, 16 marzo). Understanding SARS-CoV-2 and the drugs that might lessen its power. <https://www.economist.com/briefing/2020/03/12/understanding-sars-cov-2-and-the-drugs-that-might-lessen-its-power>

63.-V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

64.-Wang, H., Jean, S., Eltringham, R., Madison, J., Snyder, P., Tu, H., Jones, D. M. & Leber, A. L. (2021, 19 julio). Mutation-Specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike L452R Mutation. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(8). <https://doi.org/10.1128/jcm.00926-21>

65.-Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S. & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>

66.-Yamada, T., Wakabayashi, M., Yamaji, T., Chopra, N., Mikami, T., Miyashita, H. & Miyashita, S. (2020). Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Clinica*

Chimica Acta, 509, 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.008>

67.-Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., Wang, Y., Baum, A., Diehl, W. E., Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, S. B., Schaffner, S. F., Lemieux, J. E., Munro, J. B., Rafique, A., Barve, A., Sabeti, P. C., Kyratsous, C. A., . . . Luban, J. (2020). Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell*, 183(3), 739-751.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>

68.-Zárate, S., Taboada, B., Muñoz-Medina, J. E., Iša, P., Sanchez-Flores, A., Boukadida, C., Herrera-Estrella, A., Selem Mojica, N., Rosales-Rivera, M., Gómez-Gil, B., Salas-Lais, A. G., Santacruz-Tinoco, C. E., Montoya-Fuentes, H., Alvarado-Yaah, J. E., Molina-Salinas, G. M., Espinoza-Ayala, G. E., Enciso-Moreno, J. A., Gutiérrez-Ríos, R. M., Loza, A., . . . Arias, C. F. (2022). The Alpha Variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 Failed to Become Dominant in Mexico. *Microbiology Spectrum*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02240-21>

69.-Zhou, Y., Chi, J., Lv, W. & Wang, Y. (2020). Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid -19). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 37(2). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3377>

12.ANEXOS**ANEXO 1. PROTOCOLO DE PREPARACION DE MEDIO RPMI 1640****Materiales**

- 1.- Matraz Aforado de 1L estéril
- 2.- 2 Frascos estéril de 500mL con Tapa
- 3.- Probeta Graduada de 500mL estéril
- 4.- RPMI 1640 Medium, powder (#31800014)
- 5.- Bolsa de 1L de Agua Estéril
- 6.- 2g de Bicarbonato de Sodio (por cada litro de medio).
- 7.- Unidades de Filtración
- 8.-Bomba de vacío
- 9.- Embudo de cristal estéril

Método

- 1.- Con la probeta colocar 500mL de agua estéril en el matraz aforado de 1L.
- 2.- Adicionar la totalidad del sobre RPMI 1640 en el matraz aforado de 1L.
- 3.-Mezclar ligeramente con movimientos circulares.
- 4.- Agregar 2g de Bicarbonato de sodio.
- 5.- Aforar el matraz a 1L y mezclar nuevamente hasta que se disuelva la totalidad del polvo RPMI 1640
- 6.- Conectar la bomba de vacío y colocar la unidad de filtración.
- 7.- Vaciar con cuidado el contenido del matraz aforado a la unidad de filtración.
- 8.- Depositar en frascos de 500mL y rotular con nombre del medio, fecha de preparación e iniciales de quien preparo.

NOTA: Inmediatamente después de preparar el medio se adiciona la preparación de Antibiótico-antimicótico (Anti-Anti).

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE ANTI-ANTI (ANTIMICÓTICO- ANTIBIÓTICO) PARA MEDIOS DE TRANSPORTE.

Material y Equipo:

- 1.- Solución de Anfotericina B a $0.25 \frac{mg}{mL}$
- 2.- Frasco ampolla liofilizado de Vancomicina de 250 mg
- 3.- Pipeteador eléctrico
- 4.- Pipeta graduada de 5 mL
- 5.- Jeringa con capacidad de 5 mL
- 6.- Agua Inyectable
- 7.- Tubo falcón de 15 mL

NOTA: Es indispensable verificar la concentración del antibiótico y antimicótico para una adecuada preparación del Anti-Anti

Para Vancomicina

- 1.- Sacar de refrigeración a $-20^{\circ}C$ el Frasco ampolla con Vancomicina de 250 mg Liofilizada.
- 2.- Hidratar la Vancomicina con 5 mL de Agua inyectable Verificar el correcto sellado de la bolsa de agua para la esterilización, para ello tomar con la jeringa 5 mL de Agua Inyectable y depositar lentamente sobre el frasco de Vancomicina.
- 3.- Con cuidado Homogeneizar la solución.
- 4.- Realizar los cálculos para la Concentración de Vancomicina.
- Partiendo de la Concentración inicial de 250 mg + 5 mL de Agua Inyectable, entonces la concentración de Vancomicina será de $50 \frac{mg}{mL}$
- 5.- Realizar los cálculos necesarios considerando que la concentración deseada de Vancomicina es de $100 \frac{\mu g}{mL}$ y el volumen final para la preparación de los medios de transporte es de 500 mL

Al tener una concentración inicial de $50 \frac{mg}{mL}$ y una desea en $\frac{\mu g}{mL}$ es esencial tener todos los datos en el mismo sistema de unidades, por lo tanto.

$$50 \frac{mg}{mL} \times \frac{1000\mu g}{1mg} = \frac{50,000\mu g}{1mL}$$

Para el cálculo del Volumen a depositar en el medio de transporte utilizar la formula $CiVi = CfVf$ y despejar $Vi = \frac{Ci \times Vf}{Cf}$

Por lo tanto $Vi = \frac{100 \frac{\mu g}{mL} \times 500 \text{ mL}}{50,000 \frac{\mu g}{mL}}$ Entonces $Vi = 1 \text{ mL}$

NOTA IMPORTANTE: La vancomicina será nuestro reactivo limitante debido a su hidratación previa, se deben de agregar los mL necesarios de Anfotericina B para aprovechar la totalidad de la vancomicina preparada y considerando que la relación entre Antibiótico y Antimicótico es de 1:1

6.- Recuperar los 5 mL de la solución ya hidratada de Vancomicina y depositar en un tubo Falcon de 15 mL

Para Anfotericina B

1.- Realizar los cálculos considerando que la concentración deseada de *Anfotericina B* sea de $0.5 \frac{\mu g}{mL}$

- Partiendo de la concentración inicial de $0.25 \frac{mg}{mL}$ por lo tanto $0.25 \frac{mg}{mL} \times \frac{1000 \mu g}{1 mg} = 250 \frac{\mu g}{mL}$

-Considerar que el volumen final de la preparación será de 500 mL para dispensar en los medios de transporte.

-Utilizar la formula $CiVi = CfVf$ y despejar $Vi = \frac{Ci \times Vf}{Cf}$

-Por lo tanto $Vi = \frac{250 \frac{\mu g}{mL} \times 500 \text{ mL}}{0.5 \frac{\mu g}{mL}}$ Entonces $Vi = 1 \text{ mL}$.

2.- Limpiar el área de trabajo Etanol al 70%.

3.- Con el pipeteador eléctrico tomar 5 mL de Anfotericina B a $0.25 \frac{mg}{mL}$ y depositar en un el tubo Falcon de 15 mL con Vancomicina.

ANEXO 4. Frecuencias de las mutaciones identificadas mediante los kits MASTERMUT6 y MASTER MUT SARS-CoV-2 en pacientes positivos a infección por SARS-CoV-2 mediante RT-qPC.

Mutación	Resultado	Frecuencias	Porcentaje del total (%)	Gravedad de la COVID-19	Frecuencias por grupo	Porcentaje por grupo (%)
D614G	POSITIVO	155	98.10	GRAVE	78	49.4
				MODERADO	77	48.7
	NEGATIVO	2	1.26	GRAVE	1	0.6
				MODERADO	1	0.6
	N/A	0	0	GRAVE	0	0
				MODERADO	1	0.6
T478K	POSITIVO	89	56.3	GRAVE	52	32.9
				MODERADO	37	23.4
	NEGATIVO	78	39.9	GRAVE	25	15.8
				MODERADO	38	24.1
	N/A	15	3.8	GRAVE	2	1.3
				MODERADO	4	2.5
P681H	POSITIVO	65	41.1	GRAVE	49	31
				MODERADO	16	10.1

Mutación	Resultado	Frecuencias	Porcentaje del total (%)	Gravedad de la COVID-19	Frecuencias por grupo	Porcentaje por grupo (%)	
	NEGATIVO	78	49.4	GRAVE	18	11.4	
				MODERADO	60	38.0	
	N/A	15	9.5	GRAVE	12	7.6	
				MODERADO	3	1.8	
	T732A	POSITIVO	77	48.7	GRAVE	54	34.2
					MODERADO	23	14.6
NEGATIVO		55	34.8	GRAVE	8	5.1	
				MODERADO	47	29.7	
N/A		26	16.5	GRAVE	17	10.8	
				MODERADO	9	5.7	
K417N	POSITIVO	22	13.9	GRAVE	18	11.4	
				MODERADO	4	2.5	
	NEGATIVO	121	76.6	GRAVE	47	29.7	
				MODERADO	74	46.8	
	N/A	15	13.9	GRAVE	14	8.9	
				MODERADO	1	0.6	
N501Y	POSITIVO	15	9.5	GRAVE	3	1.9	

Mutación	Resultado	Frecuencias	Porcentaje del total (%)	Gravedad de la COVID-19	Frecuencias por grupo	Porcentaje por grupo (%)
	NEGATIVO	110	76.6	MODERADO	12	7.6
				GRAVE	47	29.7
	N/A	33	13.9	MODERADO	43	39.9
				GRAVE	29	18.4
	POSITIVO	101	63.9	MODERADO	4	2.5
				GRAVE	46	19.1
E484K	NEGATIVO	52	32.9	MODERADO	55	34.8
				GRAVE	31	19.6
	N/A	5	3.2	MODERADO	21	13.3
				GRAVE	2	1.3
	POSITIVO	16	10.1	MODERADO	3	1.9
				GRAVE	11	7.0
E484Q	NEGATIVO	119	75.3	MODERADO	5	3.2
				GRAVE	47	29.7
	N/A	23	14.6	MODERADO	72	45.6
				GRAVE	21	13.3
	POSITIVO			MODERADO	2	1.3
				GRAVE		

Mutación	Resultado	Frecuencias	Porcentaje del total (%)	Gravedad de la COVID-19	Frecuencias por grupo	Porcentaje por grupo (%)
L452R	POSITIVO	16	10.1	GRAVE	2	1.3
				MODERADO	14	8.9
	NEGATIVO	111	70.3	GRAVE	47	29.7
				MODERADO	64	40.5
	N/A	31	19.6	GRAVE	30	19.0
				MODERADO	1	0.6
Del69/70	POSITIVO	13	8.2	GRAVE	2	1.3
				MODERADO	11	7.0
	NEGATIVO	111	70.3	GRAVE	47	29.7
				MODERADO	64	40.5
	N/A	34	21.5	GRAVE	30	19.0
				MODERADO	4	2.5

ANEXO 3. Frecuencias de las variantes virales identificadas de manera preliminar.

Variante	Frecuencias	Porcentaje del total (%)	Gravedad de la COVID-19	Frecuencias por grupo	Porcentaje por grupo (%)
B.1	24	15.2	GRAVE	13	8.2
			MODERADO	11	7.0
Iota/P.2	27	17.1	GRAVE	7	4.4
			MODERADO	20	12.7
B.1.1.519	72*	45.6	GRAVE	50	31.6
			MODERADO	22	13.9
Delta	11	7	GRAVE	3	1.9
			MODERADO	8	5.1
Gamma	9	5.7	GRAVE	1	0.6
			MODERADO	8	5.1
Alfa	2	1.2	GRAVE	1	0.6
			MODERADO	1	0.6
Sin identificación preliminar	13	8.2	GRAVE	4	2.5
			MODERADO	9	7.2