

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estudio retrospectivo de variantes de SARS-CoV-2 circulantes en Guatemala entre abril y agosto 2021 mediante la detección de siete mutaciones en el gen S de la proteína de espícula

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Ivanna Estela López Ayala  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

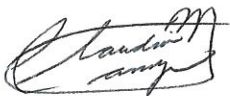


Estudio retrospectivo de variantes de SARS-CoV-2 circulantes en Guatemala entre abril y agosto 2021 mediante la detección de siete mutaciones en el gen S de la proteína de espícula


Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Ivanna Estela López Ayala  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2023


Vo.Bo.:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Carranza

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Carranza

(f) *Patrizia Lupo*  
\_\_\_\_\_  
Dra. Patrizia Lupo

(f)   
\_\_\_\_\_  
Dr. Diego Archila

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2023.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a quienes han sido pilares fundamentales en el camino hacia la culminación de este proyecto académico.

A Dios, quien ha sido mi guía constante a lo largo de mi vida. Le agradezco por abrirme las puertas en cada oportunidad, por darme la fuerza necesaria para no rendirme en momentos difíciles, por brindarme claridad en medio de la incertidumbre y por bendecirme con personas maravillosas que han sido un impulso constante en mi crecimiento personal y profesional.

A mis queridos padres, Iván López y Blanca Estela Ayala de López, les debo un agradecimiento especial por su amor incondicional, apoyo constante y por ser mis mayores aliados. Desde mi infancia, han sido mi fuente de inspiración, impulsándome a alcanzar mis metas y sueños. Su amor, soporte emocional y aliento constante me han guiado en cada fase de mi vida. A mi mamá, por dedicarse a mi crianza, cuidado y ser mi gran motivación. A mi papá, por todo su esfuerzo, trabajo y cariño.

A mis amadas hermanas, Sara y María, les agradezco por ser fuentes de inspiración y por ayudarme a crecer como persona y profesional. Asimismo, les agradezco por ser un modelos a seguir de dedicación y determinación. Su apoyo incondicional ha sido invaluable en cada paso de mi trayectoria.

A mi sobrina Irina, agradezco que haya avivado mi fascinación por la ciencia. Su asombro y curiosidad constantes han recordado las maravillas que engloba la ciencia.

Agradezco a mis catedráticos y directores por las valiosas lecciones impartidas y su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica. Asimismo, les agradezco el apoyo y comprensión en momentos clave en mi desarrollo profesional.

A mis asesores, Dra. Claudia Carranza y Dr. Diego Archila, les agradezco por contribuir en el desarrollo de esta investigación. Su orientación y acompañamiento fueron fundamentales para el éxito de este proyecto. Agradezco a Tecniscan por proporcionar el equipo y materiales necesarios para llevar a cabo mi investigación. Agradezco al equipo de Tecniscan que estuvo presente y presentó siempre buena disposición durante mi pasantía. A Mariana Herrera, mi gratitud por supervisarme y entrenarme durante mis prácticas profesionales en Tecniscan. Su guía fue esencial en el desarrollo de mis habilidades.

A Dra. Pamela Pennington, Dra. Krisztina Ríos-González y Dra. Patrizia Lupo, por apoyare en durante la carrera universitaria, con apoyo incondicional durante mis intercambios y actividades extracurriculares y por ser mis mentoras en el proceso.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTADO DE CUADROS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>IX</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	2
III. ANTECEDENTES .....	3
IV. OBJETIVOS.....	4
A. <i>Objetivo general</i> .....	4
B. <i>Objetivos específicos</i> .....	4
V. MARCO TEÓRICO .....	5
A. <i>Estructura y patogénesis de SARS-CoV-2</i> .....	6
B. <i>Proteína de espícula</i> .....	7
C. <i>Variantes de interés (VOI)</i> .....	8
1. Variante Épsilon (B.1.427/B.1.429/EE.UU.).....	9
2. Variante Kappa (B.1.617.1/India).....	9
3. Variante Iota (B.1.526/EE.UU) .....	9
D. <i>Variantes de preocupación (VOC)</i> .....	9
1. Variante Alfa (B.1.1.7/Reino Unido).....	10
2. Variante Beta (B.1.351/Sudáfrica).....	10
3. Variante Gamma (B.1.1.28/P.1/Brasil).....	10
4. Variante Delta (B.1.617.2/India) .....	10
E. <i>Mutaciones e implicaciones</i> .....	10
1. Mutación E484K.....	11
2. Mutación K417N .....	11
3. Mutación N501Y .....	12
4. Mutación K417T.....	12
5. Mutación P681R .....	13
6. Mutación L452R.....	13
7. Mutación E484Q.....	13
F. <i>SARS-CoV-2 en Guatemala</i> .....	14
VI. METODOLOGÍA.....	16
A. <i>Análisis de resultados y clasificación de variantes</i> .....	16
1. Análisis de resultados obtenidos con Variant I y Variant II.....	16
B. <i>Análisis estadístico</i> .....	19
C. <i>Aspectos Éticos</i> .....	21
VII. RESULTADOS .....	22
A. <i>Identificación de variantes de SARS-CoV-2 según la presencia y/o ausencia de mutaciones en la proteína de espícula</i> .....	22

B.	<i>Existe una relación entre el mes de obtención de la muestra y la variante identificada, mas no de la edad y sexo biológico del paciente</i>	23
C.	<i>Análisis gráfico de la frecuencia de cada mutación y variantes respecto al mes de obtención de la muestra demuestra prevalencia de las mutaciones L452R y P681R, así como la alta incidencia de las variantes Épsilon y Delta</i>	25
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y HALLAZGOS	29
A.	<i>Mes de obtención de la muestra y su relación con variantes y mutaciones observadas</i>	30
B.	<i>Observaciones sobre el sexo biológico</i>	30
C.	<i>Lecciones sobre la tendencia observada en edad</i>	31
D.	<i>Muestras donde no se detectó ninguna mutación</i>	31
E.	<i>Mutaciones L452R y P681R</i>	32
F.	<i>Vigilancia genómica: Deficiencias y lecciones aprendidas</i>	33
G.	<i>Limitaciones del estudio</i>	34
IX.	CONCLUSIONES	35
X.	RECOMENDACIONES	37
XI.	REFERENCIAS	38
XII.	ANEXOS	54
ANEXO 1.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	54
ANEXO 2.	OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ARN	55
Anexo 2.1.	Método de extracción automatizada	55
Anexo 2.2.	Método de extracción por calor (Genoud et al., 2021)	56
Anexo 2.3.	Método de extracción por calor y proteinasa K (PK) (Genoud et al., 2021)	57
ANEXO 3.	CUANTIFICACIÓN DE ARN	57
ANEXO 4.	RT PCR MULTIPLEX	59
Anexo 4. 1.	Preparación de control positivo liofilizado	59
Anexo 4. 2.	Protocolo de PCR (Viasure, 2021)	59
	<b>INFORMACIÓN DE CONTACTO</b>	<b>70</b>

## LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DEL GENOMA DE SARS-CoV-2. ....	5
FIGURA 2 PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2: ESTRUCTURA Y ROL EN ENTRADA A LA CÉLULA. ....	7
FIGURA 3 FRECUENCIA DE MUTACIONES Y VARIANTES. ....	26
FIGURA 4 FRECUENCIA DE INDICADORES BIOLÓGICOS EN LOS CASOS ESTUDIADOS .....	28

## LISTADO DE CUADROS

CUADRO 1 FRECUENCIAS DE LINAJES ENCONTRADOS EN MUESTRAS SECUENCIADAS OBTENIDAS ENTRE MARZO Y MAYO 2021(MSPAS, 2021B).....	15
CUADRO 2 FRECUENCIAS DE LINAJES ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS SECUENCIADAS OBTENIDAS ENTRE JUNIO Y JULIO 2021(MSPAS, 2021A).....	15
CUADRO 3 IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES SEGÚN MUTACIONES ENCONTRADAS CON VARIANT I Y VARIANT II .....	17
CUADRO 4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIAS INDIVIDUALES DE PACIENTES PARA VARIANT I.....	17
CUADRO 5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIAS INDIVIDUALES DE PACIENTES PARA VARIANT II .....	19
CUADRO 6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES A ANALIZAR .....	20
CUADRO 7 VARIANTES O MUTACIONES IDENTIFICADAS MEDIANTE RT-QPCR.....	23
CUADRO 8 CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO Y DIFERENCIA SEGÚN VARIABLE.....	24
CUADRO 9 ANÁLISIS POST HOC PARA PRUEBA DE X <sup>2</sup> DE PEARSON.....	25
CUADRO 10 PRUEBA DE X <sup>2</sup> DE PEARSON Y ANÁLISIS POST HOC PARA PRUEBA DE X <sup>2</sup> DE PEARSON PARA ASOCIACIÓN ENTRE MES DE OBTENCIÓN DE MUESTRA Y MUTACIONES L452R Y P681R .....	27
CUADRO 11 PREPARACIÓN DE DYE Y BUFFER PARA CUANTIFICACIÓN DE ARN POR QUANTIFLUOR PARA MUESTRAS DE ALTA CONCENTRACIÓN .....	58
CUADRO 12 PREPARACIÓN DE DYE Y BUFFER PARA CUANTIFICACIÓN DE ARN POR QUANTIFLUOR PARA MUESTRAS DE BAJA CONCENTRACIÓN.....	58
CUADRO 13 PROTOCOLO DE PCR PARA TERMOCICLADOR .....	60
CUADRO 14 RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS ESTUDIADAS E IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES.....	60

## RESUMEN

La pandemia de COVID-19 fue causada por el virus SARS-CoV-2, un virus de ARN. Desde su descubrimiento en 2019. SARS-CoV-2 ha demostrado que sufre mutaciones de manera espontánea durante la replicación. La frecuencia en la que se observan mutaciones en una población viral es un reflejo de la variación genética que depende de procesos como selección natural, deriva genética aleatoria y recombinación. La tasa de mutación depende de la replicación, el daño y la edición y su capacidad de reparación del contenido genético. Debido al alto número de casos, el virus ha tenido múltiples oportunidades para replicarse, lo que se traduce a una mayor cantidad de eventos de mutación, dando como resultado una amplia gama de variantes con diferentes características. Asimismo, hay un incremento el número de eventos de cambios de nucleótidos en el genoma respecto a la replicación viral, transmisión y evasión del sistema inmune debido a selección natural en la población. Existen mutaciones que influyen sobre la forma en la que interactúa el receptor con la proteína de espícula, dado que afectan las características fisicoquímicas como las interacciones en el dominio de unión al receptor, por ejemplo. Estas pueden incrementar la avidéz entre el receptor de la célula hospedera y la proteína S, facilitando la entrada del virus a la célula. Asimismo, las mutaciones en la proteína S pueden aportar a la capacidad del virus de evadir el sistema inmune, reducir la eficacia de la neutralización por anticuerpos adquiridos por infecciones previas, vacunación y/o suero de pacientes convalecientes. Con el surgimiento de mutaciones que promueven la evasión del sistema inmune, las células T generadas mediante exposición previa o vacunación no reconocen las variantes, por lo que deben generar nuevas poblaciones de memoria. Las variantes han sido clasificadas en variantes de preocupación y variantes de interés según sus mutaciones y las características que adquiere el virus con dichas mutaciones. En Guatemala, se han hecho monitoreos de las variantes de SARS-CoV-2, dirigidos principalmente por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. No obstante, el enfoque ha sido restringido al reporte de las variantes disponibles y ha habido poco enfoque en las mutaciones observadas, pese a ser, en gran proporción, una de las razones por las cuales incrementa la transmisibilidad, evasión del sistema inmune, entre otros factores. Este estudio busca identificar las variantes y mutaciones de SARS-CoV-2 circulantes en Guatemala entre abril y agosto 2021. El estudio es de naturaleza retrospectiva y se realiza con el fin de proveer información sobre cómo se distribuyeron las variantes circulantes en cada mes y la frecuencia de las mutaciones durante el período mencionado, bajo el contexto de

Guatemala. Entre abril y agosto de 2021, se estudiaron 161 muestras de pacientes ambulantes de Guatemala. En ellas se identificó la presencia destacada de las variantes Delta y Épsilon. Aunque la edad y el sexo no influyeron significativamente sobre las variantes observadas; sin embargo, sí se observó una diferencia significativa según el mes de obtención de la muestra. No obstante, el análisis gráfico demostró que podrían existir factores sociales no considerados que podrían causar la alta frecuencia observada en ciertos grupos de edad. Asimismo, respecto al sexo biológico, se resalta que podrían haber diferencias en los cuadros clínicos y se recomienda que en futuras instancias la vigilancia genómica mediante secuenciación se complemente con Las mutaciones P681R y L452R en estas variantes tienen implicaciones importantes, como un aumento en la infectividad y la evasión de respuestas inmunológicas. El estudio subraya la importancia de la vigilancia genómica y el beneficio de complementar la secuenciación genómica con estrategias como el monitoreo de mutaciones mediante RT-qPCR y métodos de extracción de bajo costo en Guatemala.

## I. INTRODUCCIÓN

SARS-CoV-2 causa la enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19). Esta ha tenido un efecto devastador en la demografía mundial, causando más de 6 millones de muertes. SARS-CoV-2 desencadenó la crisis de salud global más grave desde la era de la pandemia de la en 1918, mejor conocida como “gripe española”. Después de los primeros casos en Wuhan, China, en 2019, se diseminó rápidamente alrededor del mundo en un período corto que llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declararla una pandemia global en marzo de 2020 (Al-Awwal et al., 2022). La pandemia de COVID-19 ha causado crisis en los sistemas de salud y sistemas económicos por la alta afluencia de casos en hospitales y centros de salud públicos y confinamientos prolongados, respectivamente. Pese a los avances en la investigación clínica sobre este virus y el manejo de esta enfermedad, el virus y sus variantes siguen siendo una causa de preocupación (Holmes et al., 2021). Como otros virus de ARN, el SARS-CoV-2 puede adquirir mutaciones a lo largo del tiempo y es propenso a evolución genética. Esto resulta en variantes que pueden tener características distintas a las de las cepas anteriores. Las variantes de SARS-CoV-2 han sido descritas a lo largo de la pandemia y se han considerado como variantes de preocupación por la OMS, dado a su impacto en la salud pública (Beig Parikhani et al., 2021). La emergencia de nuevas variantes de SARS-CoV-2 amenaza con afectar el progreso alcanzado hasta la fecha para combatir la propagación del virus por medio de jornadas de vacunación y refuerzos (Lechien & Saussez, 2022). El obtener información sobre la presencia, la frecuencia y el comportamiento de las variantes de SARS-CoV-2 ayuda a comprender el desarrollo del virus en Guatemala y provee datos relevantes de los cuales se podrían aprender lecciones para enfrentar de manera más eficiente los brotes de patógenos virales emergentes.

## II. JUSTIFICACIÓN

Hasta 2021, se habían reportado cinco principales variantes de preocupación (VOC): alfa, beta, gamma, delta y ómicron. La variante Alfa se destacó por una mayor transmisibilidad viral que su predecesora. La variante beta era conocida por ser más difícil de neutralizar con plasma obtenido de pacientes convalecientes y una reducida eficacia de vacunas. La variante gamma podía causar enfermedad incluso cuando las personas habían padecido una infección natural y contaba con una capacidad moderada de evasión a la respuesta inmune. La variante delta fue más transmisible que las variantes previas. Se sabe que el virus SARS-CoV-2 posee mecanismos de evolución. La comprensión del comportamiento del virus, como lo es su transmisión y evasión frente al sistema inmune, es un prerrequisito para predecir las variantes emergentes (J. Chen et al., 2021). Existe un monitoreo de variantes en Guatemala realizado para la emisión de comunicados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Este cuenta con información de las proporciones de variantes y número de muestras obtenidas en varias semanas de 2020 hasta 2023. El reporte de variantes de SARS-CoV-2 en Guatemala incluye variantes de preocupación y de interés. Existen un alto número de muestras cuyo resultado es “Otro” y no se indica la presencia o ausencia de mutaciones que puedan influir en la transmisibilidad, efectividad de las vacunas, evasión frente a la respuesta inmune, entre otros. Asimismo, los resultados comunicados por el MSPAS y el Laboratorio Nacional de Salud han tenido poco acompañamiento por parte de otras entidades en el país, por lo que la información disponible es limitada (*Vigilancia Genómica SARS-CoV-2*, n.d.). El Ministerio de Salud realizó un trabajo en conjunto con el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) de Panamá. No obstante, la muestra empleada para representar a 1 país fueron 50 muestras. De este reporte, se indicó que en Guatemala hubo presencia de las variantes alfa, beta, delta, gamma, épsilon, iota, lambda y ausencia de variantes eta, kappa, theta y zeta (Ocote & Rivas, 2021). Por lo tanto, el estudio retrospectivo sobre variantes de SARS-CoV-2 resulta necesaria para proveer información adicional sobre las variantes del virus y la determinación de la presencia o ausencia de mutaciones relevantes para la diseminación del virus y la efectividad de las medidas tomadas durante la pandemia como lo son el confinamiento, las jornadas de vacunación, entre otras.

### III. ANTECEDENTES

Las prácticas profesionales fueron realizadas en el Centro de Diagnóstico TecniScan, ubicado en el Boulevard Vista Hermosa 25-19 zona 15, Edificio Multimédica nivel 1. TecniScan es un centro especializado que cuenta con un laboratorio de microbiología molecular y un laboratorio de genética molecular humana. El laboratorio de microbiología molecular realiza pruebas especializadas de diagnóstico. Entre las pruebas de rutina que realiza es la prueba de SARS-CoV-2 utilizando RT-PCR como herramienta. En TecniScan, sin embargo, la identificación de variantes de SARS-CoV-2 no es un procedimiento de rutina. Como parte de las prácticas profesionales, llevadas a cabo en diciembre 2022 y enero 2023, se realizó el procesamiento de muestras de hisopado nasofaríngeo obtenidas entre abril y agosto 2021 para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (Anexo 1). Las muestras de hisopado nasofaríngeo utilizadas se encontraban identificadas por un código aleatorio, por lo que no se tuvo acceso a información identificable del paciente. Con el fin de reducir el costo de extracción, se optimizó un protocolo de extracción mediante calor y proteinasa K (Anexo 2). Las muestras fueron procesadas utilizando los kits Variant I y Variant II marca Viasure. Variant I es capaz de identificar cuatro mutaciones: E484K, K417N, K417T y N501Y (Anexo 4). Variant II puede identificar tres mutaciones: P681R, L452R y E484Q (Anexo 4). No obstante, es necesario realizar la clasificación de las variantes según los resultados de la amplificación. Asimismo, se requiere de análisis estadístico para determinar si las variantes detectadas tienen un efecto estadísticamente claro sobre el Ct de diagnóstico. Finalmente, se propone presentar los resultados de mutaciones y variantes obtenidas según el mes de toma de la muestra en 2021. Asimismo, se propone realizar un análisis estadístico con el fin de determinar el tamaño del efecto de otras variables tales como la edad y el sexo del paciente.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. Objetivo general

- Identificar las variantes de SARS-CoV-2 presentes en hisopados nasofaríngeos de secuencias de muestras tomadas entre abril y agosto 2021 en Guatemala y procesadas en 2022.

##### B. Objetivos específicos

- Identificar variantes de SARS-CoV-2 según la presencia y/o ausencia de las mutaciones E484K, K417N, K417T, N501Y, P681R, L452R y E484Q en la proteína de espícula.
- Determinar influencia de la edad, el sexo biológico y/o el mes de obtención de la muestra sobre la variante identificada o mutación observada.
- Determinar si existe relación entre la frecuencia de cada mutación y variantes respecto al mes en el que fueron identificadas en Guatemala.

## V. MARCO TEÓRICO

Existen siete virus de la familia Coronaviridae capaces de infectar humanos. Estos están clasificados en subgrupos alfa y beta. Entre ellos pueden mencionarse 229E (alfa), NL63 (alfa), OC43 (beta), HKU1 (beta). Sin embargo, en los últimos 20 años han surgido coronavirus beta como coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002; coronavirus del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) en 2011 y, SARS-CoV-2 en 2019 (CDC, 2020a). Estos coronavirus han ganado importancia en las últimas dos décadas y hoy se consideran una de las causas de enfermedades infecciosas emergentes, pese a que eran previamente asociados únicamente a enfermedades como el resfriado común (*Emerging and Reemerging Infectious Disease Threats - ClinicalKey*, n.d.). Se ha encontrado que SARS-CoV-2 es un virus zoonótico estrechamente relacionado con los coronavirus encontrados en poblaciones de murciélagos y pangolines y a SARS-CoV-2. Sin embargo, aún no se ha determinado la fuente zoonótica de SARS-CoV-2 (Vasireddy et al., 2021). Se ha hipotetizado también la transmisión de humano a humano en tasas no detectables dado que la proteína de espícula o *spike* (S) de SARS-CoV-2 contiene un sitio polibásico y mutaciones en la proteína S que los coronavirus del murciélago y el pangolín no poseen (*The Proximal Origin of SARS-CoV-2 | Nature Medicine*, n.d.).

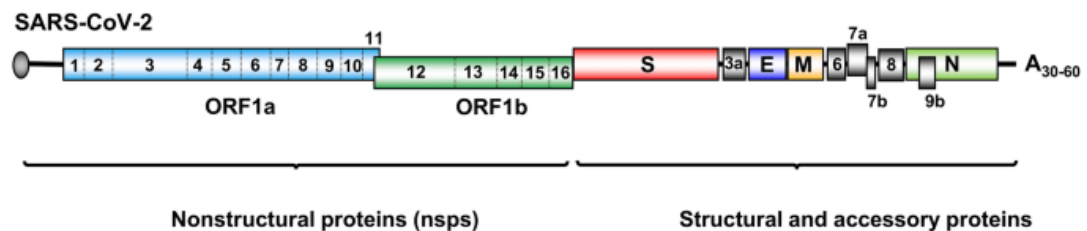


Figura 1 Estructura del genoma de SARS-CoV-2.

N: nucleocápside, M: membrana, S: espícula, E: envoltura, RDRP: polimerasa dependiente de arn; ORF: open reading frame o marco abierto de lectura (SARS-CoV-2 From its Discovery to Genome Structure, Transcription, and Replication | Cell & Bioscience | full text, n.d.)

## A. Estructura y patogénesis de SARS-CoV-2

La estructura genética de SARS-CoV-2 está compuesta de 13 a 15 *Open Reading Frames* (ORFs) o marcos abiertos de lectura que contienen alrededor de 30,000 nucleótidos. En su genoma existen once genes que codifican proteínas y doce proteínas expresadas (Naqvi et al., 2020). Los ORF1a y ORF1b potencialmente codifican proteínas no estructurales (nsps) llamadas pp1a y pp1ab, las cuales son poliproteínas que corresponden a NSP1-NSP11 y NP12-NP16, respectivamente (Yadav et al., 2021). Estas proteínas no estructurales podrían estar involucradas en la represión de sistema inmune e inhibición de la expresión de proteínas (Yuan et al., 2021).

SARS-CoV-2 es un virus envuelto de forma esférica que contiene cuatro proteínas estructurales: nucleocápside (N), membrana (M), espícula (S) y envoltura (E) (Figura 1). Es un virus de ARN orientado en dirección 5' a 3' o en sentido positivo. La proteína S causa la adhesión del virus a la célula hospedera en el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Los receptores ACE2 son numerosos en células alveolares. Una vez unida la proteína S a los receptores, ocurre una fusión de la membrana lipídica del virus con la membrana celular del hospedero, resultado en la internalización del virus (Figura 2). La maquinaria de la célula hospedera traduce el ARN viral y lidera la producción de replicasa y proteínas estructurales. En el retículo endoplásmico y aparato de Golgi del hospedero, se lleva a cabo el ensamblaje de nuevos viriones (Atri et al., 2020; Cascella et al., 2022). SARS-CoV-2 tiene la capacidad de detener la producción de proteínas en la célula hospedera con el fin de evadir el sistema inmune y optimizar la replicación del virus. Para detener la producción de proteínas propias del hospedero, el virus utiliza mecanismos de inhibición de ARNm tras la transcripción, bloqueo del tráfico nuclear de ARNm y aceleración de la degradación del ARNm (M. Chen et al., 2022).

El objetivo principal durante la infección de SARS-CoV-2 es el tracto respiratorio. Las primeras células afectadas por SARS-CoV-2 durante una infección natural en humanos inicia por células multiciliadas en el tracto nasofaríngeo o la tráquea o células de la mucosa nasal olfatoria. La producción de las proteínas virales es iniciada por el genoma de ARN monocatenario positivo (M. Khan et al., 2021). Las fábricas de replicación se dan en vesículas de doble membrana que protegen los intermediarios de ARN de doble hebra (dsRNA) de la detección mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en el citoplasma. MDA5 es un PRR capaz de detectar a SARS-CoV-2. Cuando este detecta dsRNA en el citoplasma activa la producción de interferones de tipo I y III. Los interferones y quimioquinas son producidas también por células epiteliales vecinas y células inmune locales. La señalización por interferones puede resultar en una respuesta antiviral

mediada por el sistema inmune(Fehr & Perlman, 2015). La producción de citoquinas también promueve las respuestas adaptativas de las células T y B que contribuyen a la eliminación del virus. De no ser eliminado, SARS-CoV-2 se disemina del tracto respiratorio superior al inferior o por el árbol traqueobronquial. En el tracto respiratorio inferior puede diseminarse hasta alcanzar una infección alveolar, causando inflamación y limitando el intercambio gaseoso(V'kovski et al., 2021).

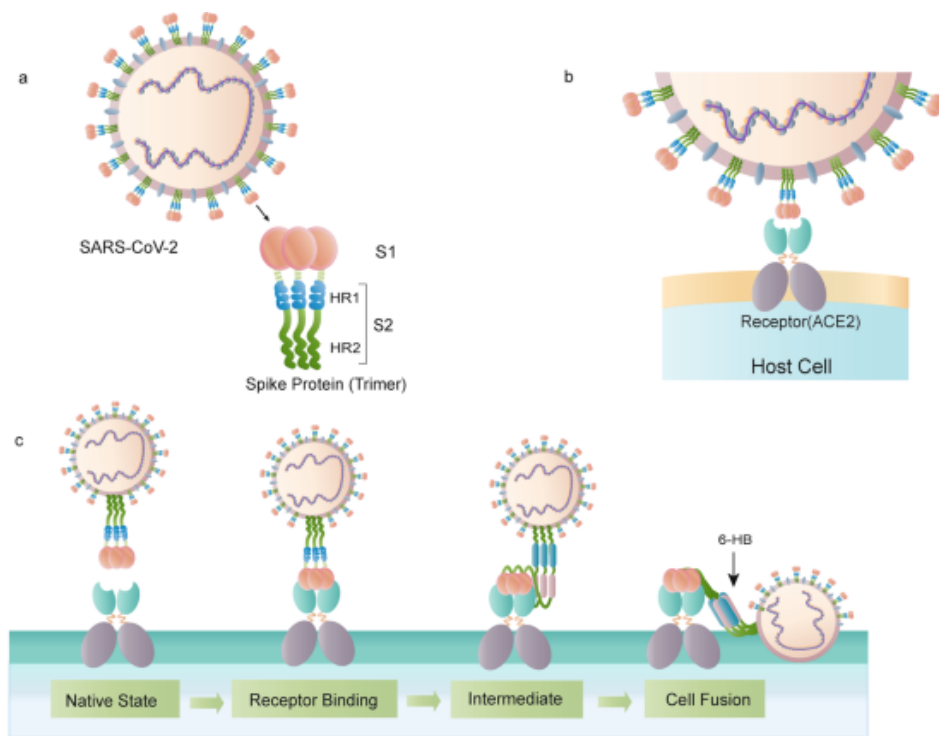


Figura 2 Proteína S de SARS-CoV-2: estructura y rol en entrada a la célula.

A-Esquema de la estructura de la proteína S B- Unión a receptor ACE. C- Fusión célula-virus mediada por la proteína S (Fehr & Perlman, 2015)

## B. Proteína de espícula

La proteína de espícula o proteína S es una proteína estructural glicosilada que cubre la superficie de SARS-CoV-2 y que puede unirse al receptor de la enzima ACE2. La unión al receptor, la serina 2 de la proteasa TM (TMPRSS2), ubicada en la membrana de la célula hospedera, promueve la entrada a la célula mediante la activación de la proteína S (Fehr & Perlman, 2015). La proteína S tiene un tamaño de entre 180 y 200 kDa y consiste de un extremo N-terminal extracelular, un dominio transmembranal (TM) anclado a la membrana viral y un segmento corto

intracelular C-terminal (Bosch et al., 2003). La proteína de espícula existe en una conformación estable, la cual sufre un rearrreglo cuando el virus interactúa con la célula hospedera. Las espículas poseen polisacáridos que contribuyen a su camuflaje y evasión de la vigilancia del sistema inmune del hospedero. La proteína S de SARS-CoV-2 es de alrededor de 1273 aminoácidos y posee un péptido de señalización ubicado en el extremo N-terminal y dos subunidades responsables de la unión a la membrana y fusión, S1 y S2 (Yang et al., 2022). Las subunidades S1 (14-685 residuos) y S2 (686-1273 residuos) (Huang et al., 2020). Las espículas están recubiertas con polisacáridos que contribuyen a su capacidad de evasión del sistema inmune durante la entrada a la célula hospedera (Huang et al., 2020).

La proteína S del SARS-CoV-2 es empleada por el virus para unirse a los receptores celulares del hospedero objetivo. Dicha unión desencadena eventos que llevan a la fusión de la membrana celular y viral para la entrada del virus (Figura 2)<sup>1</sup>. Información de estudios previos han descrito que la interacción entre la proteína de espícula y el receptor ACE2 inducen la disociación de S1 con ACE2, lo cual lleva a que S2 transite de la pre-fusión a una post-fusión más estable (Fehr & Perlman, 2015; Letko et al., 2020). Tras unirse al receptor, la proteasa del hospedero corta la espícula, lo que facilita la entrada al virus.

Existe una región de la proteína de espícula llamada dominio de unión al receptor (RBD). Esta proteína es capaz de mediar la interacción del virus y la célula hospedera (Letko et al., 2020). Mutaciones en RBD pueden ser consideradas una adaptación interespecífica durante la transmisión de SARS-CoV-2. Las mutaciones en RBD estabilizan la estructura de la espícula y un decremento en la unión a los anticuerpos producidos después de la vacunación (Sheahan et al., 2008).

### C. Variantes de interés (VOI)

Las variantes de interés son aquellas variantes con marcadores específicos que se asocian a cambios en la unión al receptor, una reducida neutralización por anticuerpos desarrollada contra una infección previa o por vacunación, reducción de la eficacia de tratamientos o un potencial impacto en el diagnóstico o un aumento en la transmisibilidad de la enfermedad (*SARS-CoV-2 Variants of Concern as of 12 January 2023*, n.d.).

### 1. Variante Épsilon (B.1.427/B.1.429/EE.UU.)

En 2021, se descubrió la nueva variante épsilon de SARS-CoV-2 y fue reportada en Estados Unidos(W. Zhang et al., 2021). Esta contiene mutaciones en la proteína S en S13I, W152C y L452R. Las mutaciones en su proteína de espícula causaron preocupación respecto a la transmisibilidad, patogenicidad y el efecto sobre la eficacia de la vacuna(Plummer et al., 2022). Esta variante presentó un aumento en su transmisibilidad y fue reportada por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) como variante de interés. Épsilon demostró evolución convergente con la variante delta dado que adquirieron la mutación L452R de manera independiente(Kimura et al., 2022).

### 2. Variante Kappa (B.1.617.1/India)

En 2020, los números de muertes en India por COVID-19 fueron causadas en gran proporción por las variantes B.1.617 y B.1.618, las cuales contiene mutaciones en su proteína de espícula(Cherian et al., 2021; Ren et al., n.d.). La variante Kappa, lleva la mutación E514K en su dominio N-terminal de la proteína S, L452R y E484Q en su RBD y la mutación P681R cerca de la zona de corte de la furina(*CoVariants*, n.d.-c). Por sus características fue designada como una VOI por la Organización Mundial de la Salud. Kappa tiene una reducida sensibilidad a los anticuerpos neutralizantes y a los inhibidores de la entrada de células hospederas(Ren et al., n.d.).

### 3. Variante Iota (B.1.526/EE.UU)

La variante Iota fue identificada por primera vez en Nueva York en diciembre 2020(Duerr et al., n.d.). Esta variante contiene la mutación E484K y S477N en su proteína S. Para Iota, la neutralización mediante plasma de pacientes convalecientes o vacunas fue 4.1 o 3.3-3.6 veces menor comparada con la cepa salvaje (*wild-type*, WT)(Annavajhala et al., 2021). -

### D. Variantes de preocupación (VOC)

Una variante de SARS-CoV-2 es considerada de preocupación cuando posee un aumento en la transmisibilidad, causa una enfermedad más severa, requiera más de hospitalizaciones o muertes, tiene una reducción significativa en la neutralización por anticuerpos generados durante infecciones o reducida efectividad de tratamientos y fallos medicinas y diagnósticos.

#### 1. Variante Alfa (B.1.1.7/Reino Unido)

La variante alfa está asociada con múltiples mutaciones en la proteína S, entre las cuales se puede mencionar N501Y, Y144- y P681H(Muik et al., 2021). Esta variante ha presentado poca neutralización por anticuerpos con una baja reducción de usando suero e pacientes convalecientes. La evidencia sugiere un aumento del riesgo de muerte por la variante alfa(Muik et al., 2021).

#### 2. Variante Beta (B.1.351/Sudáfrica)

La variante Beta fue anunciada en diciembre 2020 originada en Sudáfrica. Esta fue asociada a múltiples mutaciones en la proteína Spike entre las cuales N501T, K417N, E848K pueden ser mencionadas(Tegally et al., 2021).

#### 3. Variante Gamma (B.1.1.28/P.1/Brasil)

La variante Gamma fue descrita por primera vez en noviembre de 2020 en Brasil. Se ha estimado que es 1-7-2.4 veces más transmisible que otras variantes. Las mutaciones en su proteína de espícula le permiten una unión más fácil a células humanas (Duong, 2021). Contiene las mutaciones N501Y y E484K(*CoVariants*, n.d.-a).

#### 4. Variante Delta (B.1.617.2/India)

La variante Delta fue detectada en India en finales de 2020 y dominó en el resto del mundo. La variante Delta cuenta con mutaciones en L452R, P681R y T478K(*CoVariants*, n.d.-b). Una de las principales características fue su rápida diseminación del virus y causa síntomas similares a aquellos de una gripe(Zhan et al., 2022).

#### E. Mutaciones e implicaciones

Los errores en el genoma que ocurren durante el proceso de replicación llevan al surgimiento de mutaciones que dan origen a las variantes. SARS-CoV-2 es propenso a evolución genética que resulta en el origen de múltiples variantes con características distintas respecto a las cepas ancestrales. La secuenciación genómica periódica del virus es esencial durante una pandemia porque contribuye a la detección de nuevas variantes del virus. Existen variantes con transmisibilidad incrementada pero reducida severidad del cuadro clínico que causa. Existen otras variantes descritas como variantes de preocupación (VOCs), por sus siglas en inglés) debido a una potencialmente mejorada transmisibilidad o virulencia, reducción en la neutralización por

anticuerpos obtenida durante una infección natural o vacunación, mejorada habilidad de evadir detección o una reducida efectividad de vacunas o tratamientos (Cascella et al., 2022; Oreshkova et al., 2020). Las variantes también han sido clasificadas como variantes de interés (VOIs), las cuales cuentan con marcadores genéticos específicos que están asociados a diferentes cambios que podrían causar una mejora en la virulencia, reducción de la neutralización por anticuerpos y efectividad de vacunas y medicamentos y una mejora en su habilidad de evadir la detección(*Tracking SARS-CoV-2 Variants*, n.d.).

#### 1. Mutación E484K

La mutación E484K se caracteriza por una sustitución de un ácido glutámico (E) por una lisina (K) en la posición 484 del RBD. Esta mutación está presente en múltiples variantes y surgió sucesivamente en diferentes regiones geográficas, especialmente Sudamérica y Sudáfrica(Yang et al., 2022). La primera vez que esta mutación fue identificada fue en la variante Beta (B.1.351) en Sudáfrica, en la variante Alfa (B.1.1.7) en el Reino Unido y la variante Gamma (P.1) en Brasil. Estas variantes han sido clasificadas como VOC y se determinó que tenían una mayor transmisibilidad, tasas de mortalidad y una reducida susceptibilidad a vacunas (*Tracking SARS-CoV-2 Variants*, n.d.). Este intercambio introduce un puente de hidrógeno adicional entre la proteína S y el RBD. Este puente reduce la constante de disociación ACE2-RBD, lo cual incrementa la fuerza del complejo ACE2-E484K, lo cual provee de una mejor capacidad de anclaje comparado con el virus silvestre. Los nuevos puentes de hidrógenos formados y una mayor fuerza de unión proveen mayor afinidad al complejo RBD-ACE2. Como consecuencia, se da un incremento en la infectividad y rapidez de propagación de la variante de SARS-CoV-2(M. Khan et al., 2021). Asimismo, la posición 484 es de gran importancia en el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes, lo cual tiene un efecto negativo en las interacciones de los anticuerpos con el RBD(Wang et al., 2021).

#### 2. Mutación K417N

Caracterizada por el reemplazo de un residuo de lisina (K) por una asparagina (N). Esta mutación, si bien no contribuye a la unión con el receptor ACE2, ocurre en un epítipo para anticuerpos neutralizantes. Su emergencia podría estar asociada con el potencial de las VOCs para escapar de diferentes clases de anticuerpos monoclonales y suero de pacientes convalecientes, el cual había presentado protección contra formas severas de COVID-19(Pondé, 2022). Desde una perspectiva fisicoquímica, la mutación K417N tiene un efecto sobre la fuerza de unión del RBD-

ACE2 por la pérdida de los puentes salinos entre K416 del RBD y D30 del ACE2(Jawad et al., 2021). Este efecto minimiza el potencial de fijación del virus a la célula, lo que conlleva una reducción en la infectividad. No obstante, cuando el virus contiene una mutación N501Y y K417N, se reestablece la capacidad de la variante para interactuar eficientemente con la célula hospedera(Teruel et al., 2021). Una coocurrencia de las mutaciones K417N y E484K aumenta dramáticamente la complementariedad electrostática con una carga negativa en ACE2(Y. J. Kim et al., 2021). Esto sucede debido al cambio del ácido carboxílico (E) a una amina (K). La nueva configuración fisicoquímica confiere una mayor transmisibilidad a SARS-CoV-2. Asimismo, la posición de la mutación K417N pudo haber sido seleccionada como mecanismo de evasión de la respuesta inmune(Y. J. Kim et al., 2021).

### 3. Mutación N501Y

Esta mutación fue identificada por primera vez en Reino Unido (UK) del linaje B.1.1.7. Luego, fue identificado en Sudáfrica (B.1.351) y Brasil (P.1)(Pondé, 2022; *Preliminary Genomic Characterisation of an Emergent SARS-CoV-2 Lineage in the UK Defined by a Novel Set of Spike Mutations*, 2020). La mutación consiste en una sustitución de asparagina (N) en lugar de una tirosina (Y). La mutación sucede en RBD en la región S1 de la proteína de espícula. Las posiciones 437-508 son una de los principales sitios de contacto del virus con la célula. El nuevo residuo de tirosina adiciona un puente de hidrógeno con el receptor ACE2, lo que incrementa la afinidad de SARS-CoV-2 por la célula hospedera(Tian et al., n.d.). La mutación N501Y también puede contribuir a que se mantenga el estado de conformación abierta de la proteína S, lo que promueve una mayor eficiencia en la entrada viral que contribuye a su infectividad(Teruel et al., 2021). El efecto de la mutación brinda a la variante una habilidad mejorada para transmitirse y propagarse en el ambiente, lo que implica una rápida expansión del linaje. Sin embargo, la mutación N501Y por su cuenta no sería suficiente para proveer un mejor fitness del observado de virus salvaje(A. Khan et al., 2021).

### 4. Mutación K417T

La mutación K417T fue identificada en la variante P.1 y se asocia a un cambio conformacional de la proteína de espícula. Esta mutación consiste de un cambio de una lisina (K) por una treonina (T)(Boehm et al., 2021). Así como la mutación K417N, esta mutación contribuye a la habilidad de evadir la respuesta inmune y aumenta la infectividad del virus por una mejor unión al receptor ACE2(A. Khan et al., 2021).

## 5. Mutación P681R

La mutación P681R ocurre cuando el residuo de prolina (P) es sustituido por una lisina (R) en la posición 681 en la glucoproteína S fuera de la región RBD. Esta se encuentra presente en la VOI B.1.617 y los sublinajes B.1.617, B.1.617.2 y B.1.617.3. Esta mutación separa las subunidades S1 y S2 de la proteína S (Chakraborty et al., 2022). Cuando se revierte la mutación a al virus salvaje P681, se reduce significativamente la replicación del virus. La ruptura entre S1 y S2 podría mejorar la entrada del virus hacia la célula hospedera. P681R es una mutación que mejora la replicación de la variante Delta por medio de la ruptura entre las subunidades de la proteína S (Liu et al., 2022).

## 6. Mutación L452R

Se hipotetiza que la mutación L452R es el resultado de evolución adaptativa, en respuesta a las medidas de contención epidemiológicas o al crecimiento de la proporción de población inmune a las variantes originales (Tchesnokova et al., n.d.). La sustitución de la leucina (L) por una arginina (R) y la combinación de esta con la mutación E848Q incrementa la energía de unión entre RBD y ACE2, indicando que hay una mayor fuerza de unión entre virus y célula (J. Chen et al., 2020). Este cambio facilita la entrada de SARS-CoV-2 a la célula, mejorando su infectividad y transmisibilidad (Kumar et al., 2021). Cuando se encuentra la mutación de manera individual, se ha identificado una resistencia moderada a la neutralización por anticuerpos adquiridos durante una infección previa o vacunación. Se ha observado que cambios en la posición 452 puede afectar la respuesta celular contra SARS-CoV-2. Adicionalmente, la región 448-456 de la proteína S incluye la región presentada por HLA-A24 (Kiyotani et al., 2020), la cual comprende la región de reconocimiento por linfocitos CD8<sup>+</sup> (Motozono et al., 2021). Esto permite que escape del sistema inmune y progrese la infección.

## 7. Mutación E484Q

La mutación E484Q tiene un efecto disruptivo de la unión electrostática en el residuo E484 de la proteína S en el RBD y la interfase de interacción con ACE2. La sustitución del ácido glutámico por una glutamina, interrumpe dos puentes de hidrógeno entre las regiones que interactúan con anticuerpos (Cherian et al., 2021). De manera individual, esta mutación desestabiliza la unión entre RBD y ACE2; sin embargo, coocurre frecuentemente con L452E, lo que podría ayudar en la interacción con moléculas de agua y la restauración de la estabilidad del complejo (Cherian et al., 2021).

## F. SARS-CoV-2 en Guatemala

Guatemala contribuyó a la Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19 gracias al Laboratorio Nacional de Salud (LNS) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Las muestras fueron enviadas al extranjero con el fin de obtener la secuencia. Las muestras secuenciadas pertenecían al período comprendido entre mayo y agosto de 2021. En estas se evidenció el linaje B.1. Las muestras de enero presentaron linajes B.1.429 y B.1.427. Estas fueron denominadas Epsilon. Sin embargo, el número de muestra empleado fue de cinco para enero. El 12 de mayo 2021 se realizó la secuenciación de muestras positivas a SARS-CoV-2 y se identificaron mutaciones correspondientes al linaje B.1.1.7, denominada Alfa.

El Ministerio de Salud realizó un tamizaje mediante RT-PCR para la detección de la delección NSP6/S106/G107/F108, presente en las variantes de preocupación de los linajes B.1.1.28.1, B.1.1.7, B.1.351. Esto fue realizado para detectar si las variantes presentes de la muestra positiva eran variantes de preocupación (VOC). Para esto, se ingresaron 2221 muestras de SARS-CoV-2 para el tamizaje para VOC y se enviaron 680 muestras a secuenciar. El tamizaje requiere de confirmación por secuenciación ya que el procedimiento que utilizaron rendía un resultado positivo si era VOC y negativo si no era VOC, sin especificar el linaje. De estas muestras se obtuvo que las variantes presentes entre marzo y abril 2020 fueron alfa, gamma, beta, iota y épsilon (MSPAS, 2021b). Realizar este monitoreo de variantes en Guatemala, permitió proveer un comunicado del riesgo que representa la presencia de variantes y cómo esta puede incidir en el aumento de casos graves y posibles defunciones. Asimismo, proveyó información relevante para la selección de las acciones de prevención y control establecidas relacionadas a COVID-19. Este estudio, sin embargo, no indica frecuencia por mes, únicamente por variante usando una muestra reducida de 20 muestras de las cuales se pudo determinar la variante (Cuadro 1). Otro reporte realizado por el MSPAS, realizado con muestras obtenidas del 2 de junio al 21 de julio, indica presencia de variantes de preocupación y otras variantes, usando una muestra de 58 pacientes (Cuadro 2) (MSPAS, 2021a). En este se reporta por primera vez la variante delta. Ambos reportes fueron realizados mediante secuenciación, la cual resulta costosa cuando se planea realizar a gran escala.

Cuadro 1 Frecuencias de linajes encontrados en muestras secuenciadas obtenidas entre marzo y mayo 2021

Linaje	Frecuencia	Denominación OMS	Primera detección
<b>Variantes de preocupación</b>			
B.1.1.7	13	Alfa	Reino Unido
P.1	3	Gamma	Brasil
B.1.351	1	Beta	Sudáfrica
<b>Variantes de interés</b>			
B.1.526	3	Iota	EE. UU.
B.1.429	1	Épsilon	EE. UU.

(MSPAS, 2021a)

Cuadro 2 Frecuencias de linajes encontrados en las muestras secuenciadas obtenidas entre junio y julio 2021

Linaje	Frecuencia	Denominación OMS
<b>Variantes de preocupación</b>		
B.1.1.7	13	Alfa
P.1	3	Gamma
B.1.351	1	Beta
<b>Variantes de interés</b>		
B.1.526	3	Iota
B.1.429	1	Épsilon

(MSPAS, 2021b)

## VI. METODOLOGÍA

Las secuencias fueron obtenidas a partir de muestras retrospectivas de pacientes cuyo diagnóstico inicial por prueba de RT-PCR para SARS-CoV-2 fue positivo. Las muestras fueron asignadas por el Centro de Diagnóstico Multimédica, TecniScan, ubicado en el Boulevard Vista Hermosa 25-19, Zona 15, Edificio Multimédica, Guatemala. Las muestras de las cuales se obtuvieron las secuencias fueron utilizadas como remanentes de casos ambulatorios de trabajo en el Laboratorio que se encontraban almacenadas en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras positivas fueron seleccionadas al azar, por lo que no se trabajó con la información personal de los pacientes.

Este será un estudio no experimental dado que no se construye ninguna situación ni se manipulan las muestras directamente sino se trabajará con secuencias ya existentes. El enfoque es cuantitativo porque se observará la frecuencia de las variantes y si existe o no un efecto claro de variables como edad y sexo sobre ella. Asimismo, se realizará un análisis estadístico para determinar diferencias entre grupos de edad, sexo biológico y mes del año de obtención de la muestra.

### A. Análisis de resultados y clasificación de variantes

Se realizará el análisis de los resultados obtenidos del procesamiento de muestras realizado durante las prácticas profesionales (Anexos 1-4). Se analizarán los resultados de 160 secuencias obtenidas de 160 muestras retrospectivas de hisopado nasofaríngeo. Estas fueron obtenidas de muestras positivas en el diagnóstico de SARS-CoV-2 que contaban con un Ct del diagnóstico menor a 25 (Anexo 1).

#### 1. Análisis de resultados obtenidos con Variant I y Variant II

La identificación de las variantes, se realizará según las mutaciones encontradas con Variant I y II (Cuadro 3)(Viasure, 2021). Para ello, se realizará la interpretación de resultados de las secuencias individuales de pacientes según las indicaciones del fabricante (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3 Identificación de variantes según mutaciones encontradas con Variant I y Variant II

Variante de SARS-CoV-2	E484K	K417T	K417N	N501Y	P681R	L452R	E484Q
Alfa				X			
Beta	X			X			
Gamma	X	X		X			
Delta					X	X	
Iota						X	
Épsilon						X	
Kappa					X	X	X

Cuadro 4 Interpretación de resultados de secuencias individuales de pacientes para Variant I

E484K (FAM)	K417T (ROX)	K417N (HEX)	N501Y (Cy5)	Interpretación para secuencias de pacientes	
≤ 40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido	Mutación E484K detectada
≥40 o no señal	≤ 40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido	Mutación K471T detectada
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤ 40	≥40 o no señal	Válido	Mutación K417N detectada
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤ 40	Válido	Mutación N501Y detectada
≤ 40	≤ 40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido	Mutaciones E484K y K417T detectadas
≤ 40	≥40 o no señal	≤ 40	≥40 o no señal	Válido	Mutaciones E484K y K417N detectadas
≤ 40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤ 40	Válido	Mutaciones E484K y N501Y detectadas

E484K (FAM)	K417T (ROX)	K417N (HEX)	N501Y (Cy5)	Interpretación para secuencias de pacientes	
$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones K417T y K417N detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	Válido	Mutaciones K417T y N501Y detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$	Válido	Mutaciones K417N y N501Y detectadas
$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones E484K, K417T y K417N detectadas
$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$	Válido	Mutaciones E484K, K417N y N501Y detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$	Válido	Mutaciones K417T, K417N y N501Y detectadas
$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$	Válido	Mutaciones E484K, K417T, K417N y N501Y detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones E484K, K417T, K417N y N501Y no detectadas

Cuadro 5 Interpretación de resultados de secuencias individuales de pacientes para Variant II

P681R (FAM)	L452R (ROX)	E484Q (HEX)	Control interno endógeno (Cy5)	Interpretación para secuencias de pacientes	
$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutación P681R detectada
$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutación L452R detectada
$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutación E484Q detectada
$\leq 40$	$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones P618R y L452R detectadas
$\leq 40$	$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones P618R y E484Q detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones L452R y E484Q detectadas
$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$ o no señal	Válido	Mutaciones P618R, L452R y E484Q detectadas
$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\leq 35$	Válido	RNA molde diana no detectado
$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\geq 40$ o no señal	$\geq 35$ o no señal	No válido	Test fallido

## B. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis mediante estadística tradicional para determinar la significancia estadística de las variables de interés edad, sexo biológico y mes de obtención de la muestra sobre la variante obtenida en el análisis. Para ello se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para determinar si la edad era una variable que causaba una diferencia estadísticamente significativa entre variantes.

Para la distribución de los datos de edad, se realizó una prueba de Shapiro para determinar la normalidad. Respecto a la edad, se estableció como hipótesis nula que no existe una diferencia estadísticamente significativa de la edad entre las variantes; y, la hipótesis alternativa estableció que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de edad.

Los análisis de diferencia entre grupos de variables categóricas como variante, mutación, mes y sexo fueron realizados con pruebas de  $\chi^2$  de Pearson. Respecto al sexo biológico se estableció como hipótesis nula que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de muestras de sexo masculino y sexo femenino; y, como hipótesis alternativa, se estableció que existe una diferencia estadísticamente significativa entre grupos de sexo biológico. Sobre el mes de obtención de la muestra, se estableció la hipótesis nula que indica que no existe una diferencia estadística significativa entre los meses analizados para las variantes obtenidas. Las pruebas que obtuvieron resultados que reflejaron diferencia significativa fueron validadas mediante el análisis post hoc para la prueba de  $\chi^2$  utilizando el método de Bonferroni. El análisis estadístico se realizó utilizando el software R y R Studio (Versión 2023.03.0+386) de Posit Software. Los paquetes utilizados fueron los siguientes: readxl, tidyverse, chisq.posthoc.test y reporttools.

Asimismo, se realizaron gráficos que representen la frecuencia de cada variante según el mes con el fin de presentar una línea del tiempo que esclarezca la dinámica de las variantes en Guatemala durante abril y agosto de 2021. Se realizó una línea del tiempo similar empleando las mutaciones identificadas, sin asociar a las variantes. Para el análisis gráfico se utilizó el software GraphPad Prism 10 (Versión 10.1.0 (264))

*Cuadro 6 Operacionalización de variables a analizar*

Variable	Clasificación según su naturaleza	Escala de medición	Naturaleza de variable
Variante de SARS-CoV-2	Variable categórica nominal	Variable nominal	Cualitativa
Edad	Variable numérica continua	Variable de razón	Cuantitativa
Sexo biológico	Variable categórica binomial	Variable nominal	Cualitativa
Mes del año	Variable categórica nominal	Variable nominal	Cualitativa

### C. Aspectos éticos

La población del estudio son pacientes que acudieron al Centro de Diagnóstico Multimédica, TecniScan en búsqueda de diagnóstico, con síntomas sospechosos de COVID-19 durante los meses de abril a agosto de 2021.

Para el procesamiento de muestras no se requirió un consentimiento informado para el uso de materiales que habían sido almacenados debido a que no era factible o viable realizar la investigación sin el biobanco de muestras nasofaríngeas. Asimismo, no era factible solicitar la firma de un consentimiento informado debido a que no se cuenta con los nombres, direcciones, números de teléfono de los pacientes. Asimismo, la investigación tiene un valor social importante ya que presenta un análisis epidemiológico de las variantes de SARS-CoV-2 por mes. Asimismo, el procesamiento de muestras se realizó con el fin de proveer evidencia de una herramienta que provee información sobre las variantes de manera rápida, que no requiere de secuenciación en el extranjero y puede utilizarse para un mayor número de muestras con un menor costo. Finalmente, la investigación no implica riesgos para el paciente o el grupo al cual este pertenece. En primera instancia, no representa un riesgo dado que la identidad del paciente se desconoce en su totalidad debido a que no se tiene acceso a su información personal. Segundo, es una muestra que fue empleada para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en 2021, por lo que el paciente no entraría en contacto con la muestra una vez procesada, en otras palabras, la muestra no es reaplicada al paciente (CIOMS, 2017).

El investigador está totalmente desligado de información personal y el contacto de los sujetos. Las muestras se trabajaron únicamente con un código aleatorio, mes de obtención de la muestra, sexo biológico y edad. Al obtener los resultados, las muestras obtuvieron un nuevo identificador que consistía en un correlativo numérico que incluye mes y número de muestra (Ej. 0718 para la muestra 18 del conjunto de muestras que corresponden a julio). El nuevo identificador fue también asignado de manera aleatoria. Dado que la naturaleza del estudio es retrospectiva y las muestras se trabajaron con un identificador aleatorio, no fue necesario un consentimiento informado.

El protocolo de este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala bajo el número de caso BM-001-2023-19157.

## VII. RESULTADOS

### A. Identificación de variantes de SARS-CoV-2 según la presencia y/o ausencia de mutaciones en la proteína de espícula

Se extrajo el ARN de muestras 161 de hisopado nasofaríngeo de pacientes SARS-CoV-2 positivo de 2021. Para ello, se utilizó una metodología de bajo costo donde las muestras fueron tratadas con calor y proteinasa K (Anexo 2.3). Se procesaron estos extractos mediante una reacción de RT-qPCR utilizando los kits Variant I y Variant II de Viasure. Variant I fue capaz de identificar la presencia o ausencia de las mutaciones E484K, K417T, K417N y N501Y. Variant II fue capaz de indicar la presencia o ausencia de las mutaciones P681R, L452R y E484Q. Asimismo, Variant II incluye un control interno endógeno que amplifica el gen *RNasa P* humana con el fin de monitorear el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad de la polimerasa. La identificación se llevó a cabo mediante la metodología descrita por el fabricante (Cuadro 3), en la cual se clasifican las variantes según las mutaciones amplificadas y no amplificadas durante la reacción RT-qPCR. Asimismo, se determinó la validez del resultado según lo indicado por el fabricante (Cuadros 4 y 5).

Las muestras fueron clasificados por variantes, si aplica. Para las muestras que no pudieron ser clasificadas, se nombraron con la mutación presente (Cuadro 7). Las muestras cuya amplificación fue validada por el control interno, pero no presentó mutaciones fueron clasificadas como “No se detectó ninguna mutación” (NDM). Asimismo, se describieron las muestras que no amplificaron, donde no se observó señales en ningún canal, es decir no se observó ninguna mutación ni el control interno. Finalmente, se describieron las muestras clasificadas como “No válidas”, las cuales presentaron una señal para una o más mutaciones, pero no amplificó su control interno, por lo cual no pudo validarse el resultado debido a cuestionamiento de la calidad del extracto.

Cuadro 7 Variantes o mutaciones identificadas mediante RT-qPCR

Variante / Mutación	Muestras identificadas
Gamma	3
Beta	3
Alfa	5
Delta	25
Epsilon	47
Mutaciones K417N, P681R y L452R	1
Mutación P681R	1
Mutaciones E484K y N501Y	3
Mutaciones K417N y N501Y	1
Mutaciones L452R y E484Q	1
No se detectó ninguna mutación	28
No amplificó	35
No válido	8
<b>Total</b>	<b>161</b>

B. Existe una relación entre el mes de obtención de la muestra y la variante identificada, mas no de la edad y sexo biológico del paciente

Para comparar si las variantes identificadas tenían una relación con la edad del paciente y determinar si la edad podría influir en la variante que infectaba al paciente, se propuso realizar un análisis de varianza (ANOVA). Sin embargo, los datos de edad no seguían una distribución normal, según la prueba de Shapiro. La prueba de Shapiro dio como resultado un valor  $p$  de 0.0075 ( $p < 0.05$ ), por lo que se rechazó la hipótesis nula, presentando evidencia que la población de edad no estaba normalmente distribuida. Por ello, se optó por realizar la prueba de Kruskal-Wallis. El resultado ( $p > 0.05$ ) sugirió que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes afectados por cada variante (Cuadro 8).

Para determinar si existen diferencias entre las variantes que afectaron a personas del sexo masculino y al sexo, se realizó una prueba de prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrado) de Pearson. Su valor  $p$  (Cuadro 8) resultó ser no significativo ( $p > 0.05$ ). Este resultado sugiere que no existen diferencias significativas entre la incidencia de cada variante entre personas del sexo femenino y masculino.

Con el fin de comparar las variantes identificadas en cada mes y determinar si el mes de toma de muestra influyó en las variantes identificadas en cada uno de ellos, se realizó una prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrado) de Pearson. El valor  $p$  de la prueba resultó ser altamente significativo ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 8). El resultado sugiere que existe una asociación estadísticamente significativa entre el mes de toma de muestra y la variante. Dado que había varios grupos y la matriz analizaba una matriz de [2X2], se realizó un análisis post hoc para la prueba de  $\chi^2$  utilizando el método de Bonferroni. Este análisis sugirió que existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la incidencia de variante Delta en junio y diferencias altamente significativas en la incidencia de las variantes Delta y Épsilon (Cuadro 9).

Cuadro 8 Características de los participantes del estudio y diferencia según variable

VARIABLES	Alfa (n=5)	Beta (n=3)	Delta (n=23)	Épsilon (n=47)	Gamma (n=3)	NDM (n=28)	Valor $p$	Sign.
Edad <sup>a</sup>	35.2 □ 6.14	58.3 □ 11.5	43.0 □ 16.7	35.6 □ 15.5	49.6 □23.1	33.6 □ 14.2	0.0612	
Sexo biológico							0.5958	
○ Femenino	3	2	18	29	1	18		
○ Masculino	2	1	5	18	2	10		
Mes de toma de muestra							2.182x10 <sup>-7</sup>	
○ Abril	2	0	0	7	1	6		
○ Mayo	2	0	0	11	0	4		
○ Junio	0	2	0	17	2	7		***
○ Julio	1	1	7	12	0	4		
○ Agosto	0	0	16	0	0	7		

a Los valores son media □ desviación estándar

\*\*\* Altamente significativo

Cuadro 9 Análisis post hoc para prueba de  $\chi^2$  de Pearson

Mes	Alfa	Sig	Beta	Sig	Delt	Sig	Épsil	Sig	Gam	Sig	ND	Sig
		n.		n.	a	n.	on	n.	ma	n.	M	n.
Abril	1.00		1.00		0.75		1.000		1.000		1.00	
May	00		00		37		0		0		00	
o	1.00		1.00		0.60	*	1.000		1.000		1.00	
Junio	00		00		87		0		0		00	
Julio	1.00		1.00		0.04	***	1.000	***	1.000		1.00	
Agos	00		00		50		0		0		00	
to	1.00		1.00		1.00		0.875		1.000		1.00	
	00		00		00		9		0		00	
	1.00		1.00		0.00		0.000		1.000		1.00	
	00		00		00		8		0		00	

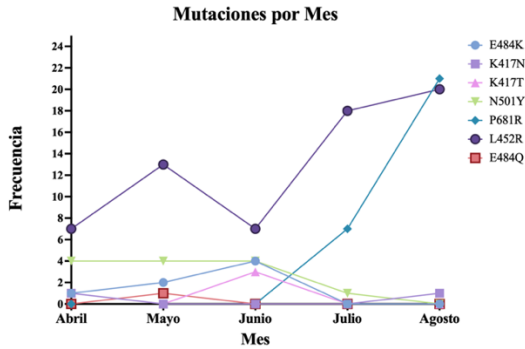
\*\*\* Altamente significativo

\* Significativo

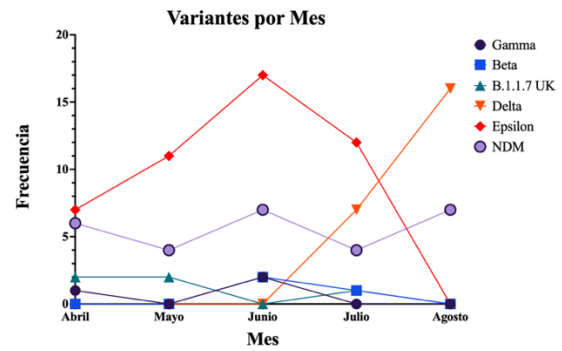
C. Análisis gráfico de la frecuencia de cada mutación y variantes respecto al mes de obtención de la muestra demuestra prevalencia de las mutaciones L452R y P681R, así como la alta incidencia de las variantes Épsilon y Delta

Con el fin de observar la frecuencia de cada mutación y variante en los meses analizados, se realizó un análisis gráfico utilizando el software Prism (Versión 10) de Dotmatics. Del análisis gráfico, se pudo observar la prevalencia de la mutación L452R de abril a agosto y el rápido incremento en la frecuencia de la mutación P681R de junio a agosto (Figura 3A y 3C). Otras mutaciones como E484K, K417T y N501Y se mantienen presentes en frecuencia baja o intermedia durante el período analizado, mientras que las mutaciones K417N y E484Q se mantienen en frecuencias muy bajas (Figura 3A). Respecto a la incidencia de variantes entre abril y agosto, se destaca la alta prevalencia de la variante Épsilon entre abril y junio. Esta variante se ve en un drástico decremento entre junio y agosto, cuando delta inicia incrementa (Figura 3B).

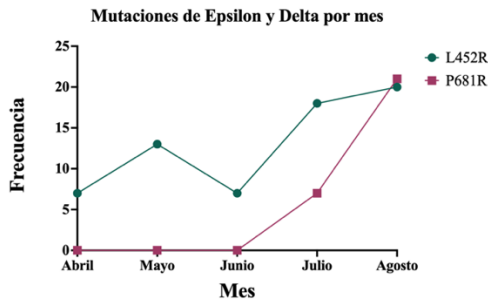
3A



3B



3C



3D

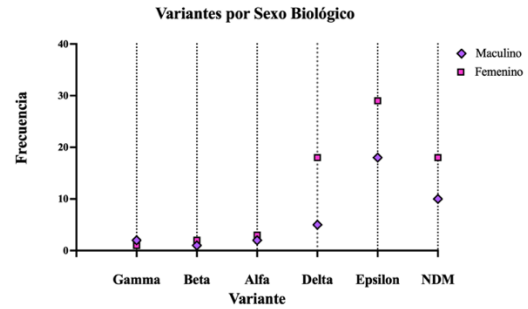


Figura 3 Frecuencia de mutaciones y variantes.

3A. Mutaciones por Mes. Mutaciones identificadas mediante Variant I y Variant II en todas las muestras analizadas. 3B. Variantes por Mes. Frecuencia de las variantes identificadas por mes en todas las muestras analizadas. 3C. Mutaciones de Épsilon y Delta por mes. Frecuencia de las mutaciones asociadas a Épsilon (L452R) y Delta (L452R y P681R) por mes. 3D. Variantes por Sexo Biológico. Frecuencia de Variantes identificadas, separadas por sexo biológico femenino y masculino, acumulado de todos los meses.

Según las muestras analizadas, la mutación P681R se empezó a observar e incrementa paralelamente con la mutación L452R a partir de junio (Figura 3C). Este comportamiento coincide con el incremento de casos de Delta (Figura 3B). Para determinar si existe diferencia significativa. Asimismo, se visualizó el comportamiento de las variantes por sexo biológico (Figura 3D), de lo cual pudo observarse un comportamiento similar entre la incidencia del sexo femenino y masculino por variante. Sin embargo, las variantes Delta y Épsilon y las muestras donde no se identificó ninguna mutación presentan una leve diferencia entre casos personas del sexo masculino y femenino. Esto sugiere que podría haber una mayor susceptibilidad de las personas de sexo femenino frente a Delta y Épsilon.

Cuadro 10 Prueba de  $\chi^2$  de Pearson y análisis post hoc para prueba de  $\chi^2$  de Pearson para asociación entre mes de obtención de muestra y mutaciones L452R y P681R

Variable	Valor <i>p</i>	L452R	Sign.	P681R	Sign.
<b>Mes</b>	0.002				
<input type="checkbox"/> Abril		0.7095		0.7095	
<input type="checkbox"/> Mayo		0.1073		0.1073	
<input type="checkbox"/> Junio		0.7095		0.7095	
<input type="checkbox"/> Julio		1.0000		1.0000	
<input type="checkbox"/> Agosto		0.0008	***	0.0008	***

\*\*\* Altamente significativo  
\* Significativo

Con el fin de determinar si hubo una asociación significativa entre el mes y las mutaciones L452R y P681R, asociadas a Épsilon (L452R) y Delta (L452R+P681R), se realizó una prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrado) de Pearson. El valor *p* de 0.002 indica que existe una asociación altamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 10). Esto sugiere que existe una relación significativa entre el mes de toma de muestra y las mutaciones analizadas. Debido a que la matriz era mayor a [2X2], se realizó un análisis post hoc con ajuste de Bonferroni, el cual sugirió que una diferencia significancia estadística alta ( $p < 0.05$ ) en la incidencia de las mutaciones L452R y P681R en agosto (Cuadro 10).

Como parte del análisis gráfico que se realizó, se analizó la frecuencia de sexo biológico por mes (Figura 4A). Las tendencias de la incidencia de pacientes de sexo femenino y masculino fueron similares. La frecuencia de pacientes de sexo femenino fue levemente mayor. Se realizó una prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrado) de Pearson para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre el sexo biológico por mes. La prueba dio como resultado un valor *p* de 0.3955, por lo que la diferencia entre grupos por mes no fue significativa. Asimismo, se visualizó la frecuencia de cinco grupos de edad respecto a los meses analizados. En junio, se observa una mayor incidencia de pacientes positivos en el grupo de personas entre 25 y 40 años. Seguido de esto, en agosto, hubo una mayor frecuencia de pruebas positivas en el grupo de pacientes entre 13 y 24 años (Figura 4B). El valor máximo del grupo de edad 25-40 por mes coinciden con la variante Épsilon en los grupos de sexo femenino y masculino por mes (Figuras 4B-D). Asimismo, el comportamiento del grupo de 13-24 años coincide con el comportamiento de la variante delta en los grupos de sexo masculino y femenino (Figura 4B-D). Esto sugiere que podría a ver una relación entre los grupos de edad que corresponden a adolescentes y adultos jóvenes con la transmisión de

la variante Épsilon, mientras que los adultos jóvenes y adultos pudieron estar relacionados con la transmisión de Delta.

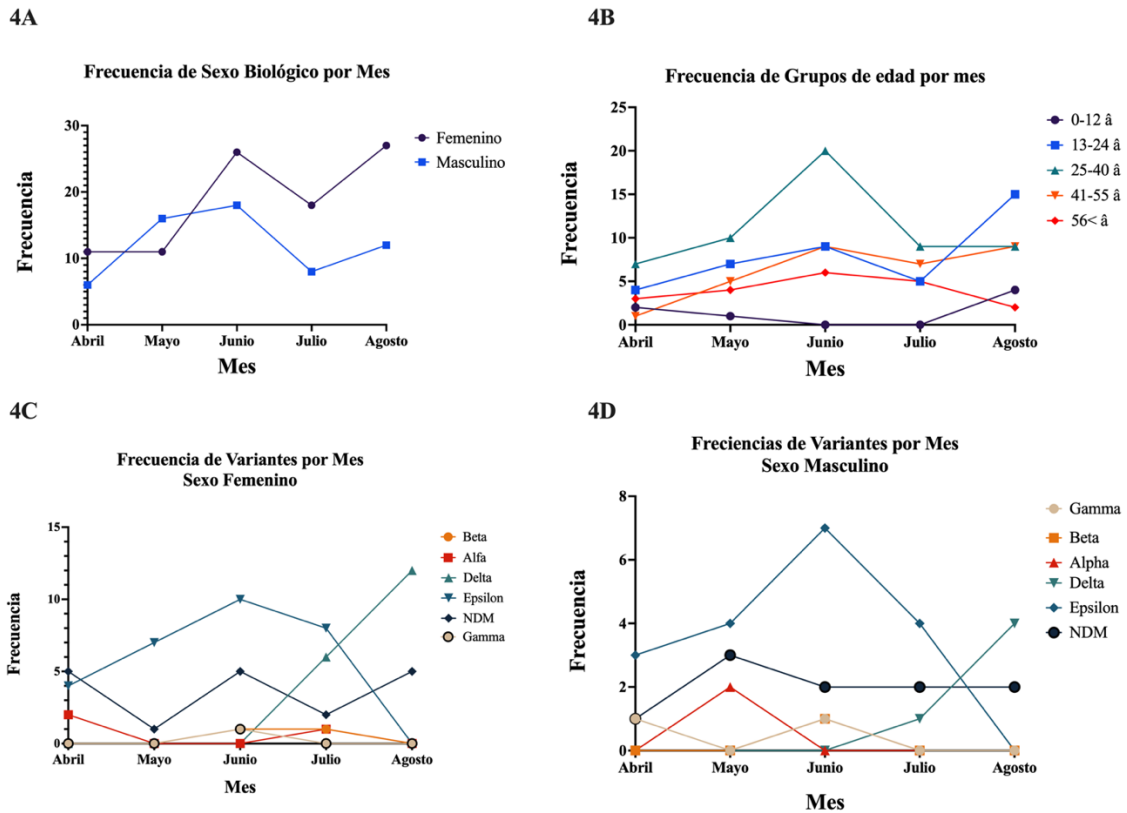


Figura 4 Frecuencia de indicadores biológicos en los casos estudiados

4A. Sexo biológico por mes. Frecuencia de sexo biológico masculino y femenino por mes. 4B. Grupos de edad por mes. Frecuencia de cinco grupos de edad por mes. Los grupos de edad están descritos como 0-12 años, 13-24 años, 25-40 años, 41-55 años y mayores de 56 años. 4C. Frecuencia de variantes en sexo femenino. Se presenta la frecuencia de las variantes por mes para los pacientes de sexo femenino. NDM corresponde a muestras válidas que no presentaron ninguna de las siete mutaciones estudiadas. 4D. Frecuencia de variantes en sexo masculino. Se presenta la frecuencia de las variantes por mes para los pacientes de sexo masculino. NDM corresponde a muestras válidas que no presentaron ninguna de las siete mutaciones estudiadas.

## VIII. Discusión de resultados y hallazgos

Durante la pandemia de COVID-19, la autoridad de salud en Guatemala, MSPAS, realizó un monitoreo basado en acercamientos de bajo costo que clasificaron muestras como variante de preocupación (VOC) o variante de interés, sin especificar la variante. Paralelamente, se reportaron cinco variantes de preocupación, alfa, beta, gamma, delta y ómicron. Asimismo, no se realizó una vigilancia genómica de las mutaciones presentes en las muestras de casos positivos. La mayoría de las pruebas realizadas en Guatemala fueron reportadas como “positivo” o “negativo”, sin indagar a profundidad la variante y sus mutaciones. Esto se debe en parte a los costos elevados de secuenciar un gran volumen de muestras para realizar el monitoreo.

Este estudio presenta el análisis de muestras positivas obtenidas en 2021 con el fin de determinar las mutaciones presentes e identificar las variantes observadas entre abril y agosto de 2021 y su comportamiento respecto al tiempo, edad y sexo biológico. La amplificación de las mutaciones con las cuales se identificaron las variantes fue realizada a partir de extractos de ARN obtenidos mediante un método de bajo costo y kits de identificación de variantes (Variant I y Variant II) mediante RT-qPCR para presentar una alternativa a la secuenciación para países de vías de desarrollo como Guatemala, en casos de emergencia como lo fue la pandemia de COVID-19.

Este estudio logró demostrar presencia de mutaciones en muestras que no pudieron ser clasificadas como variantes. Asimismo, se identificaron las variantes Alfa, Beta, Gamma, Épsilon y Delta entre abril y agosto de 2021. Los resultados del estudio demostraron que las variantes observadas tuvieron una diferencia significativa entre los meses evaluados, mas no significancia estadística de las variables mes de obtención de la muestra y sexo biológico. Las mutaciones con mayor prevalencia durante el período y la población estudiados fueron L452R y P681R. Estas fueron significativamente más frecuentes en agosto; sin embargo, L452R fue constantemente más frecuente que las demás mutaciones y P681R inició un incremento en su frecuencia a partir de junio. Las variantes Épsilon y Delta presentan un comportamiento similar; Épsilon tuvo constantemente un mayor número de incidencias comparado con otras variantes de abril a junio. Sin embargo, hubo un cambio de variante más prevalente entre julio y agosto, cuando Delta incrementó su número de casos y el Épsilon se redujo.

#### A. Mes de obtención de la muestra y su relación con variantes y mutaciones observadas

Durante el estudio, se demostró que el mes de obtención de la muestra tiene una influencia significativa sobre la variante identificada y mutaciones presentes en la población. Esto podría estar asociado a que el perfil mutacional de las secuencias de genómicas de SARS-CoV-2 ha cambiado durante el transcurso de la pandemia. Por ende, el monitoreo genómico del virus resulta crítico debido a la variabilidad genética de SARS-CoV-2 (Abbasian et al., 2023). Se estima que la tasa de mutación de SARS-CoV-2 se encuentra entre  $1 \times 10^{-6}$  y  $2 \times 10^{-6}$  mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación. Si bien esto es menor comparado con virus como el virus de Hepatitis C (HCV;  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ) (Li et al., 2012) y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH;  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$ ) (Rawson et al., 2015), SARS-CoV-2 alcanzó estas tasas de mutación aun teniendo el mecanismo de revisión y reparación exonucleasa 3' como parte de su maquinaria de replicación, el cual VIH y HCV no poseen (Minskaia et al., 2006).

#### B. Observaciones sobre el sexo biológico

Con respecto al sexo biológico, se demostró que hubo una tendencia de más mujeres que hombres en el análisis gráfico. Sin embargo, se demostró que esta diferencia no fue significativa. La frecuencia de mujeres pudo haber sido mayor por una variedad de factores. Uno de los factores es que, dado que las muestras son de pacientes ambulatorios, no se sabe si las pruebas de SARS-CoV-2 fueron más frecuentes en mujeres porque más mujeres frecuentaron el Centro de Diagnóstico Multimédica, Tecniscan. Asimismo, la manera en la que se seleccionaron las muestras no tomó en cuenta si pertenecían al sexo femenino o masculino. Por ende, es posible que exista un desbalance entre hombres y mujeres en la muestra (Dickinson et al., 2012). Por ello, se recomienda ampliar el tamaño de la muestra. De esta manera, se obtendrían más datos que podrían ayudar en el análisis estadístico a establecer si las tendencias observadas en el análisis gráfico son verdaderamente no significativas. Otro factor es que demográficamente existe una leve diferencia entre el número de personas de sexo femenino y masculino que conforman la población guatemalteca. En 2021, el Instituto Nacional de Estadística (INE) proyectó una población de 8,690,624 de sexo femenino y 8,419,722 de sexo masculino, teniendo una representación de 50.79% y 49.21%, respectivamente (Instituto Nacional de Estadística, 2021). Asimismo, a pesar de que existen reportes que sugieren que existe diferencia en la infección de SARS-CoV-2 entre grupos de sexo biológico, la evidencia no apunta a que exista una relación entre el sexo y el número de casos de COVID-19. Sin embargo, sí se ha visto que los hombres tienden a tener tasas de

mortalidad más altas y cuadros clínicos más severos (Mukherjee & Pahan, 2021). No obstante, estas diferencias se pueden atribuir a niveles más altos de ACE2 (Gargaglioni & Marques, 2020) y TMPRSS2 (Wambier et al., 2020) en hombres, así como influencias hormonales sobre el sistema inmune. Se ha reportado que la respuesta inmune tanto humoral como celular es más vigorosa en mujeres debido a que muchos tipos de células inmunes contienen receptores de estrógeno. Asimismo, se ha demostrado que el estrógeno promueve la respuesta de anticuerpos (Giefing-Kröll et al., 2015; Ruggieri et al., 2016). La combinación de estos factores podría llevar a consecuencias más graves del COVID-19 en personas de sexo masculino. Sin embargo, este estudio no puede vincular los resultados a sintomatología dado que no se contaba con esta información sobre los casos estudiados. Por ello, se recomienda una recopilación de datos sintomatológicos al momento de la prueba y seguimiento de estos, con el fin de determinar si existe una mayor susceptibilidad en hombres guatemaltecos de padecer cuadros clínicos más severos.

#### C. Lecciones sobre la tendencia observada en edad

Respecto a la edad, se determinó que la esta no influye significativamente a la variante identificada. No obstante, durante el análisis gráfico pudo verse una alta incidencia de casos del grupo de edad comprendido entre 25 y 40 años durante junio de 2021. Este fenómeno ha sido reportado con anterioridad alrededor del mundo. Se observó un mayor número de infecciones de SARS-CoV-2 en adultos jóvenes (20-39 años) durante el período comprendido entre junio y agosto de 2020 (Manivannan et al., 2021). Este comportamiento pudo haber persistido, indicando un posible rol de los adultos jóvenes en la transmisión del virus en la comunidad.

#### D. Muestras donde no se detectó ninguna mutación

Durante la clasificación de variantes, se encontró un grupo de muestras cuyo resultado fue inconcluso denominadas NDM o no se detectó ninguna mutación. Cabe resaltar que la metodología empleada se enfocó en la detección de siete mutaciones en el gen *S* (E484L, K417N, K417T, N501Y, P681R, L452R y E484Q). Las muestras clasificadas como NDM fueron aquellas cuyo control interno endógeno (gen de *ARNasa humana*) fue positivo, indicando que el proceso de extracción fue apropiado y no hubo inhibición de la actividad de la ADN polimerasa en la reacción. Sin embargo, una limitación de este estudio fue el no poder determinar si las muestras cuya clasificación fue NDM corresponden a la cepa *wild type* (WT) o presentaron mutaciones no incluidas en los kits empleados en este estudio tanto dentro del gen *S* u otras regiones en el genoma de SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 fue sujeto a mutaciones en otras regiones de su genoma como la

región no traducida 5' (5'UTR), las cuales podrían tener implicaciones en la estructura secundaria de ARN y, por lo tanto, afectar la tasa de replicación de ARN en los ciclos de infección (D. Kim et al., 2020). Asimismo, mutaciones en el ORF1ab pudo causar mutaciones significativas en las proteínas no estructurales, resultando en cambios en los procesos metabólicos del ARN mensajero, aumentando la infectividad y/o la severidad de la infección, entre otros (Laha et al., 2020; J.-W. Lin et al., 2021; Nagy et al., 2021). Adicionalmente, hubo presencia de mutaciones en la proteína S asociadas a otras variantes no identificadas en este estudio como, S477G, S44N y S477R en el dominio RBD que incrementa la afinidad por el receptor ACE2 (Gaebler et al., 2021), D614G en la región C-terminal del dominio S1 que presenta un leve incremento en la infectividad (L. Zhang et al., 2020), P681H, similar a P681R, que afecta la transmisibilidad y causa un posible incremento en la infección (Zuckerman et al., 2021).

#### E. Mutaciones L452R y P681R

Respecto a la presencia de L452R y P681R como las mutaciones más prevalentes de las siete mutaciones estudiadas, la alta incidencia posee implicaciones a nivel de fusogenicidad, patogenicidad, aptitud biológica e infectividad. La variante Delta presenta mutaciones acumuladas, entre las cuales se encuentran tanto L452R y P681R. P681R se encuentra ubicada en el sitio de escisión que se encuentra ausente en otros grupos de coronavirus. Este sitio de escisión es relevante para la replicación y patogenicidad de SARS-CoV-2 (Coutard et al., 2020). Estudios sugieren que tiene un rol una entrada más eficiente a las células del tejido epitelial. Asimismo, existe evidencia que respalda que la mutación P681R mejora la replicación de delta en las vías respiratorias primarias humanas (Liu et al., 2021). P681R se ha demostrado responsable por la promoción de la fusión célula-célula, lo que lleva a la formación de sincitios o células multinucleares por fusión, lo que permite que el virus se esparza directamente a otras células sin ser detectado por anticuerpos neutralizantes y otros componentes del sistema inmune (L. Lin et al., 2021; Saito et al., 2022).

La mutación L452R, también identificada como la más prevalente en el período analizado es una mutación presente en las variantes Épsilon y Delta. En el caso de Épsilon, existe evidencia que fue la mutación L452R la que desencadenó la variante y existe evidencia que respalda la significancia adaptativa de L452R (Tchesnokova et al., 2021). Se ha demostrado que L452R reduce la actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales. Asimismo, esta mutación confiere capacidades de escape viral de la inmunidad mediada por células T citotóxicas restringidas por antígeno leucocitarios humanos (HLA). Adicional a ello, esta mutación provee una mayor afinidad por el receptor de unión en ACE2 y, por ende, una mayor infectividad en células humanas (Motozono et

al., 2021). Se ha reportado que L452R incrementa la estabilidad de la proteína de espícula, infectividad, fusogenicidad y promueve la replicación. Las ventajas que provee la mutación L452R como la capacidad de escape del sistema inmune y mayor fuerza de interacción virus-células podrían ser causantes de una mayor transmisibilidad, infectividad y/o patogenicidad de las variantes que la poseen como Épsilon y Delta (Tchesnokova et al., 2021), lo cual se observa en una mayor frecuencia de estas variantes entre abril y agosto de 2021.

Determinar la presencia y comportamiento de las mutaciones de SARS-CoV-2 es complementario al reporte de las variantes de interés (VOI) y variantes de preocupación (VOC). Por ejemplo, Épsilon fue designada como VOI el 26 de febrero de 2021, VOC el 19 de marzo de 2021 y VOI el 29 de junio del 2021 (CDC, 2020b). Sin embargo, en Guatemala se observó una alta frecuencia de casos de Épsilon sobre otras variantes entre junio y julio. Adicional a ello, la mutación L452R continuaba siendo de alta incidencia y se encontraba en incremento por la presencia de Delta. Dar un monitoreo de las variantes y mutaciones frecuentes resulta vital para la detección temprana, monitoreo de la evolución del virus y evaluación del grado similitud entre variantes circulantes con las secuencias de las vacunas desarrolladas contra SARS-CoV-2, así como las medidas de prevención y tratamiento (Z. Chen et al., 2022).

#### F. Vigilancia genómica: Deficiencias y lecciones aprendidas

En 2021, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social realizó la vigilancia genómica del virus SARS-CoV-2 en Guatemala. Sin embargo, esta fue realizada utilizando números de muestra pequeños debido al costo que representaba enviar las muestras a secuenciar a laboratorios de referencia e implementar la secuenciación en Guatemala (MSPAS, 2021c). Asimismo, se propuso la vigilancia genómica del 0.6% de las muestras (MSPAS, 2021d). Esta coyuntura no es un problema exclusivo de Guatemala, otros países de Latinoamérica que secuenció un número de muestras que correspondan a menor de 2.4% de los casos positivos, lo cual es demasiado bajo para llevar a cabo una vigilancia genómica apropiada (Brito et al., 2021), por lo que estudios recomiendan interpretar los datos publicados con precaución en la región (Molina-Mora et al., 2023). Poseer herramientas complementarias como el monitoreo de mutaciones relevantes presentes en el territorio nacional mediante RT-qPCR, que no requieren de secuenciación, podría contribuir a una vigilancia genómica más robusta para países en vías de desarrollo como Guatemala.

## G. Limitaciones del estudio

Este estudio proveyó información sobre la frecuencia de las variantes y mutaciones de SARS-CoV-2 durante marzo y agosto de 2021. Este destaca la importancia de las mutaciones P681R y L452R, identificadas como mutaciones de alta prevalencia en este período. Asimismo, se describieron las implicaciones de estas mutaciones en la biología de SARS-CoV-2. Asimismo, se destaca la importancia del monitoreo continuo mediante la clasificación de variantes y el monitoreo de mutaciones esenciales para una detección temprana y la comprensión de la evolución del virus bajo el contexto de Guatemala. Se describieron las limitaciones de la vigilancia genómica debido a costos y se propone el uso de alternativas mediante RT-qPCR. No obstante, se reconoce la limitación de no poder determinar la naturaleza exacta de las muestras clasificadas como NDM, incluida la posibilidad de mutaciones fuera del gen *S*. Asimismo, se reconoce la carencia de métodos para detectar mutaciones en la proteína S asociadas a otras variantes no identificadas en el estudio debido a la complejidad genética de SARS-CoV-2. Sin embargo, se provee un análisis del comportamiento y resultados de la significancia estadística de la variable de mes y la no significancia de las variables sexo y edad, proporcionando un análisis demográfico y genómico que brinda información valiosa sobre la diversidad de la infección por SARS-CoV-2 en Guatemala durante el período estudiado.

## IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron las variantes de SARS-CoV-2 presentes en hisopados nasofaríngeos de secuencias de muestras tomadas entre abril y agosto de 2021 en Guatemala y procesadas en 2022. De 161 muestras identificadas, se reportaron caso de variante Alfa (5), variante Beta (3), variante Gamma (3), variante Delta (25) y variante Épsilon (47).
- Se determinó que la edad y el sexo biológico no influyen significativamente sobre la variante identificada.
- Se determinó que existe una relación entre el mes de la obtención de la muestra y la variante identificada. Se reportó que el mes donde más influye significativamente a las variantes Épsilon y Delta en agosto respecto a los demás meses.
- Se reportó la frecuencia de las mutaciones y variantes observadas entre abril y agosto de 2021.
- Las mutaciones P681R y L452R, identificadas como altamente prevalentes, tienen implicaciones significativas en la biología de SARS-CoV-2 como aumento en la infectividad, fusión célula-virus, patogenicidad y evasión de respuestas inmunológicas.
  - Se identificó P681R, presente en la variante Delta como una mutación de relevancia ya que podría haber contribuido a una replicación más eficiente y a la formación de sincitios, lo que facilita la propagación viral sin detección inmunológica.
  - Se observó una alta frecuencia de la mutación L452R a lo largo de los cinco meses estudiados, asociada a Épsilon y Delta, la cual ha sido reportada como favorable en el aumento en la transmisibilidad y la infectividad del virus.
- La clasificación de variantes y monitoreo de mutaciones son esenciales para una detección temprana y la comprensión de la evolución del virus.
- El seguimiento de las variantes de interés y preocupación es crucial, ya que la prevalencia de Épsilon y persistencia de L452R indican cambios en la dinámica viral a lo largo del tiempo.
- Las limitaciones en la vigilancia genómica en Guatemala se deben al bajo número de muestras secuenciadas debido a costos. Este es un desafío significativo para Guatemala y países de la región.
- Nuevas estrategias como el monitoreo de mutaciones mediante RT-qPCR podrían ofrecer una alternativa práctica y rentable para fortalecer la vigilancia genómica y el monitoreo de variantes y mutaciones relevantes.

- Este estudio destaca la importancia de ajustar estrategias de salud pública en función de la evolución genómica del virus.
- La identificación de mutaciones clave puede informar sobre la efectividad de las medidas de prevención, tratamiento y evaluación de la similitud con las secuencias diana en vacunas contra SARS-CoV-2.

## X. RECOMENDACIONES

Se recomienda incrementar la cantidad de muestras en el estudio y confirmar los resultados mediante secuenciación para mejorar la representatividad y precisión del método. Un mayor número de muestras permitirá una evaluación más completa de las variantes circulantes y mutaciones relevantes. Asimismo, para la vigilancia genómica nacional, se recomienda ampliar el porcentaje de muestras positivas que se secuencian y la frecuencia con la que se realiza. Por otra parte, se recomienda implementar estrategias de monitoreo de mutaciones clave mediante técnicas como RT-qPCR para superar limitaciones presupuestarias asociadas a la secuenciación. La vigilancia continua de mutaciones relevantes ofrece una alternativa práctica y económica para obtener información valiosa sobre la dinámica viral. Se recomienda realizar un análisis más detallado sobre la alta incidencia de casos en adultos jóvenes (25-40) para comprender su rol en la transmisión del virus. Con el fin de comprender mejor el comportamiento del virus, deben analizarse grupos demográficos específicos, con un tamaño de la muestra, para informar sobre estrategias de intervención más efectivas. Para futuros estudios, se recomienda explorar los factores que podrían haber contribuido a la aparente diferencia, pese a ser no significativa, en la tendencia de la frecuencia de muestras entre sexos biológicos. Esto se recomienda llevarlo a cabo de la mano de un análisis de síntomas y gravedad de los cuadros clínicos. De esta manera podrían identificarse razones detrás de las diferencias observadas para ayudar a personalizar las estrategias de salud pública y comprender el impacto del virus en distintos grupos demográficos. Se recomienda integrar datos genómicos con información clínica, cuando sea posible para analizar la relación entre las mutaciones identificadas y la sintomatología para proveer información sobre las ventajas que provee al virus bajo el contexto guatemalteco.

## XI. REFERENCIAS

- Abbasian, M. H., Mahmanzar, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Moradi, B., Sisakht, M. M., & Deng, Y. (2023). Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *Journal of Translational Medicine*, 21, 152. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03996-w>
- Al-Awwal, N., Dweik, F., Mahdi, S., El-Dweik, M., & Anderson, S. H. (2022). A Review of SARS-CoV-2 Disease (COVID-19): Pandemic in Our Time. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 368. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030368>
- Annavajhala, M. K., Mohri, H., Wang, P., Zucker, J. E., Sheng, Z., Gomez-Simmonds, A., Bedford, T., Ho, D. D., & Uhlemann, A.-C. (2021). A Novel and Expanding SARS-CoV-2 Variant, B.1.526, Identified in New York (p. 2021.02.23.21252259). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.02.23.21252259>
- Atri, D., Siddiqi, H. K., Lang, J. P., Nauffal, V., Morrow, D. A., & Bohula, E. A. (2020). COVID-19 for the Cardiologist: Basic Virology, Epidemiology, Cardiac Manifestations, and Potential Therapeutic Strategies. *JACC. Basic to Translational Science*, 5(5), 518–536. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.04.002>
- Beig Parikhani, A., Bazaz, M., Bamehr, H., Fereshteh, S., Amiri, S., Salehi-Vaziri, M., Arashkia, A., & Azadmanesh, K. (2021). The Inclusive Review on SARS-CoV-2 Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Potential Management Options. *Current Microbiology*, 78(4), 1099–1114. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02396-x>
- Boehm, E., Kronig, I., Neher, R. A., Eckerle, I., Vetter, P., Kaiser, L., & Geneva Centre for Emerging Viral Diseases. (2021). Novel SARS-CoV-2 variants: The pandemics within the

- pandemic. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(8), 1109–1117.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.022>
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003>
- Brito, A. F., Semenova, E., Dudas, G., Hassler, G. W., Kalinich, C. C., Kraemer, M. U. G., Ho, J., Tegally, H., Githinji, G., Agoti, C. N., Matkin, L. E., Whittaker, C., Danish Covid-19 Genome Consortium, COVID-19 Impact Project, Network for Genomic Surveillance in South Africa (NGS-SA), GISAID core curation team, Howden, B. P., Sintchenko, V., Zuckerman, N. S., ... Faria, N. R. (2021). Global disparities in SARS-CoV-2 genomic surveillance. *medRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*, 2021.08.21.21262393.  
<https://doi.org/10.1101/2021.08.21.21262393>
- Casella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2022). Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
- Castro, A., Tia, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z.-M. (2021). SARS-CoV-2: From its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & Bioscience*, 11(136).  
<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>
- CDC. (2020a, February 11). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/index.html>

- CDC. (2020b, February 11). *Enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19)*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
- Chakraborty, C., Bhattacharya, M., & Sharma, A. R. (2022). Present variants of concern and variants of interest of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: Their significant mutations in S-glycoprotein, infectivity, re-infectivity, immune escape and vaccines activity. *Reviews in Medical Virology*, 32(2), e2270. <https://doi.org/10.1002/rmv.2270>
- 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>
- Chen, J., Wang, R., & Wei, G.-W. (2021). Review of the mechanisms of SARS-CoV-2 evolution and transmission. *ArXiv*, arXiv:2109.08148v1.
- Chen, M., Ma, Y., & Chang, W. (2022). SARS-CoV-2 and the Nucleus. *International Journal of Biological Sciences*, 18(12), 4731–4743. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72482>
- Chen, Z., Azman, A. S., Chen, X., Zou, J., Tian, Y., Sun, R., Xu, X., Wu, Y., Lu, W., Ge, S., Zhao, Z., Yang, J., Leung, D. T., Domman, D. B., & Yu, H. (2022). Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. *Nature Genetics*, 54(4), 499–507. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01033-y>
- Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., Yadav, P., Gupta, N., Das, M., Rakshit, P., Singh, S., Abraham, P., Panda, S., & Team, N. (2021). SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*, 9(7), 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071542>

- CIOMS. (2017). *Pautas Éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos*. Organización Mundial de la Salud.
- Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, *176*, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
- CoVariants*: 20J (Gamma, V3). (n.d.-a). Retrieved February 10, 2023, from <https://covariants.org/variants/20J.Gamma.V3>
- CoVariants*: 21A (Delta). (n.d.-b). Retrieved February 10, 2023, from <https://covariants.org/variants/21A.Delta>
- CoVariants*: 21F (Iota). (n.d.-c). Retrieved February 9, 2023, from <https://covariants.org/variants/21F.Iota>
- Dickinson, E. R., Adelson, J. L., & Owen, J. (2012). Gender Balance, Representativeness, and Statistical Power in Sexuality Research Using Undergraduate Student Samples. *Archives of Sexual Behavior*, *41*(2), 325–327. <https://doi.org/10.1007/s10508-011-9887-1>
- Duerr, R., Dimartino, D., Marier, C., Zappile, P., Wang, G., Lighter, J., Elbel, B., Troxel, A. B., & Heguy, A. (n.d.). Dominance of Alpha and Iota variants in SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections in New York City. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(18), e152702. <https://doi.org/10.1172/JCI152702>
- Duong, D. (2021). Alpha, Beta, Delta, Gamma: What’s important to know about SARS-CoV-2 variants of concern? *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, *193*(27), E1059–E1060. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1095949>

- Emerging and Reemerging Infectious Disease Threats—ClinicalKey*. (n.d.). Retrieved January 19, 2023, from <https://www.clinicalkey.com#!/content/book/3-s2.0-B978032348255400014X>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1282, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1)
- Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
- Gargaglioni, L. H., & Marques, D. A. (2020). Let's talk about sex in the context of COVID-19. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 128(6), 1533–1538. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00335.2020>
- Genoud, V., Stortz, M., Waisman, A., Berardino, B. G., Veneri, P., Dansey, V., Salvatori, M., Lenicov, F. R., & Levi, V. (2021). Extraction-free protocol combining proteinase K and heat inactivation for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *PLOS ONE*, 16(2), e0247792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247792>
- Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., & Grubeck-Loebenstien, B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*, 14(3), 309–321. <https://doi.org/10.1111/accel.12326>
- Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., Boni, M. F., Doherty, P. C., Farrar, J.,

- Geoghegan, J. L., Jiang, X., Leibowitz, J. L., Neil, S. J. D., Skern, T., Weiss, S. R., Worobey, M., Andersen, K. G., ... Rambaut, A. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*, *184*(19), 4848–4856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Instituto Nacional de Estadística. (2021). *¿Cuántas mujeres habitan en Guatemala?* <https://www.ine.gob.gt/2021/03/>
- Jawad, B., Adhikari, P., Podgornik, R., & Ching, W.-Y. (2021). Key Interacting Residues between RBD of SARS-CoV-2 and ACE2 Receptor: Combination of Molecular Dynamics Simulation and Density Functional Calculation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*(9), 4425–4441. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00560>
- Khan, A., Zia, T., Suleman, M., Khan, T., Ali, S. S., Abbasi, A. A., Mohammad, A., & Wei, D.-Q. (2021). Higher infectivity of the SARS-CoV-2 new variants is associated with K417N/T, E484K, and N501Y mutants: An insight from structural data. *Journal of Cellular Physiology*, *236*(10), 7045–7057. <https://doi.org/10.1002/jcp.30367>
- Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T. D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J. W., Van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., De Munter, P., Gunst, J., ... Van Gerven, L. (2021). Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*, *184*(24), 5932-5949.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>

- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, *181*(4), 914-921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kim, Y. J., Jang, U. S., Soh, S. M., Lee, J.-Y., & Lee, H.-R. (2021). The Impact on Infectivity and Neutralization Efficiency of SARS-CoV-2 Lineage B.1.351 Pseudovirus. *Viruses*, *13*(4), 633. <https://doi.org/10.3390/v13040633>
- Kimura, I., Kosugi, Y., Wu, J., Zahradnik, J., Yamasoba, D., Butlertanaka, E. P., Tanaka, Y. L., Uriu, K., Liu, Y., Morizako, N., Shirakawa, K., Kazuma, Y., Nomura, R., Horisawa, Y., Tokunaga, K., Ueno, T., Takaori-Kondo, A., Schreiber, G., Arase, H., ... Sato, K. (2022). The SARS-CoV-2 Lambda variant exhibits enhanced infectivity and immune resistance. *Cell Reports*, *38*(2), 110218. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110218>
- Kiyotani, K., Toyoshima, Y., Nemoto, K., & Nakamura, Y. (2020). Bioinformatic prediction of potential T cell epitopes for SARS-Cov-2. *Journal of Human Genetics*, *65*(7), 569–575. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0771-5>
- Kumar, V., Singh, J., Hasnain, S. E., & Sundar, D. (2021). Possible Link between Higher Transmissibility of Alpha, Kappa and Delta Variants of SARS-CoV-2 and Increased Structural Stability of Its Spike Protein and hACE2 Affinity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9131. <https://doi.org/10.3390/ijms22179131>
- Laha, S., Chakraborty, J., Das, S., Manna, S. K., Biswas, S., & Chatterjee, R. (2020). Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *85*, 104445. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104445>

- Lechien, J. R., & Saussez, S. (2022). Importance of epidemiological factors in the evaluation of transmissibility and clinical severity of SARS-CoV-2 variants. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(1), 2–3. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00474-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00474-6)
- Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- Li, H., Stoddard, M. B., Wang, S., Blair, L. M., Giorgi, E. E., Parrish, E. H., Learn, G. H., Hraber, P., Goepfert, P. A., Saag, M. S., Denny, T. N., Haynes, B. F., Hahn, B. H., Ribeiro, R. M., Perelson, A. S., Korber, B. T., Bhattacharya, T., & Shaw, G. M. (2012). Elucidation of hepatitis C virus transmission and early diversification by single genome sequencing. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002880. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002880>
- Lin, J.-W., Tang, C., Wei, H.-C., Du, B., Chen, C., Wang, M., Zhou, Y., Yu, M.-X., Cheng, L., Kuivanen, S., Ogando, N. S., Levanov, L., Zhao, Y., Li, C.-L., Zhou, R., Li, Z., Zhang, Y., Sun, K., Wang, C., ... Chen, L. (2021). Genomic monitoring of SARS-CoV-2 uncovers an Nsp1 deletion variant that modulates type I interferon response. *Cell Host & Microbe*, 29(3), 489-502.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.015>
- Lin, L., Li, Q., Wang, Y., & Shi, Y. (2021). Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: A disastrous unity to eliminate lymphocytes. *Cell Death & Differentiation*, 28(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00795-y>
- Liu, Y., Liu, J., Johnson, B. A., Xia, H., Ku, Z., Schindewolf, C., Widen, S. G., An, Z., Weaver, S. C., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P.-Y. (2021). Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *bioRxiv*, 2021.08.12.456173. <https://doi.org/10.1101/2021.08.12.456173>

- Liu, Y., Liu, J., Johnson, B. A., Xia, H., Ku, Z., Schindewolf, C., Widen, S. G., An, Z., Weaver, S. C., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P.-Y. (2022). Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *Cell Reports*, *39*(7), 110829. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110829>
- Manivannan, M., Jogalekar, M. P., Kavitha, M. S., Maran, B. A. V., & Gangadaran, P. (2021). A mini-review on the effects of COVID-19 on younger individuals. *Experimental Biology and Medicine*, *246*(3), 293–297. <https://doi.org/10.1177/1535370220975118>
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>
- Molina-Mora, J. A., Reales-González, J., Camacho, E., Duarte-Martínez, F., Tsukayama, P., Soto-Garita, C., Brenes, H., Cordero-Laurent, E., Ribeiro dos Santos, A., Guedes Salgado, C., Santos Silva, C., Santana de Souza, J., Nunes, G., Negri, T., Vidal, A., Oliveira, R., Oliveira, G., Muñoz-Medina, J. E., Salas-Lais, A. G., ... Herrera-Estrella, A. (2023). Overview of the SARS-CoV-2 genotypes circulating in Latin America during 2021. *Frontiers in Public Health*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2023.1095202>
- Motozono, C., Toyoda, M., Zahradnik, J., Saito, A., Nasser, H., Tan, T. S., Ngare, I., Kimura, I., Uriu, K., Kosugi, Y., Yue, Y., Shimizu, R., Ito, J., Torii, S., Yonekawa, A., Shimon, N., Nagasaki, Y., Minami, R., Toya, T., ... Sato, K. (2021). SARS-CoV-2 spike L452R variant

- evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1124-1136.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.006>
- MSPAS. (2021a). *Alerta Epidemiológica por hallazgo de variante VOC B.1.617.2-Delta- SARS-CoV-2 en Guatemala.*
- MSPAS. (2021b). *Alerta Epidemiologica por Hallazgo de Variantes VOC Alpha, gama y beta de SARS-CoV-2 En Guatemala.* Departamento de Epidemiología.
- MSPAS. (2021c). *Laboratorio Nacional de Salud inicia vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Guatemala.* <https://epidemiologia.mspas.gob.gt/institucional/noticias/covid-19-guatemala/laboratorio-nacional-de-salud-inicia-vigilancia-genomica-del-sars-cov-2-en-guatemala>
- MSPAS. (2021d). *Protocolo provisional para la vigilancia genómica de SARS-CoV-2.* 7–7.
- Muik, A., Wallisch, A.-K., Sanger, B., Swanson, K. A., Muhl, J., Chen, W., Cai, H., Maurus, D., Sarkar, R., Tureci, .., Dormitzer, P. R., & ahin, U. (2021). Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine–elicited human sera. *Science*, 371(6534), 1152–1153. <https://doi.org/10.1126/science.abg6105>
- Nagy, ., Pongor, S., & Gyorffy, B. (2021). Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(2), 106272. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106272>
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>

- Ocote, A., & Rivas, A. M. (2021, August 9). Las variantes del coronavirus: ¿cuáles están en Guatemala y qué implican? *Agencia Ocote*.  
<https://www.agenciaocote.com/blog/2021/08/09/las-variantes-del-coronavirus-cuales-estan-en-guatemala-y-que-implican/>
- Oreshkova, N., Molenaar, R. J., Vreman, S., Harders, F., Oude Munnink, B. B., Hakze-van der Honing, R. W., Gerhards, N., Tolsma, P., Bouwstra, R., Sikkema, R. S., Tacken, M. G., de Rooij, M. M., Weesendorp, E., Engelsma, M. Y., Brusckhe, C. J., Smit, L. A., Koopmans, M., van der Poel, W. H., & Stegeman, A. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance*, *25*(23), 2001005.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>
- Plummer, J. T., Contreras, D., Zhang, W., Binek, A., Zhang, R., Dezem, F., Chen, S. S., Davis, B. D., Sincuir Martinez, J., Stotland, A., Kreimer, S., Makhoul, E., Heneidi, S., Eno, C., Shin, B., Berg, A. H., Cheng, S., CORALE Study Group, Jordan, S. C., ... Morgan, M. A. (2022). US Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Epsilon Variant: Highly Transmissible but With an Adjusted Muted Host T-Cell Response. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *75*(11), 1940–1949. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac295>
- Pondé, R. A. A. (2022). Physicochemical effect of the N501Y, E484K/Q, K417N/T, L452R and T478K mutations on the SARS-CoV-2 spike protein RBD and its influence on agent fitness and on attributes developed by emerging variants of concern. *Virology*, *572*, 44–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.05.003>
- Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations.* (2020, December 18). *Virological*.

<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>

Promega Corporation. (2019). *Technical manual QuantiFluor RNA System*.

Rawson, J. M. O., Landman, S. R., Reilly, C. S., & Mansky, L. M. (2015). HIV-1 and HIV-2 exhibit similar mutation frequencies and spectra in the absence of G-to-A hypermutation. *Retrovirology*, *12*, 60. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0180-6>

Ren, W., Ju, X., Gong, M., Lan, J., Yu, Y., Long, Q., Kenney, D. J., O'Connell, A. K., Zhang, Y., Zhong, J., Zhong, G., Douam, F., Wang, X., Huang, A., Zhang, R., & Ding, Q. (n.d.). Characterization of SARS-CoV-2 Variants B.1.617.1 (Kappa), B.1.617.2 (Delta), and B.1.618 by Cell Entry and Immune Evasion. *mBio*, *13*(2), e00099-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00099-22>

Ruggieri, A., Anticoli, S., D'Ambrosio, A., Giordani, L., & Viora, M. (2016). The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *52*(2), 198–204. [https://doi.org/10.4415/ANN\\_16\\_02\\_11](https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_11)

Saito, A., Irie, T., Suzuki, R., Maemura, T., Nasser, H., Uriu, K., Kosugi, Y., Shirakawa, K., Sadamasu, K., Kimura, I., Ito, J., Wu, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Yamayoshi, S., Loeber, S., Tsuda, M., Wang, L., Ozono, S., ... Sato, K. (2022). Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*, *602*(7896), Article 7896. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>

*SARS-CoV-2 variants of concern as of 12 January 2023*. (n.d.). Retrieved January 24, 2023, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

Sheahan, T., Rockx, B., Donaldson, E., Sims, A., Pickles, R., Corti, D., & Baric, R. (2008). Mechanisms of Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Host Range

Expansion in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*, 82(5), 2274–2285.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02041-07>

Tchesnokova, V., Kulasekara, H., Larson, L., Bowers, V., Rechkina, E., Kisiela, D., Sledneva, Y., Choudhury, D., Maslova, I., Deng, K., Kutumbaka, K., Geng, H., Fowler, C., Greene, D., Ralston, J., Samadpour, M., & Sokurenko, E. (n.d.). Acquisition of the L452R Mutation in the ACE2-Binding Interface of Spike Protein Triggers Recent Massive Expansion of SARS-CoV-2 Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(11), e00921-21.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00921-21>

Tchesnokova, V., Kulasekara, H., Larson, L., Bowers, V., Rechkina, E., Kisiela, D., Sledneva, Y., Choudhury, D., Maslova, I., Deng, K., Kutumbaka, K., Geng, H., Fowler, C., Greene, D., Ralston, J., Samadpour, M., & Sokurenko, E. (2021). Acquisition of the L452R Mutation in the ACE2-Binding Interface of Spike Protein Triggers Recent Massive Expansion of SARS-CoV-2 Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(11), 10.1128/jcm.00921-21.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.00921-21>

Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., ... de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), Article 7854. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>

Teruel, N., Mailhot, O., & Najmanovich, R. J. (2021). Modelling conformational state dynamics and its role on infection for SARS-CoV-2 Spike protein variants. *PLoS Computational Biology*, 17(8), e1009286. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009286>

- The proximal origin of SARS-CoV-2 | Nature Medicine.* (n.d.). Retrieved January 19, 2023, from <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>
- Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., Dong, X., & Zheng, P. (n.d.). N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *eLife*, *10*, e69091. <https://doi.org/10.7554/eLife.69091>
- Tracking SARS-CoV-2 variants.* (n.d.). Retrieved January 26, 2023, from <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- Vasireddy, D., Vanaparthi, R., Mohan, G., Malayala, S. V., & Atluri, P. (2021). Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know? *Journal of Clinical Medicine Research*, *13*(6), 317–325. <https://doi.org/10.14740/jocmr4518>
- Viasure. (2021). *SARS-CoV-2 Variant I y Variant II.*
- Vigilancia Genómica SARS-CoV-2.* (n.d.). Retrieved February 8, 2023, from <https://secuenciacionlns.shinyapps.io/DashboardVigilanciaGenomica/>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wambier, C. G., Goren, A., Vaño-Galván, S., Ramos, P. M., Ossimetha, A., Nau, G., Herrera, S., & McCoy, J. (2020). Androgen sensitivity gateway to COVID-19 disease severity. *Drug Development Research*, *81*(7), 771–776. <https://doi.org/10.1002/ddr.21688>
- Wang, W. B., Liang, Y., Jin, Y. Q., Zhang, J., Su, J. G., & Li, Q. M. (2021). E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: Binding free energy calculation studies. *Journal*

*of Molecular Graphics & Modelling*, 109, 108035.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.108035>

Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A., Kumar, A., & Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 10(4), 821.  
<https://doi.org/10.3390/cells10040821>

Yang, W.-T., Huang, W.-H., Liao, T.-L., Hsiao, T.-H., Chuang, H.-N., & Liu, P.-Y. (2022). SARS-CoV-2 E484K Mutation Narrative Review: Epidemiology, Immune Escape, Clinical Implications, and Future Considerations. *Infection and Drug Resistance*, 15, 373–385.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S344099>

Yuan, S., Balaji, S., Lomakin, I. B., & Xiong, Y. (2021). Coronavirus Nsp1: Immune Response Suppression and Protein Expression Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.752214>

Zhan, Y., Yin, H., & Yin, J.-Y. (2022). B.1.617.2 (Delta) Variant of SARS-CoV-2: Features, transmission and potential strategies. *International Journal of Biological Sciences*, 18(5), 1844–1851. <https://doi.org/10.7150/ijbs.66881>

Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Rangarajan, E. S., Izard, T., Farzan, M., & Choe, H. (2020). *The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces SI shedding and increases infectivity* (p. 2020.06.12.148726). bioRxiv.  
<https://doi.org/10.1101/2020.06.12.148726>

Zhang, W., Davis, B. D., Chen, S. S., Sincuir Martinez, J. M., Plummer, J. T., & Vail, E. (2021). Emergence of a Novel SARS-CoV-2 Variant in Southern California. *JAMA*, 325(13), 1324–1326. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.1612>

Zuckerman, N. S., Fleishon, S., Bucris, E., Bar-Ilan, D., Linial, M., Bar-Or, I., Indenbaum, V., Weil, M., Lustig, Y., Mendelson, E., Mandelboim, M., Mor, O., & Zuckerman, N. (2021). A Unique SARS-CoV-2 Spike Protein P681H Variant Detected in Israel. *Vaccines*, 9(6), 616. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060616>

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Obtención de muestras

Se trabajó con muestras retrospectivas de pacientes cuyo diagnóstico inicial por prueba de RT-PCR para SARS-CoV-2 fue positivo. Las muestras fueron asignadas por el Centro de Diagnóstico Multimédica, TecniScan, ubicado en el Boulevard Vista Hermosa 25-19, Zona 15, Edificio Multimédica, Guatemala. Las muestras fueron utilizadas como remanentes de casos ambulatorios de trabajo en el Laboratorio que se encontraban almacenadas en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras positivas fueron seleccionadas al azar, por lo que no se trabajó con la información personal de los pacientes.

Para el procesamiento de muestras no se requirió un consentimiento informado para el uso de materiales que habían sido almacenados debido a que no era factible o viable realizar la investigación sin el biobanco de muestras nasofaríngeas. Asimismo, no era factible solicitar la firma de un consentimiento informado debido a que no se cuenta con los nombres, direcciones, números de teléfono de los pacientes. Asimismo, la investigación tiene un valor social importante ya que presenta un análisis epidemiológico de las variantes de SARS-CoV-2 por mes. Asimismo, el procesamiento de muestras se realizó con el fin de proveer evidencia de una herramienta que provee información sobre las variantes de manera rápida, que no requiere de secuenciación en el extranjero y puede utilizarse para un mayor número de muestras con un menor costo. Finalmente, la investigación no implica riesgos para el paciente o el grupo al cual este pertenece. En primera instancia, no representa un riesgo dado que la identidad del paciente se desconoce en su totalidad debido a que no se tiene acceso a su información personal. Segundo, es una muestra que fue empleada para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en 2021, por lo que el paciente no entraría en contacto con la muestra una vez procesada, en otras palabras, la muestra no es reaplicada al paciente (CIOMS, 2017).

El investigador está totalmente desligado de información personal y el contacto de los sujetos. Las muestras se trabajaron únicamente con un código aleatorio, mes de obtención de la muestra, sexo biológico y edad. Al obtener los resultados, las muestras obtuvieron un nuevo identificador

que consistía en un correlativo numérico que incluye mes, número de muestra y el Ct obtenido durante el diagnóstico inicial en 2021 (Ej. Jul-18-8.45 para la muestra 18 del conjunto de muestras que corresponden a julio que obtuvo un Ct de 8.45). El nuevo identificador fue también asignado de manera aleatoria. Dado que la naturaleza del estudio es retrospectiva y las muestras se trabajaron con un identificador aleatorio, no fue necesario un consentimiento informado.

Se trabajó con 160 muestras provenientes de hisopados nasofaríngeos colectados en 7 mL solución tampón fosfato salino (PBS), colectadas entre abril y agosto de 2021. Las muestras seleccionadas provenían de pacientes ambulatorios cuyo diagnóstico de SARS-CoV-2 fue positivo y contaba con un Ct menor a 25. La razón por la cual se seleccionaron las muestras positivas con Ct menor a 25 fue el prolongado tiempo de almacenamiento que llevaban las muestras al momento de procesarlas (16-20 meses) y que se sabe que, debido a traslados, estas habían pasado por varios ciclos de congelación y descongelación. Asimismo, se seleccionaron entre 20 y 35 muestras por mes para que hubiera una muestra estadísticamente significativa por mes.

## Anexo 2. Optimización de extracción de ARN

Con el fin de reducir costos, se seleccionó un protocolo alternativo al protocolo utilizado originalmente el cual consiste en una extracción automatizada utilizando kits marca Zybio. Se hizo una prueba con tres métodos de extracción: extracción automatizada, extracción con calor y extracción con calor y proteinasa K.

### Anexo 2.1. Método de extracción automatizada

Este método de extracción utiliza sistema de aislamiento de ácidos nucleicos y kit de extracción viral de ácidos nucleicos marca Zybio. Este protocolo fue proveído por TecniScan.

- Limpiar superficie de trabajo con cloro 5%, etanol 70% y nucleoclean antes de comenzar
- Colocar capuchones de la placa en el equipo y activar luz ultravioleta por 10 minutos
- Al abrir un kit nuevo, mezclar los componen en la placa hasta no observar precipitados de los beads

- Aplicar golpes suaves a la placa sobre una superficie para evitar que gotas de reactivo estén en el film de la placa
- Retirar film de aluminio de la placa de la columna 1
- Agregar 15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a cada pozo de la columna 1
- Trasládarse a área de muestra y colocar placa dentro de campana
- Colocar muestra en vórtex por 15 segundos.
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de muestra en el pozo de reacción
- Identificar placa y retirar el film de aluminio
- Introducir placa a equipo
- Seleccionar “RUN”
- Retirar placa y capuchones cuando termine la extracción
- Activar luz ultravioleta por 10 minutos
- Colocar placa en la campana
- Transferir volumen de muestra necesario para reacción a strips con máster mix

#### Anexo 2.2. Método de extracción por calor (Genoud et al., 2021)

- Limpiar la campana de flujo laminar con cloro 10% y etanol 70% y nucleoclean antes de comenzar.
- Colocar muestra en un vórtex por 15 segundos.
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de muestra de hisopado nasofaríngeo a un tubo de 1.5 mL.
- Calentar muestra en termobloque a 65 °C por 20 minutos.
- Hacer un *spin down* por 30 segundos
- Utilizar 5  $\mu\text{L}$  de extracto de ARN obtenido para RT- qPCR.
- Almacenar extracto a 4 °C

### Anexo 2.3. Método de extracción por calor y proteinasa K (PK) (Genoud et al., 2021)

- Limpiar el área de trabajo y la campana de flujo laminar con cloro 10% y etanol 70% y Nucleoclean antes de comenzar.
- Preparar tubos de 1.5 mL con 10 µL de PK 10 mg/mL
- Agregar 90 µL de muestra
- Calentar muestra a 55 °C por 15 minutos
- Calentar la muestra a 98 °C por 5 minutos
- Realizar un *spin down* por 15 segundos
- Enfriar a 4 °C por 5 minutos
- Agregar 5 µL del extracto de ARN para la RT-qPCR.
- Almacenar extracto a 4 °C o almacenar a - 20 °C por máximo 20 horas

Se realizó una prueba de corrida utilizando dos muestras extraídas utilizando cada método para confirmar el ARN obtenido puede utilizarse para la RT-qPCR multiplex (Ver metodología de RT-qPCR).

### Anexo 3. Cuantificación de ARN

- Limpiar las superficies de trabajo con cloro 10%, etanol 70% y nucleoclean.
- Preparar Buffer TE a una concentración 1X en el área blanca.
- Rotular tubos 1.5 como Dye y cubrir con papel aluminio para proteger de la luz.
- Preparar Dye diluido según número de muestras a cuantificar la cantidad de RNA probable de la muestra y dos reacciones adicionales para blanco y estándar (Cuadro 6 y Cuadro 7).

Cuadro 11 Preparación de dye y buffer para cuantificación de ARN por QuantiFluor para muestras de alta concentración

Reactivo/No. Mx	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Buffer TE 1X (µL)	598.5	798	997.5	1197	1396.5	1596	1795.5	1995	2194.5	2394
Dye concentrado (µL)	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6

Cuadro 12 Preparación de dye y buffer para cuantificación de ARN por QuantiFluor para muestras de baja concentración

Reactivo/No. Mx	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Buffer TE 1X (µL)	599.7	799.6	997.5	1199.4	1399.3	1599.2	1799.1	1999	2198.9	2398.8
Dye concentrado (µL)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	1.1	1.2

- Rotular tubos de 0.5 mL para cuantificación de muestras y dos tubos para blanco y estándar
- Cubrir tubos con papel aluminio
- Agregar 200 µL de QuantiFluor RNA Dye preparado
- En área de controles, preparar el estándar según protocolo
  - Para muestras de alta concentración: agregar 5 µL de estándar (100 ng/ µL)
  - Para muestras de baja concentración preparar una dilución 1/100 del estándar concentrado y agregar 10 µL
- Colocar en vórtex por 5 segundos
- Encender Fluorómetro Quantus y seleccionar protocolo
- Leer blanco y estándar
- Introducir individualmente las muestras y medir

#### Anexo 4. RT PCR multiplex

Se utilizó kit Variant I de marca Viasure para identificar las siguientes mutaciones: N501Y, E484K, K417N, K417T. Se utiliza kit Variant II de marca Viasure para identificar las siguientes mutaciones: P681R, L452R y E484Q. Además, Variant II incluye un control interno que corresponde al gen RNasa P, presente en ADN humano.

##### Anexo 4. 1. Preparación de control positivo liofilizado

- Limpiar las superficies de trabajo con cloro 10%, etanol 70% y nucleoclean (área de controles)
- Reconstituir control positivo liofilizado: agregar 100 µL de agua libre de RNasa/ADNasa (vial blanco)
- Vórtex hasta completamente disuelto
- Preparar alícuotas de 10 µL en tubos de 0.2 mL.
- Almacenar a -20 ° C.

##### Anexo 4. 2. Protocolo de PCR (Viasure, 2021)

- Limpiar superficies de trabajo (campana, área de controles y área blanca) con cloro 10%, etanol 70% y nucleoclean.
- Reconstituir el número de pozos que se utilizarán (por kit) con 15 µL de buffer de rehidratación (vial azul).
- Trasladar máster mix de área blanca a campana.
- Agregar 5 µL de extracto de ARN
- Colocar caps de los tubos, excepto los controles.
- Trasladar gradilla al área de controles.
- Agregar 5 µL de control positivo.
- Realizar vórtex y *spin down* a las muestras.
- Limpiar tubos con toalla de papel con nucleoclean.
- Colocar tubos en termociclador programado con el protocolo de PCR (Cuadro 2).

Cuadro 13 Protocolo de PCR para termociclador

Ciclos	Paso	Tiempo	Temperatura (° C)
1	Transcripción reversa	15 min	45
1	Desnaturalización inicial	2 min	95
45	Desnaturalización	10 sec	95
	Anillamiento/Extensión y colección de datos	50 sec	63

Cuadro 14 Resultados de amplificación de muestras estudiadas e identificación de variantes

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
ID	Fecha de hisopado	FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	VARIANTE
Junio-26-8.11	13/06/21	20.11	0	20.84	23.95	0	0	0	22.94	B.1.1.28 BRASIL
Junio-209-7.52	25/06/21	25.46	0	26.85	19.5	0	0	0	26.95	B.1.1.28 BRASIL
Abril-60-10.98	21/04/21	23	0	24.82	29.43	0	0	0	24.6	B.1.1.28 BRASIL
Junio-53-10.29	25/06/21	21.18	0	23.99	28.76	0	0	0	24.32	B.1.351 SUDÁFRICA
Julio-255-20.77	6/7/21	30.42		32.3	33.63	0	0	0	29.12	B.1.351 SUDÁFRICA
Junio-123-11.91	10/6/21	24.5	0	24.79	26.93	0	0	0	27.87	B.1.351 SUDÁFRICA
Abril-27-17.21	18/04/21	0	0	0	18.09	0	0	0	22.42	B1.1.7 REINO UNIDO
Abril-21-17.34	29/04/21	0	0	0	35.08	0	0	0	23.51	B1.1.7 REINO UNIDO
Mayo-11-10.18	5/5/21	0	0	0	25.06	0	0	0	23.96	B1.1.7 REINO UNIDO
Mayo-65-12.3	6/5/21	0	0	0	28.71	0	0	0	26.73	B1.1.7 REINO UNIDO
Julio-9-13.06		0	0	0	24.58	0	0	0	24.58	B1.1.7 REINO UNIDO

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Agosto-296-11.03	16/08/21	0	0	0	0	27.87	28.03	0	28.03	DELTA
Agosto-230-11.79	30/08/21	0	0	0	0	29.05	28.95	0	24.03	DELTA
Agosto-43-7.93	24/08/21	0	0	0	0	32.64	41.46	0	23.89	DELTA
Julio-251-11.48	9/7/31	0	0	0	0	34.44	40.44	0	25.8	DELTA
Julio-59-12.4	5/7/21	0	0	0	0	31.78	36.94	0	26.28	DELTA
Agosto-434-11.2	23/08/21	0	0	0	0	29.68	34.14	0	22.58	DELTA
Agosto-2408	24/08/21	0	0	0	0	35.37	37.38	0	27.04	DELTA
Agosto-178-17.16	6/8/21	0	0	0	0	25.81	26.52	0	23.42	DELTA
Agosto-51-17.98	7/8/21	0	0	0	0	37.02	38.3	0	25.61	DELTA
Agosto-334-19.15	24/08/21	0	0	0	0	26.52	33.35	0	25.28	DELTA
Agosto-19-12.83	22/08/21	0	0	0	0	37.79	39.58	0	29.23	DELTA
Agosto-50-15.7	17/08/21	0	0	0	0	31.42	34.25	0	28.35	DELTA
Agosto-391-15.78	16/08/21	0	0	0	0	32.03	33.28	0	26.56	DELTA
Agosto-281-19.96	24/08/21	0	0	0	0	38.82	40.47	0	29.41	DELTA
Agosto-162-20.54	24/08/21	0	0	0	0	28.9	29.75	0	26.99	DELTA
Agosto-391-21.24	24/08/21	0	0	0	0	26.74	30.37	0	25.84	DELTA
Agosto-387-12.89	17/08/21	0	0	0	0	22.8	23.38	0	27.11	DELTA
Agosto-29-13.49	28/08/21	0	0	0	0	34.81	35.24	0	26.72	DELTA
Agosto-162-13.57	19/08/21	0	0	0	0	28.82	30.34	0	26.94	DELTA
Agosto-31-14.24	23/08/21	0	0	0	0	28.85	29.04	0	28.29	DELTA

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Julio-156-11.64	15/07/21	0	0	0	0		30.6	0	24.32	EPSILON
Abril-95-11.6	28/04/21	0	0	0	0	0	30.35	0	25.34	EPSILON
Abril-165-13.11	28/04/21	0	0	0	0	0	33.14	0	22.91	EPSILON
Abril-119-15.41	30/04/21	0	0	0	0	0	37.84	0	23.09	EPSILON
Junio-171-14.49	16/06/21	0	0	0	0	0	28.31	0	24.66	EPSILON
Julio-120-12.57	14/07/21	0	0	0	0	0	25.72	0	25.56	EPSILON
Junio-34-13.61	13/06/21	0	0	0	0	0	28.3	0	23.55	EPSILON
Mayo-162-10.35	19/05/21	0	0	0	0	0	35.36	0	25.75	EPSILON
Mayo-176-11.08	18/05/21	0	0	0	0	0	28.5	0	23.51	EPSILON
Mayo-121-11.7	4/5/21	0	0	0	0	0	23.52	0	22.49	EPSILON
Mayo-46-11.84	18/05/21	0	0	0	0		22.61	0	28.17	EPSILON
Mayo-190-14.11	27/05/21	0	0	0	0	0	29.31	0	25.53	EPSILON
Mayo-99-14.72	26/07/21	0	0	0	0	0	29.38	0	25.45	EPSILON
Mayo-9-18.09	24/05/21	0	0	0	0	0	26	0	26.62	EPSILON
Mayo-0607	6/7/21	0	0	0	0	0	25.58	0	26.39	EPSILON
Julio-329-14.13	6/7/21	0	0	0	0	0	25.47	0	27.73	EPSILON
Julio-232-14.51	15/07/21	0	0	0	0	0	30.89	0	25.4	EPSILON
Julio-1-19.51	24/07/21	0	0	0	0	0	25.42	0	25.92	EPSILON

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Julio-15-14.2	18/07/21	0	0	0	0	33.12	25.37	0	26.67	DELTA
Julio-1907	19/07/21	0	0	0	0	24.83	26.5	0	25.82	DELTA
Julio-86-12.74	26/07/21	0	0	0	0	27.28	27.69	0	26.88	DELTA
Julio-12-11.86	28/07/21	0	0	0	0	28.39	29.41	0	26.55	DELTA
Agosto-109-19.35	25/08/21	0	30.01	0	0	33.6	36.57	0	24.27	MUTACIONES K417N, P681R Y L452R
Abril-166-8.83	19/04/21	0	0	0	0	0	26.3	0	22.49	EPSILON
Julio-56-10.08	5/7/21	0	0	0	0	0	24.73	0	26.05	EPSILON
Abril-33-10.52	20/04/21	0	0	0	0	0	30.48	0	26	EPSILON
Mayo-166-9.5	4/5/21	0	0	0	0	0	29.71	0	23.72	EPSILON
Junio-32-8.24	13/06/21	0	0	0	0	0	28.75	0	23.66	EPSILON
Julio-37-13.48	2/7/21	0	0	0	0	34.85	32.83	0	30.15	DELTA
Julio-258-11	6/7/21	0	0	0	0	0	32.85	0	25.14	EPSILON
Abril-164-11.07	21/04/21	0	0	0	0	0	27	0	24.44	EPSILON
Abril-66-11.43	21/04/21	0	0	0	0	0	38.41	0	25.94	EPSILON
Mayo-98-9.56	27/05/21	0	0	0	0	0	32.44	0	24.33	EPSILON
Mayo-13-9.88	27/05/21	0	0	0	0	0	29.11	0	25.07	EPSILON
Mayo-51-51	21/05/21	0	0	0	0	0	27.5	0	24.13	EPSILON
Junio-92-9.15	12/6/21	0	0	0	0	0	28.86	0	22.42	EPSILON
Junio-1106	11/6/21	0	0	0	0	0	26.65	0	23.56	EPSILON

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Julio-150-21.48	7/7/21	0	0	0	0	0	33	0	29.88	EPSILON
Junio-49-10.02	11/6/21	0	0	0	0	0	21.84	0	26.39	EPSILON
Junio-53-10.95	16/06/21	0	0	0	0	0	25.63	0	27.4	EPSILON
Junio-159-10.98	19/06/21	0	0	0	0	0	33.6	0	28.18	EPSILON
Junio-165-11.65	17/06/21	0	0	0	0	0	23.39	0	25.62	EPSILON
Junio-206-14.5	15/06/21	0	0	0	0	0	24.95	0	30.21	EPSILON
Junio-190-14.61	7/6/21	0	0	0	0	0	32.83	0	31.64	EPSILON
Junio-41-14.73	8/6/21	0	0	0	0	0	31.94	0	29.56	EPSILON
Junio-2206	22/06/21	0	0	0	0	0	29.15	0	29.43	EPSILON
Junio-167-19.61	24/06/21	0	0	0	0	0	27.3	0	28.9	EPSILON
Junio-74-20.16	12/6/21	0	0	0	0	0	37.67	0	29.63	EPSILON
Agosto-213-16.8	20/08/21	0	0	0	0	37.98	0	0	25.27	MUTACIÓN P681R
Mayo-145-13.78	18/05/21	34.39	0	0	38.66	0	0	0	25.96	MUTACIONES E484K Y N501Y
Mayo-122-16.74	24/05/21	32.05	0	0	36.02	0	0	0	29.24	MUTACIONES E484K Y N501Y
Junio-190-12.67	8/6/21	23.97	0	0	26.17	0	0	0	28.98	MUTACIONES E484K Y N501Y
Abril-7-14.62	24/04/21	0	34.31	0	40.75	0	0	0	24.27	MUTACIONES K417N Y N501Y
Mayo-144-10.6	25/05/21	0	0	0	0	0	23.48	31.02	23.51	MUTACIONES L452R Y E484Q
Abril-215-13.35	30/04/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Abril-290-14.12	30/04/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Abril-128-16.2	28/04/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Mayo-124-13.07	6/5/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Mayo-152-22.76	24/05/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-240-11.75	16/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-78-13.56	21/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-256-14.42	12/8/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-32-15.96	26/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-73-16.28	23/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-19-17.29	21/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-127-18.75	25/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-156-19.56	4/8/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-132-22.87	3/8/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-370-	30/08/22	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-73-13.22	21/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-153-13.36	25/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-283-13.57	24/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado
Agosto-2608	26/08/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificado

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Junio-139-10.38	24/06/21	0	0	0	0	0	0	0		No amplificó
Junio-170-10.79	24/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Mayo-88-8.23	25/05/21	0	0	0	0	0	0	0	22.28	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Abril-85-9.02	22/04/21	0	0	0	0	0	0	0	25.54	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Mayo-73-8.64	14/05/21	0	0	0	0	0	0	0	24.13	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Julio-347-10.87	6/7/21	0	0	0	0	0	0	0	25.09	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-2608	26/08/21	0	0	0	0	0	0	0	25.87	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-248-10.68	3/8/21	0	0	0	0	0	0	0	29.21	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-391-11.06	20/08/21	0	0	0	0	0	0	0	25.22	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-183-11.14	23/08/21	0	0	0	0	0	0	0	23.37	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Abril-93-12.87	20/04/21	0	0	0	0	0	0	0	26.58	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Abril-190-15.47	21/04/21	0	0	0	0	0	0	0	23.54	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Abril-62-16.91	21/04/21	0	0	0	0	0	0	0	23.83	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
ID	Fecha de hisopado	FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	VARIANTE
Abril-114-18.32	21/04/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Mayo-99-11.43	25/05/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Mayo-174-11.66	5/5/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Mayo-216-11.66	27/05/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Mayo-1705	17/05/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Julio-265-13.06		0	0	0	0	0	28.55	0	28.26	EPSILON
Junio-181-12.63	29/06/21	0	0	0	0	0	36.32	0	29.74	EPSILON
Junio-151-13.44	16/06/21	0	0	0	0	0	0	0		No amplificó
Junio-114-13.55	21/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-56-13.68	29/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-66-14.09	10/6/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-112-14.27	7/6/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Agosto-169-17.68	10/8/21	0	0	0	0	0	0	0	28.22	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Julio-13-15.92		0	0	0	0	0	0	0	28.4	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Junio-104-12.81	21/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-145-13.16	23/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-370-13.18	14/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Junio-223-13.34	23/06/21	0	0	0	0	0	0	0	0	No amplificó
Abril-121-19.44	20/04/21	0	0	0	0	0	0	0	23.86	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Abril-94-20.65	28/04/21	0	0	0	0	0	0	0	23.98	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-247-21.81	23/08/21	0	0	0	0	0	0	0	26.16	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Julio-311-18.84	21/07/21	0	0	0	0	0	0	0	22.08	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Mayo-10-16.26	30/05/21	0	0	0	0	0	0	0	27.53	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Mayo-178-20.4	5/5/21	0	0	0	0	0	0	0	27.57	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Agosto-313-17.67	20/08/21	0	0	0	0	0	0	0	30.02	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Julio-2807	28/07/21	0	0	0	0	0	0	0	26.66	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Junio-170-12.94	22/06/21	0	0	0	0	0	0	0	26.52	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Junio-18-13.49	25/06/21	0	0	0	0	0	0	0	29.48	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN

Información de la muestra		VARIANT I				VARIANT II				Interpretación de resultados
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	
ID	Fecha de hisopado	E484K	K417N	K417T	N501Y	P681R	L452R	E484Q	IC	VARIANTE
Junio-18-13.49	25/06/21	0	0	0	0	0	0	0	29.48	NO SE DETECTÓ NINGUNA MUTACIÓN
Julio-314-21.06	9/7/21	0	0	0	0	0	40.38	0	27.32	EPSILON
Julio-386-12.84	13/07/21	0	0	0	0	0	32.21	0	26.6	EPSILON
Junio-383-9.65	14/06/21	0	0	0	0	0	30.67	0	25.75	EPSILON

## INFORMACIÓN DE CONTACTO

Investigadora principal y asesora (PI)

Claudia Carranza, PhD  
[ccarranza@tecniscan.com](mailto:ccarranza@tecniscan.com)

Coinvestigadora (estudiante)

Ivanna Estela López Ayala  
[lop19157@uvg.edu.gt](mailto:lop19157@uvg.edu.gt)

Directora de Departamento

Patrizia Lupo, PhD  
[plupo@uvg.edu.gt](mailto:plupo@uvg.edu.gt)