



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida
Ingeniería en Biotecnología

*Evaluación de incidencia, positividad y variantes genéticas de
SARS-CoV-2 en la Amazonía ecuatoriana entre a julio a
noviembre 2021*

Reny Leandro Jaramillo Ruiz

Tena, enero 2022

Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 04 de Enero de 2022

Yo, Reny Leandro Jaramillo Ruiz con documento de identidad N° 1600735177, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título “Evaluación de incidencia, positividad y variantes genéticas de SARS-CoV-2 en la Amazonía ecuatoriana entre julio a noviembre 2021” son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Reny Leandro Jaramillo Ruiz
1600735177

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Evaluación de incidencia, positividad y variantes genéticas de SARS-CoV-2 en la Amazonía ecuatoriana entre julio a noviembre 2021”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Reny Leandro Jaramillo Ruiz, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 04 de Enero de 2022

Firma:

 Firmado electrónicamente por:
**FABIAN
ORLANDO
AGUILAR MORA**

.....

MSc. Fabián Orlando Aguilar Mora C.I:

1717348088

Firma:

**CARLOS
VINICIO
CHILUISA
GUACHO** Firmado
digitalmente por
CARLOS VINICIO
CHILUISA GUACHO
Fecha: 2022.01.05
13:18:05 -05'00'

.....

Med. MSc. PhD. Carlos Vinicio Chiluisa Guacho

C.I: 1500519085

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez Sede Tena por permitir formarme profesionalmente como también devengar hacia la sociedad la confianza colocada, sobre todo en los tiempos actuales que atravesamos.

A la Universidad Regional Amazónica Ikiam y cada uno de los profesionales de alta calidad que laboran allí, por fomentar el espíritu investigativo, así como también dar sus cátedra con vocación motivando al alumnado a buscar un cambio significativo en beneficio de la población.

Al MSc. Fabián Aguilar por la guía durante el proceso de elaboración de este proyecto, consejos y también, por el apoyo a pesar de las adversidades que surgieron.

Al PhD. Carlos Chiluisa-Guacho por la guía, comentarios, y sugerencias brindadas para el desarrollo del presente trabajo.

A la familia Sarango, que me dieron la oportunidad de poder ingresar a estudiar y darme ese aventón que necesitaba para alcanzar este logro.

A cada una de mis amistades, que de igual manera me han hecho mejor persona y han apoyado inclusive en tiempos de mala racha. Especialmente a Karla Olalla, que siempre tuve su apoyo incondicional y motivación para persistir.

A la Unidad de Integración Curricular por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de grado.

DEDICATORIA

A mi madre Cristina, mi padre Edison y mis hermanos Janiris, Alexander, Cristian y Marlon, que siempre estuvieron para brindarme una mano y motivarme a continuar. Por estar presentes en cada etapa de mi vida, y permitirme ser cada día mejor.

ÍNDICE GENERAL

Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.2 Métodos diagnósticos en el tiempo	3
1.1.3 Epidemiología y su importancia	3
1.1.4 Pandemia mundial por SARS-CoV-2	4
1.1.5 Genoma y estructura del SARS-CoV-2	4
1.1.6 Desarrollo de vacunas para SARS-CoV-2	5
1.1.7 Vigilancia genómica de variantes de SARS-CoV-2	9
1.1.8 Mutaciones significativas de SARS-Cov-2	11
1.2 Planteamiento del problema	11
1.3 Justificación de la investigación	12
1.4 Objetivos de la investigación.....	13
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	14
2.1 Modelo de estudio	14
2.2 Población y procedencia de muestras.....	14
2.3 Toma de muestra.....	15
2.4 Recepción de muestras y codificado.....	16
2.5 Procesamiento de la muestra.....	16
2.6 Protocolo de diagnóstico molecular para SARS-CoV-2.....	16
2.7 Base de datos COVID-19 INSPI TENA.....	18
2.8 Análisis de datos.....	18
2.9 Vigilancia genómica y envío de muestras.....	19
2.10 Secuenciamiento Illumina Mi seq.....	20
2.11 Adquisición de genomas en GISAID.....	21
2.12 Genotipificación en el tiempo.....	21
2.13 Construcción de árbol filogenético.....	21
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	22
3.1 Análisis de datos.....	22

3.2 Genotipificación en el tiempo.....	27
3.3 Sublinajes de variante Delta.....	29
3.4 Árbol filogenético.....	29
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Incidencia total.....	31
4.2 Incidencia por variables categóricas.....	32
4.3 Genotipificación en el tiempo y sublinajes de Delta.....	33
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mayores amenazas pandémicas que han afectado a la humanidad	1
Tabla 2. Enfermedades infecciones relevantes del siglo XXI	2
Tabla 3. Vacunas para SARS-CoV-2 en fase 4 de ensayos clínicos	8
Tabla 4. Variantes de SARS-CoV-2 y sus mutaciones en Spike	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y organización genómica de SARS-CoV- 2.....	6
Figura 2. Representación gráfica de la secuencia y proteína cristalizada Spike de SARS-CoV-2 con sus regiones S1 y S2	7
Figura 3. Red de centros de salud pertenecientes al Ministerio de Salud Pública en la región Amazónica que realizaron la colecta y emisión de muestras sospechosas de COVID-19 a INSPI-LIP Sede Tena.....	14
Figura 4. Incidencia global de casos positivos para la detección del virus SARS-CoV-2 por cada 100 000 personas por semana, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2 021.....	23
Figura 5. Incidencia desagregada por provincia de casos positivos para la detección del virus SARS-CoV-2 por cada 100 000 personas por semana, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2021.....	24
Figura 6. Distribución de casos positivos por semana para la detección del virus SARS-CoV-2 según los grupos etarios, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2021	25
Figura 7. Casos positivos por semana para la detección de SARS-CoV-2 acorde al género.....	25
Figura 8. Porcentaje de positividad para SARS-CoV-2 en diferentes tipos de muestras sospechosas para COVID-19 analizados por INSPI-LIP mediante RT-PCR	26
Figura 9. Porcentaje de positividad para SARS-CoV-2 basado en la sintomatología.....	26
Figura 10. Frecuencia relativa de variantes genéticas durante las semanas epidemiológicas 22 (junio) a 48 (Noviembre) del año 2021.....	28
Figura 11. Sublinajes detectados en las 35 muestras reportadas como Delta por secuenciación en la plataforma NGS Illumina Miseq™ y posterior comparativa con WIV04.....	29
Figura 12. Análisis filogenético por el método Bootstrap, UPGMA como método estadístico y máxima probabilidad compuesta de los 32 genomas completos del virus SARS-CoV-2 circulantes en la región Amazónica, subidas por el CRNI a GISAID obtenidas por secuenciación de nueva generación mediante la plataforma Illumina Miseq™ (Illumina Inc.)	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla detallada de los diferentes medios de transporte viral usado para la colecta de especímenes sospechosos de COVID-19	44
Anexo 2. Composición de master mix para llevar a cabo la amplificación de los genes E y GAPDH en la detección molecular de SARS-CoV-2	45
Anexo 3. Condiciones del termociclador para la corrida	46
Anexo 4. Diagnóstico molecular de un caso positivo para SARS-CoV-2 denotando la curva sigmoïdal y un Ct < 33	46

RESUMEN

La pandemia por el brote de SARS-CoV-2 en Wuhan - China en diciembre 2019 ha generado gran repercusión a nivel mundial, en donde la Amazonía ecuatoriana no ha sido la excepción. La alta tasa de transmisibilidad, así como también el apareamiento de variantes genéticas de interés clínico han comprometido el proceso de inmunización en nuestro país. INSPI-LIP Sede Tena diagnosticó a 5 602 pacientes durante Julio a Noviembre 2021, donde se pudo determinar que en Agosto y Septiembre la curva de contagios alcanzó su menor valor y a partir de allí ha existido un incremento considerable. Los grupos más susceptibles fueron la población activamente laboral y Napo fue la provincia con mayor incidencia, arrojado por test de Chi-cuadrado ($p\text{-value} > 0,05$). Se determinó el ingreso de la variante genética Delta (B.1.617.2) a la región Amazónica en la semana epidemiológica 36 y su predominio posterior para Noviembre del 2021, donde el 80% de las muestras correspondían a Delta. Es así que se atribuye el ingreso de Delta al incremento generado a partir de la semana epidemiológica 36. Puesto que posee mutaciones significativas como P681R y L452R que le confieren mayor transmisibilidad y evasión inmunitaria al virus. Por lo tanto, estos resultados brindan información actualizada sobre la pandemia en la región Amazónica y sirven como insumos para la toma de decisiones de vigilancia en salud pública.

Palabras clave: Amazonía ecuatoriana, incidencia SARS-CoV-2, COVID-19, variantes de interés, variantes de preocupación, epidemiología.

ABSTRACT

Pandemic due to SARS-CoV-2 outbreak in Wuhan - China in December 2019 has generated a great impact worldwide, where Ecuadorian Amazon has not been the exception. High rate of transmissibility, as well as the appearance of genetic variants of clinical interest have compromised the immunization process in our country. INSPI-LIP Tena diagnosed 5 602 patients during July to November 2021, where it was determined that in August and September the contagion curve reached its lowest value and from there has been a considerable increase. The age group with the greatest affection were active labor population and Napo presented the highest incidence, determined by Chi-square test (p -value $> 0,05$). The entry of the genetic variant Delta (B.1.617.2) into the Amazon region epidemiological week 36 and its subsequent predominance by November 2021 was determined, where 80% of the samples corresponded to Delta. Thus, increase generated as of epidemiological week 36 is attributed to the entry of Delta. Since it has significant identifiers such as P681R and L452R that transfer greater transmissibility and immune evasion to the virus. Therefore, these results provide updated information on the pandemic in the Amazon region and serve as a tool for making public health surveillance decisions.

Keywords: Ecuadorian Amazon, SARS-CoV-2 incidence, COVID-19, variants of interest, variants of concern, epidemiology.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Antecedentes

Diversas amenazas han surgido a lo largo de la historia de la humanidad, en el ámbito de la salud varias enfermedades infecciosas han significado un cambio importante en el estilo de vida de los afectados. El escaso o nulo conocimiento en el tema, así como factores socioambientales, sanitarios o políticos provocaron que los primeros brotes pandémicos tengan repercusión extinguiendo millones de vidas (Tabla 1) [1–3]. Tal es el caso de *Yersinia pestis* y el virus de la Influenza, quienes son los responsables por el mayor número de mortalidad con las enfermedades llamadas peste negra y gripe española, respectivamente [4]. Pero más importante aún, es que estos microorganismos aparecieron más de una vez en la historia y la mortalidad acumulada de todos sus brotes suman más de 300 millones de muertes.

Tabla 1. Mayores amenazas pandémicas que han afectado a la humanidad. Adaptado y traducido de [5].

Enfermedad	Responsable	Año	Decesos (personas)
Plaga de Galen	Variola virus	165	~ 5 millones
Plaga Bubónica	<i>Yersinia pestis</i>	540 – 542	~ 25 – 50 millones
Peste negra	<i>Yersinia pestis</i>	1346	~ 200 millones
Gran plaga de Marseille	<i>Yersinia pestis</i>	1720	~ 1 millón
Cholera	<i>Vibrio cholerae</i>	1817 – 1824	< 1 millón
Gripe rusa	Influenza A/H2N2/H3N8	1889	< 1 millón
Gripe española	Influenza A/H1N1	1918	20 – 50 millones
Gripe asiática	Influenza A/H3N2	1958	< 2 millones
Gripe de Hong Kong	Influenza A/H3N2	1968	< 1 millones
SIDA	HIV	1976	~ 36 millones

Desde inicios del siglo XXI han surgido epidemias alrededor del mundo con un menor impacto en comparación con las reportadas previamente (Tabla 2). Esto puede ser atribuido a características innatas del microorganismo, o también a un diagnóstico e identificación oportuno del patógeno [6–9]. Se debe destacar la diversidad microbiana latente en los últimos 20 años, lo cual es indicativo de implementar métodos diagnósticos cada vez más precisos para cada patógeno [10]. Como resultado se tiene insumos para la toma de decisiones en salud pública a fin de monitorear los contagios y su evolución.

Tabla 2. Enfermedades infecciosas relevantes en el siglo XXI. Adaptado y traducido de [5].

Enfermedad	Responsable	Año	Afectados*	Decesos* (personas)
SARS-CoV	SARS-CoV	2002 - 2003	8 098	778
Cólera de Zimbabwe	<i>Vibrio cholerae</i>	2008	8 500	4 369
Influenza	H1N1 Influenza A	2009	Desconocido	18 000
Meningitis oeste africana	<i>Neisseria meningitidis</i>	2009	13 516	931
Cólera haitiano	<i>Vibrio cholerae</i>	2010	80 000	9 985
Fiebre de dengue	Virus de Dengue	2011	21 204	< 300
MERS	MERS-CoV	2012	2 494	858
Ébola	Ébola virus	2013	28 600	11 325
Zika	Zika virus	2013 - 2014	Aprox. 2 400	29
Cólera de Yemen	<i>Vibrio cholerae</i>	2016	269 608	1 614
Nipah	Nipah virus	2018	19	17
COVID – 19	SARS-CoV-2	2019	422 mill.**	5,8 mill.**

* Datos globales generados en el periodo que surgió el patógeno.

** Datos globales obtenidos del boletín epidemiológico de www.who.int a la fecha 22 de febrero del 2022.

1.1.2 Métodos diagnósticos en el tiempo

Antes del XVII, se brindaba diagnóstico basado en los síntomas (tacto, respiración, pulso, temperatura) que experimentaban los afectados. También se indagaba macroscópicamente los fluidos corporales tales como orina, sangre o saliva por métodos físicos (color, aroma, sabor, densidad). La invención del microscopio en el siglo XVII abrió nuevas posibilidades para la investigación médica. Pudiendo desarrollarse técnicas más específicas basadas en la morfología del patógeno o su patología tales como la bacteriología, uroscopia, histología, hematología, entre otras. En el siglo XX, se implementaron métodos químicos y enzimáticos (aglutinación, colorimetría, ELISA) para componentes en muestras humanas. Cada vez los métodos diagnósticos fueron más específicos para patógenos acorde a la enfermedad que desarrollaban, por ejemplo, el método Ogawa Kudoh para cultivo de *Micobacterium spp.* causante de la tuberculosis [11–13]. Dando así el diagnóstico molecular que se maneja ampliamente en la actualidad, el mismo que se basa en el aislamiento e identificación del material genómico del patógeno por regiones específicas que discriminan a un microorganismo del resto [14]. La importancia del diagnóstico oportuno y confiable radica en brindar un tratamiento apropiado al paciente a fin de incrementar sus posibilidades de sobrellevar la enfermedad.

1.1.3 Epidemiología y su importancia

A la par del diagnóstico de enfermedades es necesario el levantamiento de información respecto a los síntomas, mortalidad, transmisión, población susceptible (edad, sexo o comorbilidades), tratamiento, secuelas e incidencia para establecer directrices sobre el manejo ante otro brote inminente. La incidencia permite conocer la evolución de los contagios en un periodo determinado, lo cual sirve como herramienta para implementar estrategias que contengan al patógeno a fin de evitar un colapso en los sistemas de salud. Adicionalmente un incremento considerable de contagios respecto a periodos previos, es sinónimo de evolución en el patógeno. Motivo por el cual, es necesario emplear métodos adicionales al diagnóstico como el secuenciamiento a fin de esclarecer la causa genética de la elevada propagación [15,16]

1.1.4 Pandemia mundial por SARS-CoV-2

A finales del año 2019, en Wuhan – China, se reportaron casos de una neumonía particular de etiología desconocida. Las secuencias obtenidas revelaron un 79,6% de convergencia con el coronavirus relacionado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) [17,18]. En este sentido, se identificó al agente causal como coronavirus relacionado al síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-COV-2) y la enfermedad que desarrolla fue denominada COVID-19 (enfermedad del coronavirus 2019). Existe evidencia que apunta a un origen zoonótico de este nuevo virus. Puesto que, análisis filogenéticos describen una similitud a nivel de genoma con coronavirus de pangolines y murciélagos. Sin embargo, el origen del virus no ha sido establecido con certeza a la fecha 25 de febrero del 2022 [19,20].

La alta transmisibilidad del SARS-CoV-2 a escala global ocasionó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declare el 11 de marzo del 2020 como pandemia a la enfermedad COVID-19 [21–23]. En respuesta a la declaratoria de la OMS, los gobiernos europeos tomaron una serie de medidas como: controlar la movilidad humana (cuarentena), cierra de fronteras y socializar medidas de higiene y bioseguridad que fueron seguidos por el resto del mundo [24].

1.1.5 Genoma y estructura del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus* y especie *SARS*. Dentro de la misma familia se encuentra el coronavirus relacionado al síndrome respiratorio agudo severo de Medio Oriente (MERS-CoV) y SARS-CoV que de igual manera han tenido su importancia clínica en las últimas décadas [9]. El tamaño de los viriones de SARS-CoV-2 es de aproximadamente 200 nm de diámetro, se encuentran envueltos y su genoma es de ARN monocatenario de sentido positivo.

Su genoma completo fue obtenido por el Instituto de Virología de Wuhan el 29 de enero del 2020. Se obtuvo de una muestra de lavado branqueoalveolar (BAL) mediante extracción de ARN viral usando el kit *High Pure Viral RNA* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, #11858882001), secuenciado por la plataforma Illumina Miseq™ (Illumina Inc., San Diego, USA) y posterior análisis metagenómicos en la plataforma MGmapper (PE_2.24 & SE_2.24) con secuencias de otros

coronavirus [18]. Esta secuencia es usada como referencia en Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) y se encuentra identificada como WIV04.

La secuencia de WIV04 tiene 29 891 nucleótidos. Consta de cuatro genes para la síntesis de proteínas estructurales: Spike, envoltura, membrana y nucleocápside. La proteína Spike (S) es una glicoproteína de 1 273 residuos de longitud y contiene 2 regiones conocidas como S1 y S2. La región S1 interactúa con los receptores enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Mismos que se encuentran en el endotelio de venas, arterias, riñones, corazón, pulmones y células musculares. Lo que determina una infección viral generalizada. Por otro lado, S2 es responsable de la fusión entre el virión y la célula huésped [25]. La proteína de envoltura (E) es una pequeña proteína de 75 residuos que en conjunto con la proteína de membrana (M) de 222 residuos de longitud se encargan de mantener la forma del virión y envolver al ARN en el núcleo. La proteína de nucleocápside (N) es una fosfoproteína que empaqueta el ARN viral de forma helicoidal protegida por derivados lipídicos. Adicionalmente, se tiene marcos de lectura abierto (ORFs) que codifican proteínas no estructurales incluyendo las enzimas que aparecen durante su ciclo reproductivo como la enzima RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN) encargada de replicar el material genómico (Figura 1) [26,27].

1.1.6 Desarrollo de vacunas para SARS-CoV-2

La determinación de la estructura y genoma del SARS-CoV-2 marcó un precedente en las farmacéuticas y academia para el desarrollo de tratamientos y vacunas en tiempo récord. Según la OMS, hasta el 25 de febrero del 2022 existen 146 vacunas en fase clínica y 195 en fase preclínica [28]. Del total, BNT16b2 – Pfizer/BioNTech es la primera vacuna aprobada totalmente y 8 vacunas se encuentran en fase 4 con autorización para su uso por emergencia (EUA) (Tabla 3). Las plataformas para el desarrollo de vacunas son diversas y abarcan maneras variadas para generar la respuesta inmunogénica por inoculación.

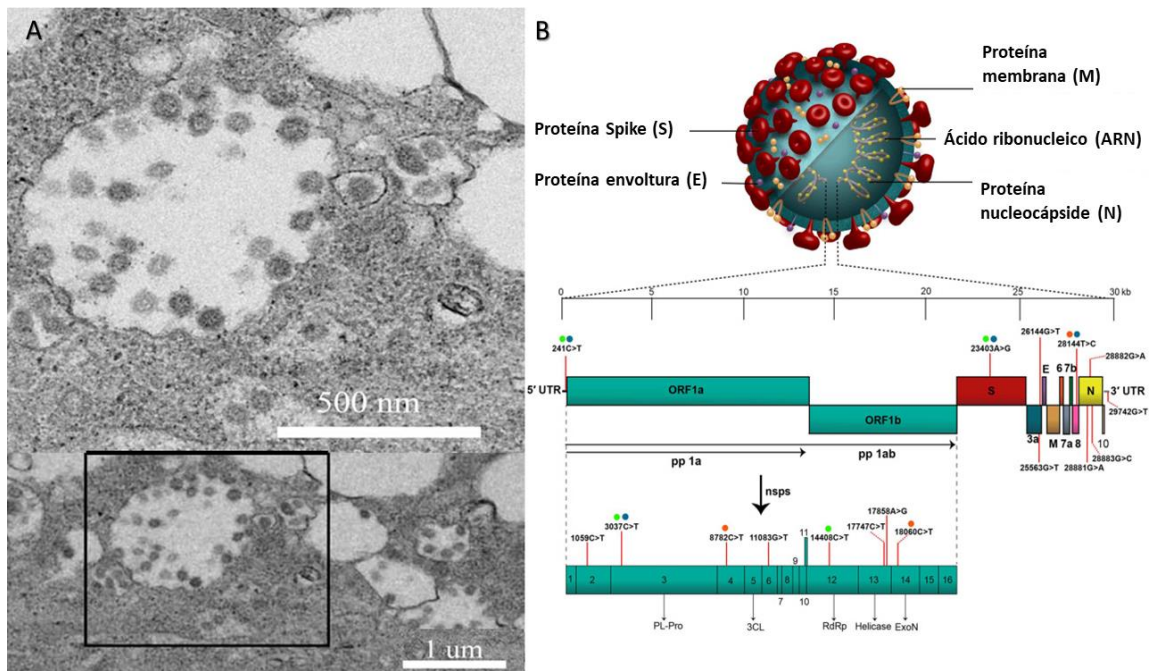


Figura 1. A. Viriones de SARS-CoV-2 infectando a células Vero E6, imagen obtenida por microscopía electrónica. **B.** Ilustración de SARS-CoV-2 con sus proteínas estructurales y genes. Adaptado y traducido de [18,29].

Las formas “tradicionales” incluyen el cultivo e **inactivación (IV)** de viriones por mecanismos químicos. También se tiene la **atenuación (AV)** por modificaciones genéticas que generan SARS-CoV-2 con virulencia reducida, pero con inmunogenicidad similar a la obtenida por la infección natural. La vacuna puede estar acompañada de adyuvantes como hidróxido de aluminio para obtener un mayor reclutamiento inmunitario. Ambas plataformas presentan al virus completo y, por ende, se tiene una respuesta inmune tanto para las proteínas virales estructurales como las no estructurales [30,31]. Sin embargo, los anticuerpos que se enlazan a la proteína Spike, especialmente a su dominio de enlazamiento-receptor (RBD) previenen el acople a las células hospederas y neutralizan al virus [32]. En base a esto, la proteína Spike fue identificada como el objetivo antigénico para el desarrollo de vacunas modernas (Figura 2).

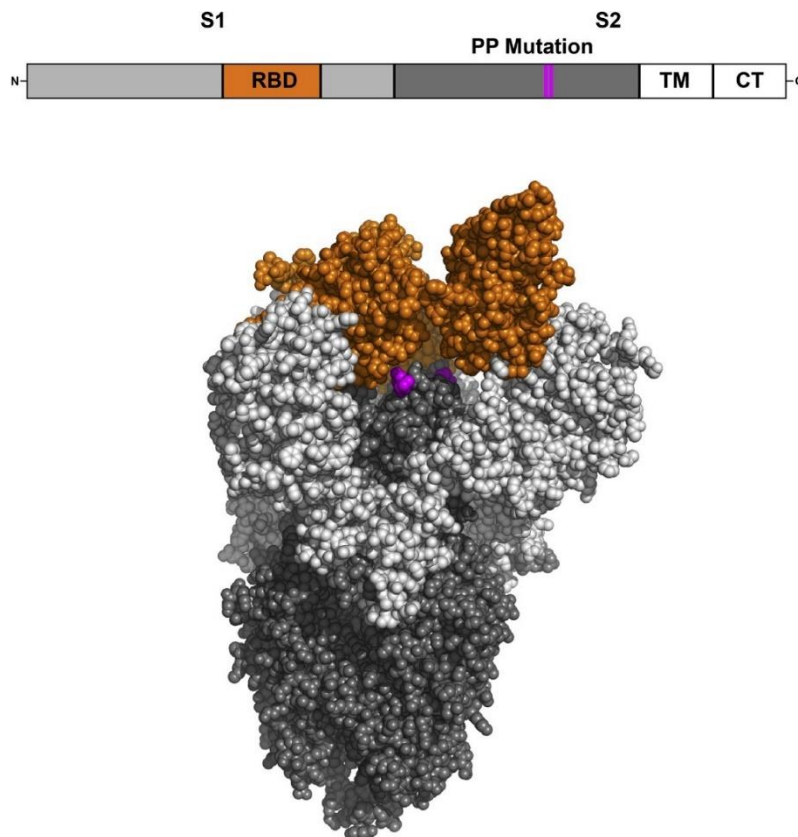


Figura 2. Representación gráfica de la secuencia y proteína cristalizada Spike de SARS-CoV-2 con sus regiones S1 y S2. TM: dominio transmembrana; CT: cola citoplasmática. RBD: Dominio de enlazamiento – receptor. Obtenido [33].

Las vacunas de **proteínas recombinantes (PR)** son expresadas en diferentes sistemas como células de insectos, mamíferos, levaduras y plantas [34]. Se dividen en vacunas basadas en la proteína Spike que incluye toda la secuencia aminoacídica, basadas en RBD que contiene la región de reconocimiento S1-ACE2, y virus como partículas que son viriones carentes de genoma [35,36]. Las vacunas por **vectores de replicación incompetentes (VRI)** están basados en otros virus que han sido diseñados para expresar la proteína S y están deshabilitados para replicarse *in vivo*. La mayoría de estos tienen de base a vectores de Adenovirus (AdV), aunque vectores de parainfluenza humana, virus de influenza y Sendai virus también pueden ser usados [37]. Las vacunas por **vectores de replicación competentes (VRC)** derivan de otros virus atenuados que fueron diseñados para expresar la proteína S y se replican una vez inoculados, generando una

respuesta inmunitaria elevada. Los vectores incluyen a virus de sarampión, influenza, estomatitis vesicular, viruela y enfermedad de Newcastle [38,39]. Las vacunas de **ADN** se basan en un plásmido que contiene el gen codificante de la proteína S, el cual se expresa posterior a la inoculación. Puede ser generado a gran escala en bacterias y el plásmido es altamente estable [40]. Las vacunas de **ARN** son relativamente nuevas, similar a las vacunas de ADN, conllevan la información genética para la síntesis del antígeno dentro del individuo vacunado. Puede usarse también mRNA, y usualmente son entregados por nanopartículas lipídicas (LNPs) [41,42]. Los resultados satisfactorios en el desarrollo de vacunas para mitigar los efectos de la COVID-19 y el proceso de inmunización con 10,5 billones de dosis administradas a la fecha 27 de febrero del 2022, han permitido el levantamiento de medidas restrictivas de manera progresiva [43,44].

Tabla 3. Vacunas para SARS-CoV-2 en fase 4 de ensayos clínicos. Adaptado y traducido de [28].

Nombre	Plataforma	Desarrollador
Coronavac	IV	Sinovac Research and Development
BBIBP-CorV	IV	Sinopharm
ChAdOx1-S	VRI	Astrazeneca + Universidad Oxford
CanSino	VRI	CanSino Biological Inc.
J&J	VRI	Janssen Pharmaceutical
mRNA-1273	ARN	Moderna
BNT16b2	ARN	Pfizer/BioNTech
MVC-COV1901	PR	Medigen Vaccine Biologist
mRNA-1273.351.	ARN	Moderna
S/N	IV	Sinopharm

IV: Virus inactivado, VRI: Vectores de replicación incompetente, ARN: Ácido Ribonucleico, PR: Proteína recombinante.

1.1.7 Vigilancia genómica de variantes de SARS-CoV-2

Los virus, a nivel evolutivo, cambian y mutan en su genoma a medida que se transmiten entre las personas a lo largo del tiempo. Cuando estos cambios se vuelven significativamente diferentes al virus original (WIV04), se les denomina “variantes”. Las variantes surgen ante la carencia de un sistema de corrección en el proceso de replicación del ARN viral [45]. La mayoría de los cambios tienen poco o ningún impacto en las propiedades del virus. Sin embargo, algunos pueden conllevar grandes consecuencias en lo clínico y epidemiológico. Se debe plantear un monitoreo constante de los polimorfismos que se generan en las secuencias genéticas del SARS-CoV-2 a fin de elucidar sustituciones significativas. Esto con el propósito de evaluar el riesgo que representan para la salud pública y optar por medidas de prevención, contención y control de la variante [46]. El 3 de marzo del 2020, análisis filogenéticos de 103 genomas de SARS-CoV-2 revelaron que existían 2 linajes principales en este grupo viral. Fueron denominados como linaje L (leucina) y S (serina), por los cambios aminoacídicos presentados en el codón de la posición 28 144. Adicionalmente, se describió una dominancia del linaje L sobre S con el 70% y 30 % de frecuencia, respectivamente. Este es el primer reporte de variantes genéticas que han surgido en el SARS-CoV-2. A partir de allí, se obtuvieron nuevas clasificaciones como V y G, y más tarde, de G en GH y GR [47]. Actualmente se maneja la clasificación de la OMS basada en asignar una letra griega a las variantes (Tabla 4). La variante de Reino Unido (B.1.1.7) fue la primera del sistema, y se denominó Alpha. Se tiene 3 agrupaciones acorde a su importancia y son las variantes bajo monitoreo, variantes de interés y variantes de preocupación. Se denomina variante de interés (VOI) a aquella que presenta mutaciones significativas y acorde a evidencia científica, se puede inferir su prevalencia en la sociedad. Por lo que, requiere su monitoreo continuo para poder constatar su evolución[48]. Variantes de preocupación (VOC) son aquellas que previamente fueron asignadas como VOI, y se ha demostrado un aumento de virulencia, alta transmisibilidad comunitaria a largo plazo o reducción en la eficacia diagnóstica y terapias disponibles, incluyendo vacunas [49].

Tabla 4. Variantes de SARS-CoV-2 y sus mutaciones en Spike. Adaptado y traducido de [50].

Etiqueta	Linaje PANGO	Mutaciones en Spike (RBD: 319-541)	Primer reporte	Designación
Variantes de interés* (VOI)				
Lambda λ	C.37	G75V, T76I, Δ246–252, L452Q, F490S , D614G, T859N	Perú, diciembre 2020	14 junio 2020
Mu μ	B.1.621	T95I, Y144S, Y145N, R346K, E484K, N501Y , D614G, P681H, D950N	Colombia, enero 2021	30 agosto 2020
Épsilon ε	B.1.427	S13I, W152C, L452R	EEUU, julio 2020	noviembre 2020
Eta η	B.1.525	Q52R, A67V, Δ69-70, Δ144, E484K , D614G, D677H, F888L	Nigeria, 2021	14 enero 2021
Iota ζ	B.1.526	L5F, T95I, D253G, E484K , D614G, A701V	EEUU, 2020	noviembre 2020
Kappa κ	B.1.617.1	E154K, L452K, E484Q , D614G, P681R, Q1071H	India, diciembre 2020	abril 2021
Theta θ	P.3	Δ141-143, E484K, N501Y , D614G, P681H	Filipinas, marzo 2021	abril 2021
Variantes de preocupación* (VOC)				
Alfa α	B.1.1.7	Δ69-70, ΔY144, N501Y , A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H:484K, S:452R	UK, septiembre 2020	18 diciembre 2020
Beta β	B.1.351	L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y , D614G, A701V	Sudáfrica, mayo 2020	18 diciembre 2020
Gamma γ	P.1	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y , H655Y, T1027I	Brasil, noviembre 2020	11 enero 2020
Delta δ	B.1.617.2	T19R, G142D, ΔE156, ΔF157, R158G, L452R, T478K , D614G, P681R, D950N	India, octubre 2020	VOI: 11 abril 2020 VOC: 11 mayo 2020
Omicron ο	B.1.1.529	A67V, Δ69-70, T95I, Δ142-144, T145D, Δ211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H , T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	Sudáfrica, noviembre 2020	VOI: 24 noviembre 2021 VOC: 26 noviembre 2021

*Las variantes descritas corresponden a la fecha 10 de diciembre del año 2021, y pueden estar sujetos a cambios conforme transcurre el tiempo.

1.1.8 Mutaciones significativas

En algunas de estas variantes las características biológicas y clínicas aún se desconocen o no están claras. Sin embargo, se debe destacar que han aumentado gradualmente su potencial infeccioso y escape inmunológico, aunque no se describe un incremento de patogenicidad [51]. La cantidad de mutaciones en la proteína Spike y en su RBD varía ampliamente entre linajes. Mutaciones como H655Y, Q677 y N679K han descrito una elevada transmisibilidad al promover una replicación más acelerada durante el ingreso celular [52]. Otras más como K417N, Δ246-253, G446S, F490S se caracterizan por reducir la neutralización generada por las vacunas [53]. Mutaciones significativas en la región RBD son las más estudiadas, es así que, N501Y, E484K y L452R han sido ligadas tanto al incremento de transmisibilidad como la reducción de neutralización inducida por las vacunas [54]. Ciertas cepas muestran solo 3 mutaciones en la proteínas Spike como Zeta, y otras, como Omicron recalcan hasta 37 mutaciones [55]. Motivo por el cual, es preocupante el apareamiento de variantes y la sinergia que conllevan sus diferentes mutaciones. Recalcando que, existe un sesgo de información en cuanto a los efectos generados por mutaciones en el resto de proteínas estructurales y no estructurales. Tal es el ejemplo de una mutación en el gen ORF10 y sus posibles efectos en pacientes COVID-19 [56]. O también, la evasión en el diagnóstico para el gen N de kits comerciales dado por Omicron [57].

1.2 Planteamiento del problema

El brote de SARS-CoV-2 en Ecuador mantuvo colapsados los centros de atención hospitalaria, especialmente, las unidades de cuidados intensivos (UIC) entre marzo a diciembre del 2020 [58]. La capacidad diagnóstica molecular para SARS-CoV-2 estaba centralizada en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – Dr. Leopoldo Izquieta Perez (INSPI-LIP) Sedes de Quito, Guayaquil y Cuenca, y ciertas universidades [59]. El tiempo de respuesta para la emisión de resultados de provincias amazónicas era de 3 a 5 días. Y en varios casos se rechazaban muestras de lugares lejanos y poco accesibles por no cumplir los criterios de aceptación, entre ellos, la recepción posterior a las 72 horas de tomada la muestra. Por lo cual, los datos epidemiológicos durante este periodo de tiempo reflejan parcialmente la realidad de la región Amazónica.

A medida que el virus se propagó a escala mundial, han surgido nuevas variantes con mutaciones significativas que las hacen dominar por sobre el resto. Entre las características más destacadas están el aumento de transmisibilidad y la reducción en la neutralización inducida por las vacunas [60]. Esto ha generado preocupación y ha comprometido el proceso de inmunización llevado a cabo globalmente. Adicionalmente, el secuenciamiento de SARS-CoV-2 a la fecha 2 de julio del 2021 describe únicamente 9 secuencias reportadas en la región Amazónica [61]. Con lo cual, no es posible afirmar que se ha realizado un monitoreo genómico para constatar la evolución en el tiempo del SARS-CoV-2, en la Amazonía ecuatoriana.

1.3 Justificación de la investigación

El diagnóstico oportuno de SARS-CoV-2 brinda herramientas a tiempo real del avance de la enfermedad COVID-19. Abarcando tanto a pacientes con pronóstico reservado como asintomáticos. Es así que, la incidencia como dato epidemiológico permite conocer en un periodo de tiempo la transmisibilidad a la que está sujeta el virus. La elevación de positividad como incidencia, está ligado netamente a la variante genética que circula en la población. Por lo cual, es necesario conocer a escala genética el responsable etiológico de la estadística. El secuenciamiento de SARS-CoV-2 permite elucidar mutaciones significativas en la proteína Spike y más específicamente la región RBD [7]. Estas mutaciones han sido descritas como los responsables de la transmisibilidad. Por ende, el ingreso de variantes con mutaciones como N501Y, E484K y L452R deben ser monitoreadas y reportadas en un tiempo oportuno [53]. O a su vez, reportar en caso de ser posible, la propagación de una variante endémica de la región Amazónica y conocer sus mutaciones. Con lo cual, los Comités de Operaciones de Emergencia (COEs) provinciales pueden plantear estrategias de contención en los contagios basados en los insumos generados durante el presente estudio.

1.4 Objetivo de la investigación

Objetivo general

- Determinar la incidencia y positividad del virus SARS-CoV-2 en la región Amazónica entre julio a noviembre del 2021 y su relación con las variantes genéticas circulantes.

Objetivos específicos

- Identificar el virus SARS-CoV-2 en muestras de pacientes sospechosos de COVID-19 mediante RT-PCR.
- Determinar la incidencia y positividad de SARS-CoV-2 desde julio a noviembre del 2021 en la Amazonía ecuatoriana.
- Identificar las variantes genéticas de importancia clínica circulantes en la población amazónica durante el periodo de estudio.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Modelo de estudio

Estudio prospectivo, transversal, observacional de incidencia.

2.2 Población y procedencia de muestras

El presente estudio incluyó 5 602 muestras de pacientes sospechosos de COVID-19 para la detección molecular del virus SARS-CoV-2 por la técnica RT-PCR. El sitio de muestreo englobó a las provincias de Napo, Pastaza, Orellana y parcialmente Morona Santiago y Sucumbíos. Se abarcaron localidades tanto urbanas como rurales mediante la recepción de muestras en Centros de Salud pertenecientes a la red del Ministerio de Salud Pública de Primer y Segundo nivel de atención (Figura 3). Para el estudio se incluyeron las muestras receptadas desde la semana epidemiológica 26 hasta la 48 del año 2021.

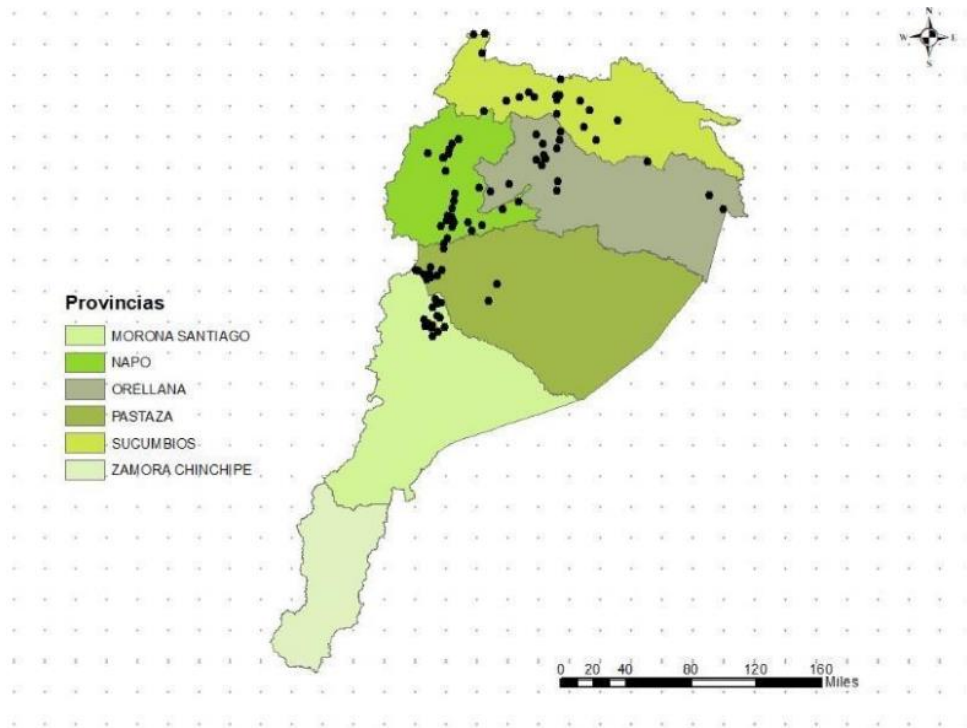


Figura 3. Red de centros de salud pertenecientes al Ministerio de Salud Pública en la región Amazónica que realizaron la colecta y emisión de muestras sospechosas de COVID-19 a INSPI-LIP Sede Tena.

2.3 Toma de muestra

2.3.1 Ficha EPI-1 y digitalización

Previo a la toma de la muestra, el paciente proporcionó información para la creación de la EPI-1. La ficha EPI-1 conlleva datos del centro de salud, médico encargado del caso, epidemiología y sintomatología del paciente, fecha de toma y tipo de muestra. Cada centro de salud creó el caso clínico del paciente en cuestión en la plataforma “COVID-19 PCR Ambiente de producción” (www.epi.msp.gob.ec) usando la EPI-1.

2.3.2 Tipo de muestra

La toma de muestras se realizó por laboratoristas y médicos capacitados de cada centro de salud siguiendo los lineamientos de la OMS. INSPI-LIP receptó para el análisis molecular de SARS-CoV-2 muestras del tipo hisopados nasofaríngeos (HN) e hisopados orofaríngeos (HO) en la mayoría de casos. Los hisopados se suspendieron en 3 mL de medios de transporte viral (VTM) (Anexo 1) y fueron etiquetados acorde a la EPI-1 del paciente. Dependiendo del paciente y la evolución del cuadro clínico también se recibieron muestras del tipo esputo (ES), saliva (SA) y aspirados traqueales (AT), con la condición de realizar una re-suspensión en 5 mL de medio Medio Ealge modificado de Dubelcco (DMEM) una vez ingresados al laboratorio previo a la extracción de ARN.

2.3.3 Transporte de la muestra

Las muestras se recubrieron con papel Parafilm al borde de la tapa y se colocaron dentro de una bolsa de riesgo biológico con cierre. Se transportaron dentro de un aislante térmico conjuntamente con geles refrigerantes para mantener una temperatura interna de 4 °C. Una copia del EPI-1 de cada paciente fue enviado en un sobre manila a la par de una matriz consolidada con la información de todas las muestras. Se selló el recipiente con el sobre manila en la parte superior con cinta de embalaje y se colocó dentro de una bolsa de riesgo biológico para el arribo al laboratorio hasta 72 horas posteriores a la toma de la muestra.

2.4 Criterio de aceptación/rechazo de muestras y codificado

Se procedió a verificar que las muestras estén a una temperatura de 4 °C, la fecha de toma de muestra esté dentro de las 72 horas reglamentarias, no exista daño o alteraciones en los recipientes de VTM, el etiquetado del tubo sea legible y corresponda al EPI-1 del paciente. Posterior a ello, se asignó a cada muestra un código de laboratorio según el orden de llegada escrito con marcador permanente en la parte superior del EPI-1 y al costado de la muestra.

2.5 Procesamiento de la muestra

Primero se realizó una agitación a las muestras en el equipo Vortexer (Heathrow Scientific, Illinois, USA) y se alicuotaron 300 µL en un microtubo de 1,5 mL etiquetado acorde al código de la muestra. Adicionalmente, se conservó 1,5 mL en otro microtubo rotulado a -20 °C.

2.6 Protocolo de diagnóstico molecular de SARS-CoV-2

2.6.1 Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral se realizó empleando el kit *COVID19/Viral RNA extraction from respiratory specimens* (Biomiga Inc, San Diego, USA, #: VR6568-02), basado en un sistema de columnas. Primero se lisó la muestra agregando 322 µL de Buffer LYE, luego se homogenizó por vórtex e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Posterior a ello, se añadieron 600 µL de isopropanol y se homogenizó. Lo siguiente fue transferir 600 µL del sobrenadante a la columna proporcionada por el kit y se centrifugó en el equipo HERMLE Z326K (Labortechnik GmbH, Berlín, Alemania) a 10 000 rpm por 30 segundos y se descartó el filtrado. Este paso se repitió por duplicado. Luego se lavó la columna con 500 µL de Buffer RB y se centrifugó bajo las mismas condiciones y descartó el filtrado. Se añadieron 500 µL de Wash Buffer y se repitió el proceso de centrifugación y descarte del filtrado. Se centrifugó la columna a 12 000 rpm durante 2 minutos a fin de retirar el residuo de etanol en la columna. Finalmente, se transfirió la parte superior de la columna a un microtubo codificado de 1,5 mL y se agregó 45 µL de agua tratada con DEPC para la elución a 10 000 rpm por 30 segundos. La columna fue descartada y el ARN viral aislado en el

microtubo se almacenó a -20 °C. Por cada 40 muestras, hubo un control negativo de extracción con 300 µL de agua DEPC en lugar de muestra.

2.6.2 Amplificación del gen *E* y gen *GAPDH*

Para este procedimiento el Centro de Referencia Nacional de Influenza y otros virus respiratorios (CRNI) (INSPI-LIP, Guayaquil, Ecuador) implementó un método in-house. Para la amplificación del gen específico viral *E* y gen transcripto humano Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como control interno, se utilizó el kit *LightCycler® Multiplex RNA Virus Master* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, #: 07083173001). El kit contiene las enzimas, sales, trifosfatos de desoxinucleótidos, tampón y agua de grado PCR necesarios para el proceso. Sin embargo, carece de los oligonucleótidos y sonda imprescindible para la lectura fluorométrica.

Los oligonucleótidos para amplificar el gen *E* son: Forward *E_Sarbeco_F* 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3', Reverse *E_Sarbeco_R* 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' y la sonda *E_Sarbeco_P1* FAM- AACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ. Los oligonucleótidos para amplificar el gen *GAPDH* son: Forward *GAPDH_F* 5'-GTGAGGTCGGAGTCAACGG-3', Reverse *GAPDH_R* 5'-TCAATGAAGGGGTCATTGATG-3' y la sonda *GAPDH_P* ROX-CGCCTGGTCAACAGGGTCGC-BBQ. Los cebadores fueron sintetizados a una concentración de 400 µM y las sondas a 200 µM por la casa comercial Tib-Molbiol (Berlín, Alemania) [62,63].

Los reactivos descritos en el Anexo 2 fueron cargados en una microplaca de 96 pocillos de 200 µL (Axygen, Ciudad de México, México) a un volumen de 15 µL. Se colocaron 5 µL de ARN aislado en 92 pocillos, los 4 restantes fueron usados para los 2 controles negativos de extracción, control positivo (ARN viral de muestras reportadas como positivas) y control negativo (Agua DEPC). La microplaca sellada ingresó al termociclador CFX-96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Las curvas para *E* fueron evaluadas en el canal verde (470 nm excitación, 510 nm detección, sonda FAM). Mientras que, las curvas para el gen *GAPDH* fueron evaluadas en el canal naranja (585 nm excitación, 610 nm detección, sonda ROX).

La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa de temperaturas: retrotranscripción a 55 °C por 5 minutos, luego con una pre-desnaturalización a 95 ° C por 5 minutos, posterior la

desnaturalización a 95 °C por 5 segundos, el alineamiento a 60 °C por 15 segundos y la extensión a 72 °C durante 15 segundos. Se programó 45 ciclos con la fase de alineamiento como el punto de lectura fluorométrica de las sondas. Finalmente, el enfriamiento a 4 °C por 30 segundos previo a dar por finalizada la amplificación (Anexo 3).

2.6.3 Interpretación y reporte de resultados

La corrida de RT-PCR se consideró validada cuando el Ct del control positivo fue similar a la reportada inicialmente, y nula amplificación para los controles de extracción y negativo. Adicionalmente, las muestras con curvas sigmoidales y valores de Ct < 33 y 28 para el canal verde y naranja, respectivamente, fueron reportadas positivas para la detección de SARS-CoV-2 (Anexo 4). Una vez validado los criterios para cada muestra, se procedió a subir el resultado en la plataforma “COVID-19 PCR Ambiente de producción”.

2.7 Base de datos COVID-19 INSPI TENA

La EPI-1 de cada paciente fue tabulada en el programa Microsoft Excel (V.2201) en el siguiente orden: semana epidemiológica, código de laboratorio, nombre completo, cédula, edad, género, provincia (paciente), ciudad, parroquia, provincia de procedencia (muestra), centro de salud, tipo de muestra, fecha de inicio de síntomas, fecha de recepción, fecha de resultado, resultado y Ct, una vez realizada la detección molecular de SARS-CoV-2.

2.8 Análisis de datos

2.8.1 Cálculo de incidencia

La incidencia se calculó por cada 100 000 personas y semanalmente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia semanal} = \frac{\text{Casos positivos semanales}}{\text{Población susceptible}} * 100\ 000$$

El número inicial de personas susceptibles (n=626 829) fue obtenido por la resta entre la población total (n=648 438) de las provincias de Napo (n=103 697), Orellana (n=136 396), Pastaza (n=83 933), Sucumbíos (n=176 472) y Morona Santiago (n=147 940)

(www.ecuadorencifras.gob.ec) y el número de casos positivos confirmados por RT-PCR en las mismas provincias (n=21 609) reportados en el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud Pública (www.salud.gob.ec) de fecha 28 de junio 2021. Posterior a ello, la población susceptible se actualizó acorde se reportaban casos positivos en el transcurso de las semanas epidemiológicas. La incidencia se calculó de manera global para las 5 provincias, y desagregada para cada una de ellas.

2.8.2 Test de Chi – Cuadrado

El test de Chi-cuadrado bilateral fue realizado en el programa RStudio (2021.09.2) con un nivel de significancia de 0,05. El estadístico fue usado para comparar las proporciones de pruebas positivas por edad, género y provincia en el transcurso del estudio, y determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa para relacionar la positividad con la variable categórica. Para edad se dividió en 5 grupos etarios: 0 a 15 años, 16 a 30 años, 31 a 45 años, 46 a 65 años y 65 años en adelante. Las 5 provincias fueron analizadas por separado. Mientras que, para género se distribuyó en masculino y femenino.

2.8.3 Porcentaje de positividad

El porcentaje de positividad se obtuvo filtrando la información en la base de datos acorde a la agrupación de la variables categóricas tipo de muestra y síntomas. Para el tipo de muestra se tuvo: hisopado nasofaríngeo, orofaríngeo o ambos, esputo, saliva y aspirados traqueales. Y para síntomas se dividió en sintomático y asintomático. El porcentaje de positividad se calculó mediante:

$$\text{Porcentaje de positividad} = \frac{\text{Casos positivos}}{\text{Muestras totales}} * 100$$

2.9 Vigilancia genómica y envío de muestras

Se seleccionaron 80 muestras positivas con Ct < 25 para secuenciamiento durante todo el periodo de estudio. Se realizaron 3 envíos en las siguientes fechas 10 de julio (15 muestras), 05 de octubre (35 muestras) y 22 de noviembre (40 muestras) hacia el CRNI para su respectiva

secuenciación usando la plataforma NGS Illumina Miseq™ (Illumina Inc., San Diego, USA). En este sentido, las muestras madres obtenidas durante el procesamiento con su respectiva EPI-1 y una matriz consolidada de las muestras fueron enviadas en un aislante térmico con geles refrigerantes.

2.10 Secuenciamiento NGS Illumina Miseq

Descrito brevemente, se realizó la extracción de ARN viral en las 80 muestras seleccionadas empleando el kit *COVID19/Viral RNA extraction from respiratory specimens* (Biomiga Inc) eluidas en 45 µL de agua DEPC. 15 µL de ARN viral aislado fueron pre-tratados con DNasa mediante el kit *ezDNase™ Enzyme* (Life Technologies, Carlsbad, USA). Esto con el fin de incrementar la sensibilidad en la detección de RNA viral (concentración de 2 a 50 ng/µL) y descartar la contaminación humana. Se realizó la amplificación aleatoriamente de ácidos nucleicos usando el kit *Complete Whole Transcriptome Amplification 2 (WTA2)* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y las bibliotecas por tagmentación fueron realizadas con el kit *Illumina Nextera XT* (Illumina Inc., San Diego, USA). La biblioteca fue secuenciada en Illumina Miseq (Illumina) con una configuración máxima de lectura de 2x150 pb.

Luego del proceso de secuenciación, se verificó a través del sistema operativo Linux la calidad de las secuencias producidas mediante el software FASTQ estableciendo una calidad mínima $Q \geq 30$. Posteriormente, se eliminó los adaptadores y primers con el programa Trimmomatic v.0.38. Se filtraron y eliminaron secuencias humanas usando la referencia WIV04 y el algoritmo de BWA v.0.15-r1140, obteniendo las secuencias consensos. Las secuencias consensos fueron mapeadas frente a WIV04 usando el software Bowtie 2, para determinar sus modificaciones. Y finalmente, mediante BLAST en GISAID (www.epicov.org) se pudo identificar su linaje con genomas de 100% de cobertura. A libre disponibilidad del CRNI, las secuencias en formato fasta con su respectivo metadata fueron subidas al repositorio de GISAID (www.gisaid.org). Sin embargo, el resultado de linaje de las 80 muestras fue remitidas en Excel para INSPI-LIP Tena.

2.11 Adquisición de genomas en GISAID

Nextstrain (www.nextstrain.org) es una interfaz ligada a la base de datos de GISAID que permite interactuar con las secuencias de SARS-CoV-2. Para el estudio, se procedió a filtrar las secuencias correspondientes a las provincias de Napo, Orellana, Pastaza, Sucumbíos y Morona Santiago y que pertenezcan al CRNI. Se obtuvieron 32 genomas de las 80 muestras seleccionadas para secuenciamiento a la fecha 30 de noviembre del 2021, posteriormente, con el código de asignación se procedió a descargarla de GISAID (www.epicov.org).

2.12 Genotipificación en el tiempo

Se filtró en Nextstrain (www.nextstrain.org) por división administrativa (provincias), se seleccionó por regiones: Costa (7 provincias), Sierra (10 provincias), Amazonía (6 provincias). Una vez realizado aquello, se obtuvo gráficas de frecuencias de las variantes genéticas en el tiempo.

2.13 Construcción de árbol filogenético

En el software MEGA X, los 32 genomas en formato fasta fueron alineados y posteriormente, los criterios para construcción filogenética se basaron en el método Bootstrap, UPGMA como método estadístico y máxima probabilidad compuesta. Las muestras se hallan identificadas como hCoV-19/País/Código asignado por CRNI/Nomenclatura subida en GISAID.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

Durante el periodo de junio a noviembre 2021 se obtuvieron un total de 5 602 muestras sospechosas de COVID-19. De las cuales, 1 351 (24,11%) resultaron positivas para la detección molecular del virus SARS-CoV-2. Mismas que proceden: 2 617 de Napo (Coordinación Zonal 2 Salud), 1 407 de Orellana (Dirección Distrital 22D03), 658 de Sucumbíos (Dirección Distrital 21D02), 468 de Morona Santiago (Dirección Distrital 14D01) y 450 de Pastaza (Dirección Distrital 16D01, 16D02). Teniendo en cuenta los hospitales: Hospital José María Velasco Ibarra, Hospital General Puyo, Hospital General Francisco de Orellana, Hospital Franklin Tello, Hospital Básico IESS Tena, Hospital Básico Baeza, Hospital del Día Tena y Hospital Básico Shushufindi. Agregando los centros de salud de primer y segundo nivel de atención en las 5 provincias. Abarcando grupos de edad desde recién nacidos hasta pacientes geriátricos. Y receptando diversos tipos de muestra tales como 4 991 HN, 75 HO, 389 HN-HO, 133 ES, 15 SA y 4 AT.

3.1 Análisis de datos

3.1.1 Incidencia global

La incidencia del virus (casos positivos por cada 100 000 personas-semanal) en las semanas epidemiológicas 26 y 27 fueron 21,54 y 28,72, respectivamente. Estos valores fueron los más altos reportados durante todo el periodo de estudio. Partiendo en la semana 28 se describe un decrecimiento paulatino hasta la semana 35 con la cifra de 1,76, siendo este, el punto más bajo de incidencia alcanzado. A medida que avanzan las semanas epidemiológicas, se refleja una tendencia de alza en la incidencia, con la semana 46 con el nuevo pico de 15,02 (Figura 4).

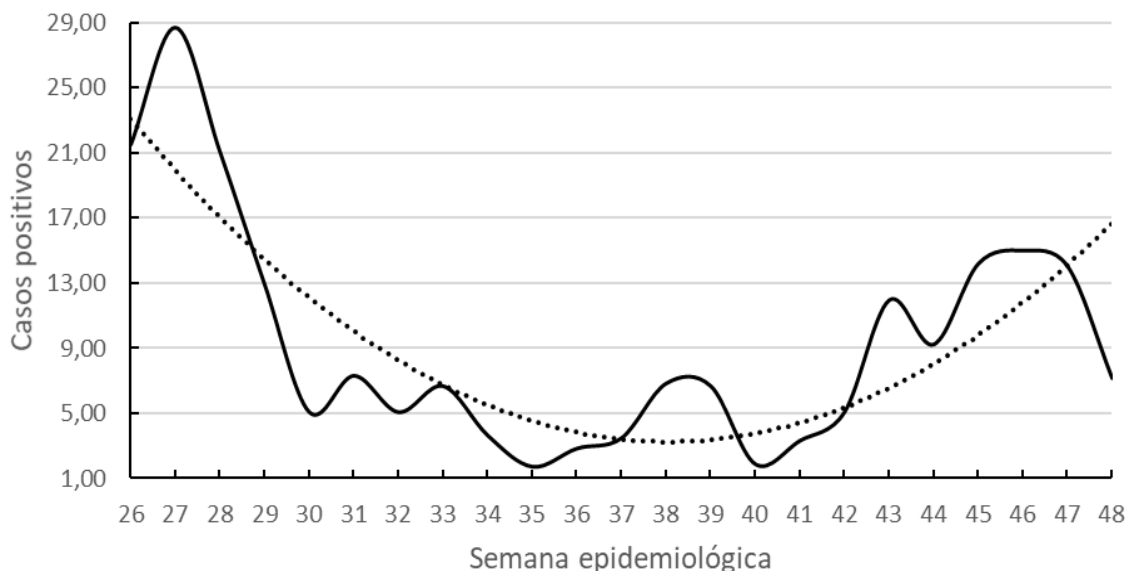


Figura 4. Incidencia global de casos positivos para la detección del virus SARS-CoV-2 por cada 100 000 personas por semana, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2 021.

3.1.2 Incidencia desagregada por provincias

El test de chi-cuadrado de incidencia desagregada por provincia arrojó un $p\text{-value } 2,2 \cdot 10^{-16} < 0,05$. Entonces se denota una relación dependiente entre la incidencia y el lugar de procedencia de las muestras. Para el caso de Napo se tiene 2 617 muestras receptadas siendo la provincia con más pruebas RT-PCR realizadas (46,71%). Adicionalmente, Napo presenta los valores más altos de incidencia durante todo el periodo. Siendo la semana 27, el mayor pico de incidencia con 79,88. Mientras que, Sucumbíos tuvo 17,57 en la semana 47, que fue el valor más bajo de incidencia entre todas las provincias en su pico máximo. Recalcando que se analizaron 658 (11,74%) muestras de este lugar. Lo cual describe que Napo y Orellana con el 71,83% del total de ensayos realizados, son las provincias con las cifras más altas de incidencia durante julio a noviembre del año 2 021 (Figura 5).

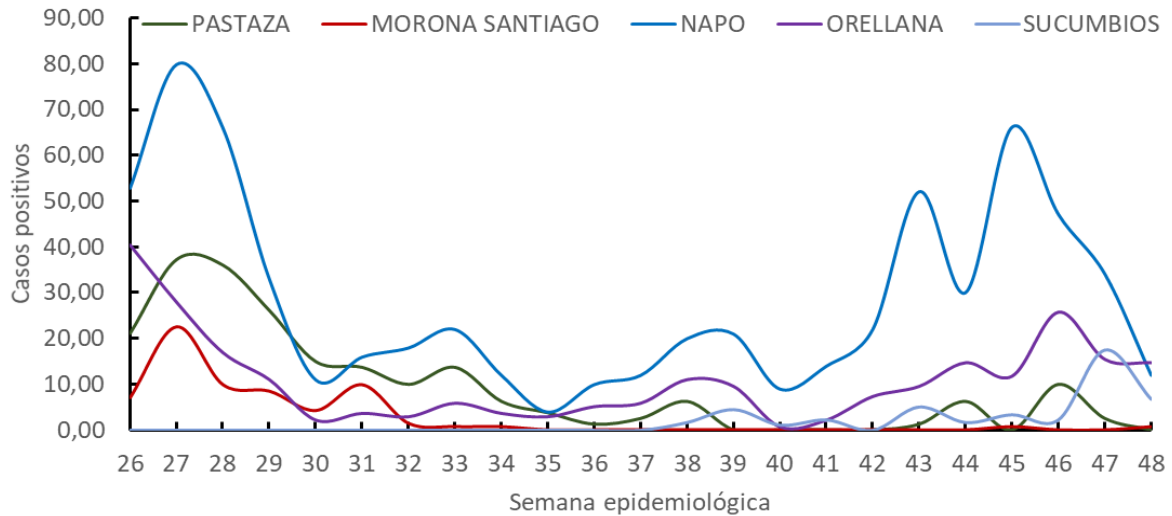


Figura 5. Incidencia desagregada por provincia de casos positivos para la detección del virus SARS-CoV-2 por cada 100 000 personas por semana, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2 021.

3.1.3 Chi – cuadrado por grupos etarios

El test de chi-cuadrado para esta categoría resultó en un p-value $0,00419 < 0,05$. Lo cual se traduce en una relación estadísticamente significativa para la positividad de las muestras y los grupos etarios. Es así que, las agrupaciones de 16 a 30 años, 31 a 45 años y 46 a 65 años describen los valores más altos durante las 23 semanas epidemiológicas. Siendo la semana 27, con 60, 67 y 36 casos positivos, respectivamente, el umbral más alto registrado por los 3 grupos. Por otro lado, para los grupos de 0 a 15 años y 65 años en adelante el límite superior de casos positivos es 8 y 13 en la semana 26. Es así que, se puede interpretar que la población de 16 a los 65 años fue más susceptible a contraer el virus SARS-CoV-2 durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 del año 2 021 (Figura 6).

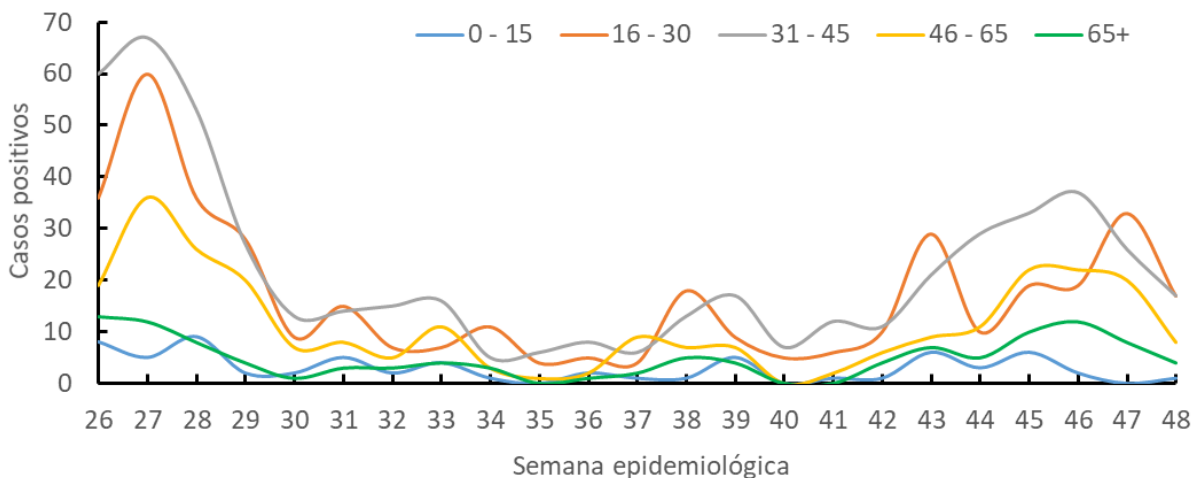


Figura 6. Distribución de casos positivos por semana para la detección del virus SARS-CoV-2 según los grupos etarios, reportados por INSPI-LIP Sede Tena durante las semanas epidemiológicas 26 a 48 (julio a noviembre) del año 2021.

3.1.4 Chi – cuadrado por género

A pesar de que existe una brecha de 470 muestras analizadas entre ambas agrupaciones, el test de chi-cuadrado arrojó un p-value de $0,841 > 0,05$. Por tal motivo, es posible afirmar que no existe una relación estadísticamente significativa para atribuir los casos positivos en relación al género. Lo cual se refleja durante todo el periodo de estudio (Figura 7).

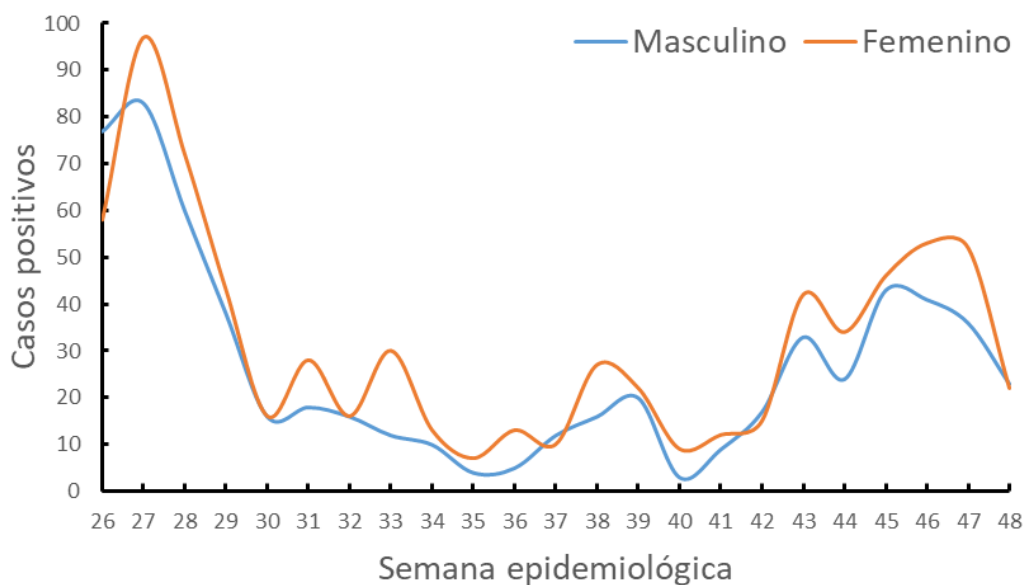


Figura 7. Casos positivos por semana para la detección de SARS-CoV-2 acorde al género.

3.1.5 Positividad de casos para SARS-CoV-2 acorde al tipo de muestra

El 89,09 % de muestras analizadas correspondió a hisopados nasofaríngeos, los cuales tuvieron un 24,48 % de positividad. Dentro del porcentaje restante se agruparon muestras de hisopados orofaríngeos, hisopados naso-orofaríngeos, esputo, saliva y aspirado traqueal. En este grupo predominó la positividad en esputo y saliva con 32,33 y 26,67 % , respectivamente (Figura 8).

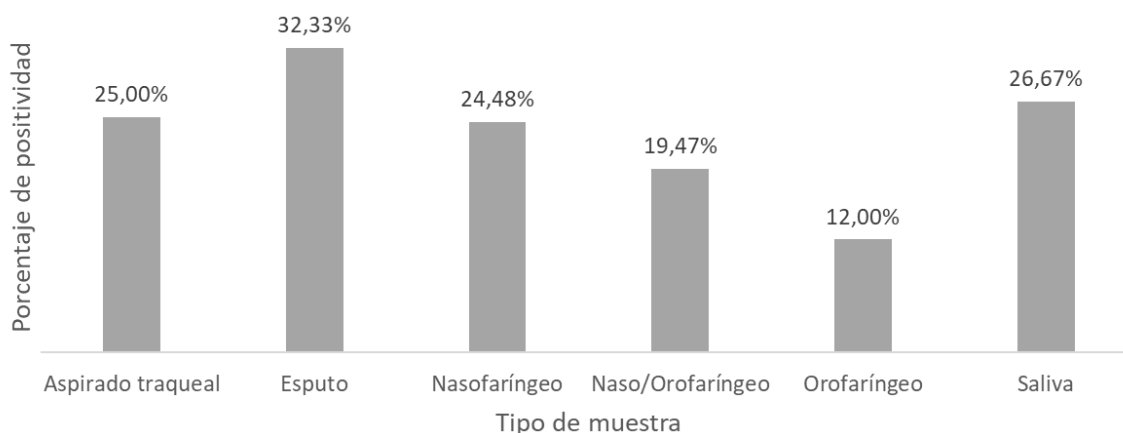


Figura 8. Porcentaje de positividad para SARS-CoV-2 en diferentes tipos de muestras sospechosas para COVID-19 analizados por INSPI-LIP mediante RT-PCR.

3.1.6. Positividad de casos para SARS-CoV-2 acorde a síntomas

El 13,57 % de las 884 muestras analizadas en pacientes asintomáticos fueron reportadas como positivas, por otro lado, para sintomáticos se tiene el 25,14 % de positividad de las 4 718 restantes (Figura 9).

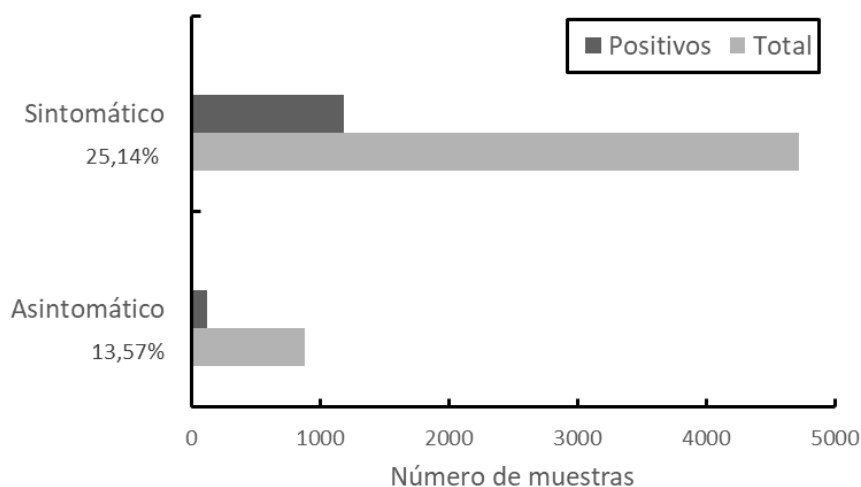


Figura 9. Porcentaje de positividad para SARS-CoV-2 basado en la sintomatología.

3.2 Genotipificación en el tiempo

En Nextstrain se generó la gráfica de frecuencias relativas para las variantes genéticas circulantes en cada región. Sin embargo, para una mayor interpretación se amplió el periodo de estudio siendo la semana epidemiológica 22 (junio) el punto de inicio actualizado.

En la semana 22 (junio), se observó en la región Costa la presencia de las variantes de interés Alpha V1, Gamma V3, Iota y Lambda con una ligera codominancia de las dos últimas. En la Sierra, se tuvo Lambda, los primeros reportes de Mu en Ecuador, e Iota con una dominancia del 60% por sobre el resto. Mientras que, en la Amazonía se registró el ingreso rezagado de las variantes Gamma V3 y Lambda a la región, adicionalmente, las variantes Alpha V1 e Iota empiezan a ser desplazadas por parte de las 2 ingresantes.

En la semana epidemiológica 26 (julio), en la Costa se reportó la dominancia con el 52% de frecuencia para la variante de interés Alpha V1, una presencia mínima de Gamma V3 y el declive total de Iota y Lambda. Sin embargo, esta fecha es relevante pues se generaron los primeros casos de la variante de preocupación Delta. En la Sierra, se observó un ascenso considerable en la frecuencia para Mu con el 27%, la dominancia de Lambda en el 40% de muestras secuenciadas, y el resto corresponde a Gamma V3 y Alpha V1. En la Amazonía, se tuvo una codominancia por parte de Lambda y Gamma.

En la semana epidemiológica 31 (agosto), en la Costa la variante Delta se convirtió en la dominante obteniendo un 58% de frecuencia, se describe una presencia mínima de Gamma V3 y Alpha V1. Adicionalmente, se tuvieron los primeros casos de Mu en la región. En la Sierra, Gamma V3 presentó un 40% de frecuencia, seguido por Lambda con un 19%, Alpha V1 y Mu se hallan distribuidos con el porcentaje restante. En la Amazonía, se mantuvo la misma tendencia de la semana 26 con la codominancia de Lambda y Gamma.

En la semana epidemiológica 35 (septiembre), en la Costa se tiene una codominancia con cerca del 50% de la variante de interés Mu y la variante de preocupación Delta. En la Sierra y Amazonía, Mu escala hasta el 65% de frecuencia y se tiene el ingreso de Delta a ambas regiones como respuesta a contagios comunitarios. En la semana epidemiológica 39 (octubre), en la Costa y

Sierra, Mu pasa a ser desplazada totalmente por Delta que obtiene una frecuencia del 82% y 95%, respectivamente. En la Amazonía, Delta continúa expandiéndose lentamente con un 40% de dominancia y el resto distribuido entre Mu y Lambda.

Para la semana epidemiológica 44 (noviembre), en la Costa y Sierra se observa una dominancia total por parte de Delta con más del 99% de frecuencia. Mientras que, para la Amazonía aún se reportan casos de Mu con un 12% de frecuencia, 80% de dominancia por Delta y el 8% restante para algunos casos de Gamma V3. Para la semana epidemiológica 48 (noviembre), en la Amazonía, Costa y Sierra se mantiene la dominancia de Delta con más del 95% de frecuencia. Sin embargo, se reportó el ingreso de la variante de preocupación Omicron en las 2 últimas regiones mencionadas (Figura 10).

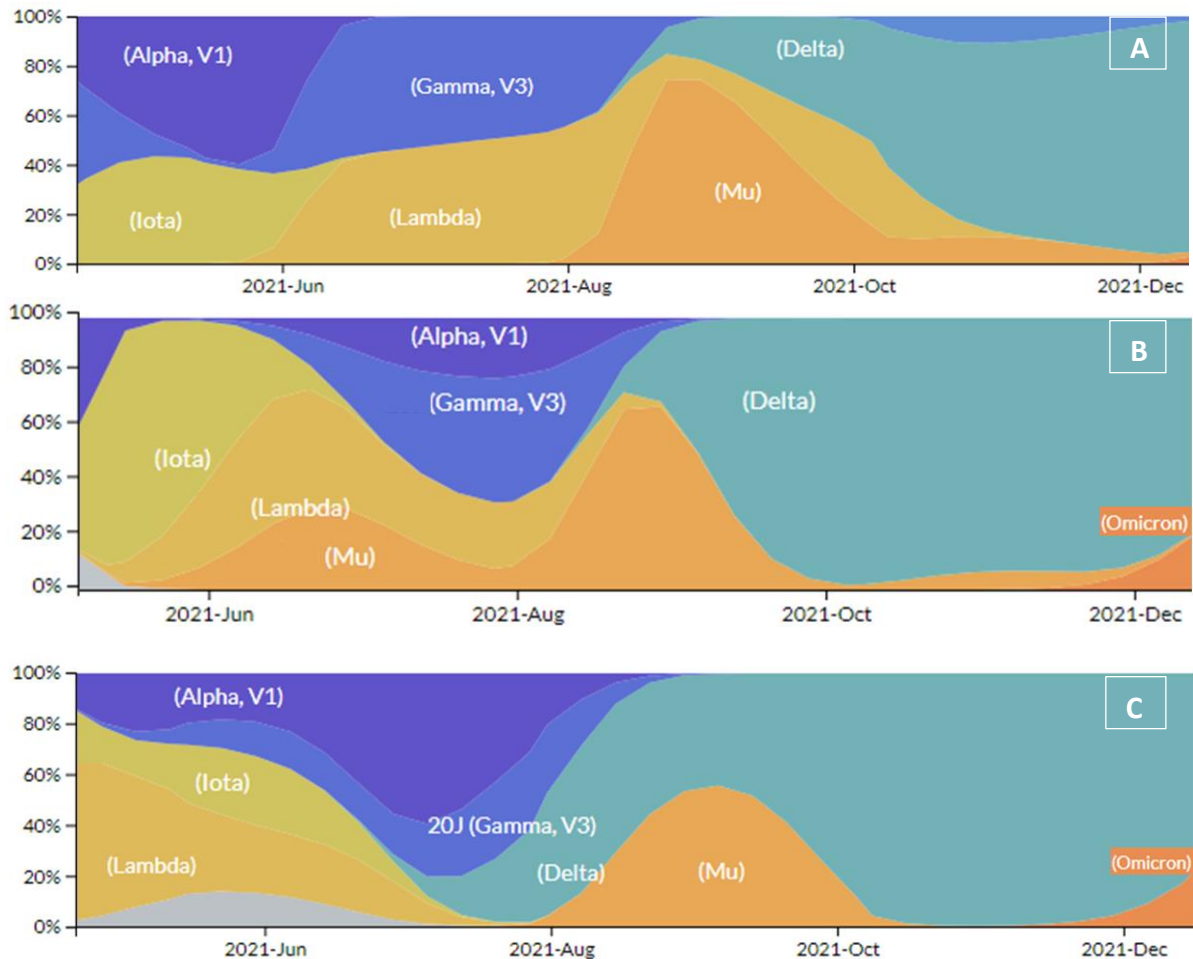


Figura 10. Frecuencia relativa de variantes genéticas durante las semanas epidemiológicas 22 (junio) a 48 (Noviembre) del año 2021. **A.** Amazonía **B.** Sierra **C.** Costa.

3.3 Sublinajes de variante Delta

Dentro de la región Amazónica se reportaron 35 casos de la variante de preocupación Delta. En este grupo se logró identificar 8 sublinajes que corresponden a mutaciones en los segmentos A222V y Y145H → (AY.X) de la proteína Spike. En este sentido, AY.4 y AY.122 sobresalen del resto con 28 % y 26 % respectivamente. Los 6 sublinajes faltantes se distribuyen en menor proporción con AY.43 como tercero con el 17 % de frecuencia (Figura 11).

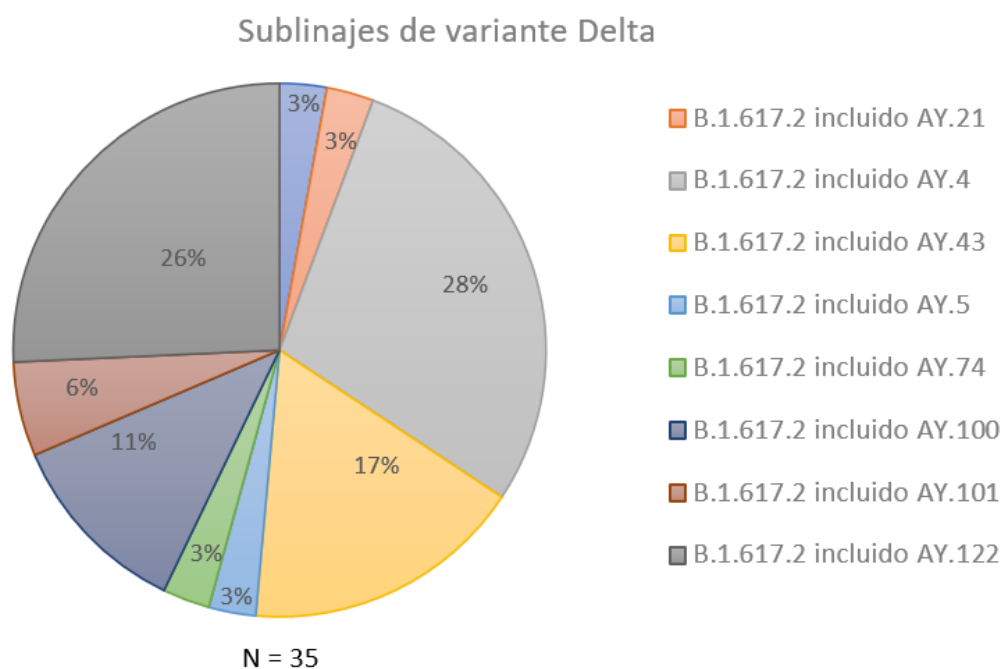


Figura 11. Sublinajes detectados en las 35 muestras reportadas como Delta por secuenciamiento en la plataforma NGS Illumina Miseq™ y posterior comparativa con la referencia WIV04.

3.4 Árbol filogenético

En el árbol filogenético es posible visualizar los 5 clados de las variantes genéticas que circularon en la región Amazónica durante la semana epidemiológica 26 a 48 del año 2021. Dentro de los mismos, 4 pertenecen a variantes de interés y 1 a variante de preocupación obtenidos a partir de su identificación por genoma completo. Los clados se encuentran etiquetados por su nombre (linaje PANGO). Tomado como referencia la menos divergente se tiene el taxón de Alpha (B.1.1.7), la tasa evolutiva del virus SARS-CoV-2 generó el apareamiento de nuevas variantes con más polimorfismos dentro de su genoma. En consecuencia, el taxón de Lambda (C.37) y

Gamma (P.1) revela una alta similaridad a pesar de su divergencia con referencia a la secuencia WIV04. Por otro lado, Delta (B.1.167.2) es la más divergente de las 5 con un alto número de mutaciones. Motivo por el cual, se tiene 22 genomas completos de esta variante, y dentro de ella, se encuentran los 8 sublinajes descritos en la **sección 3.3** (Figura 12).

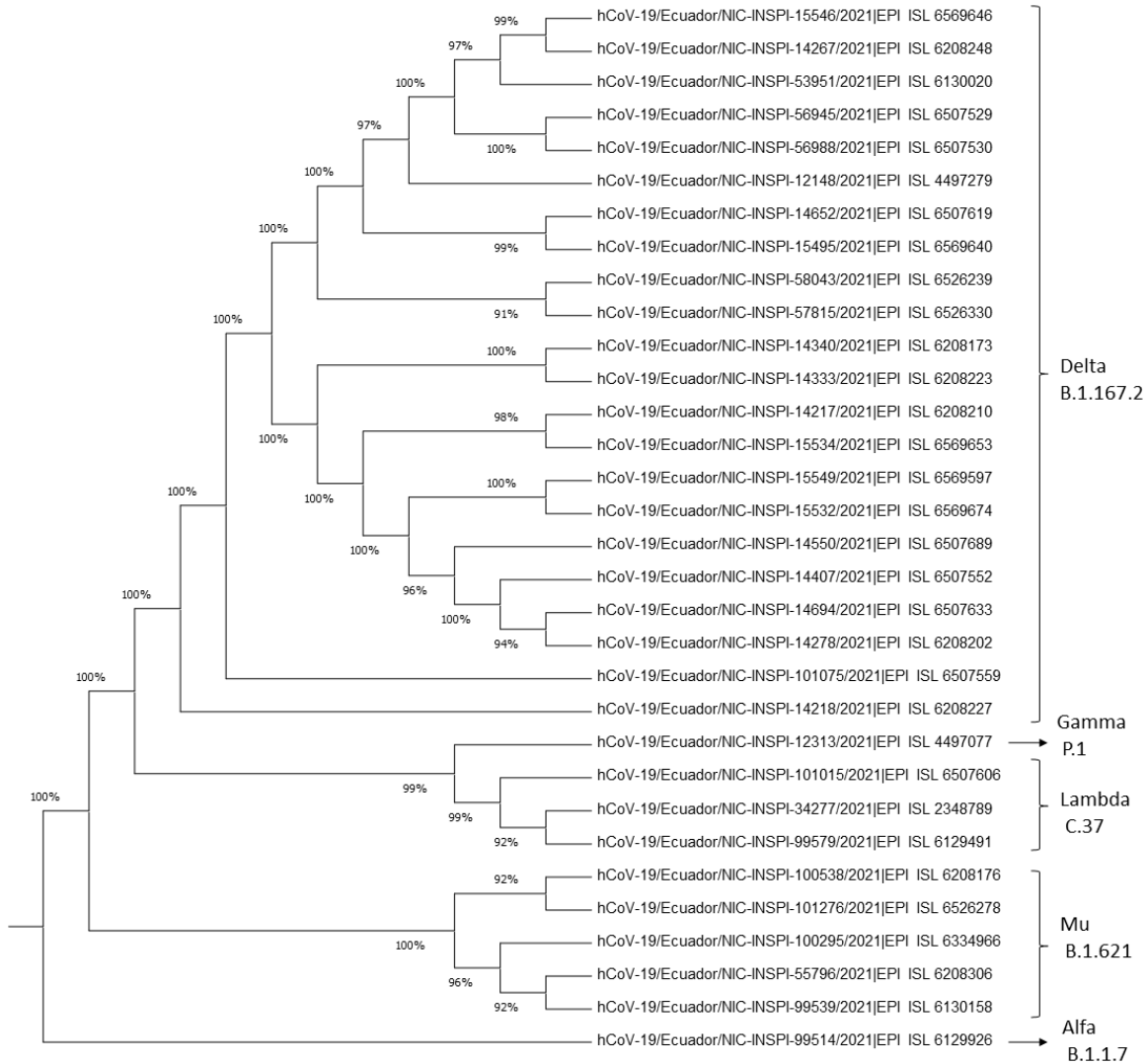


Figura 12. Análisis filogenético por el método Bootstrap, UPGMA como método estadístico y máxima probabilidad compuesta de los 32 genomas completos del virus SARS-CoV-2 circulantes en la región Amazónica, subidas por el CRNI a GISAID obtenidas por secuenciamiento de nueva generación mediante la plataforma Illumina Miseq™ (Illumina Inc.).

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Incidencia global

Es necesario mencionar el contexto en que se desarrolló el estudio, a inicios del mes de Junio el gobierno emprendió el Plan de Vacunación 9-100, en este sentido, la inmunización se vio incrementada de manera masiva con un pico de 428 mil vacunados en la fecha 16 de julio del 2021 [64]. Teniendo en cuenta que las vacunas usadas en su mayoría Pfizer y Sinovac alcanzan su máxima respuesta inmunitaria de primera dosis en los posteriores 10 a 12 días, y los 7 días posteriores a segunda dosis [65–67]. La reducción de incidencia de casos COVID-19 desde la semana epidemiológica 30 tiene relación directa con el proceso de vacunación.

Sin embargo, a finales del mes de Agosto el reporte de la llegada de los 2 primeros casos de la variante Delta, así como también el ascenso de VOI Mu por su elevado número de mutaciones, dieron como resultado que los casos positivos para SARS-CoV-2 en la Amazonía ecuatoriana tuvieran tendencia a elevarse nuevamente. Esto está ligado estrictamente a las variantes genéticas circulantes, puesto que, Delta es característico por presentar mayor carga viral expresado en un Ct más bajo en el diagnóstico molecular por RT-PCR, mientras que para VOI Mu, los reportes preliminares describen potenciales propiedades de evasión inmunitaria como también un Ct ligeramente mayor a Delta [68,69].

Adicionalmente en el ámbito social, desde la implementación de la vacunación masiva las medidas de restricción en lugares de aglomeración se vieron aliviadas, la baja predisposición de la población por acatar medidas de bioseguridad, anuncio de retorno a clases presenciales y varios feriados que han transcurrido, dieron como consecuencia el ascenso considerable de la incidencia de COVID-19 a partir de la semana epidemiológica 43 teniendo a la VOC Delta como agente circulante principal etiológico en la Amazonía.

4.2 Incidencia desagregada

En grupo etario, se establece que a pesar de haber existido una vacunación temprana para los grupos vulnerables que comprenden tercera edad, la incidencia se mantuvo elevada atribuido al bajo número de muestras receptadas y el descenso de la respuesta inmunitaria [70]. Agregando que el objetivo de la inmunización es la prevención de la hospitalización o muerte, más no de la adquisición de la enfermedad como tal [66]. Encontrándose casos de síntomas leves que pudiesen ser controlados con el aislamiento de 10 días posterior al diagnóstico [71]. Los grupos de edad que engloban la población activamente laboral, comprendieron el mayor número de muestras receptadas como resultado de la exposición diaria a esta enfermedad [72].

La ubicación del laboratorio en el centro de la Amazonía, permitió la recepción en el tiempo establecido de las muestras para un diagnóstico óptimo. Napo como sede fue la provincia más beneficiada de este servicio, lo cual se refleja en las decisiones tomadas por autoridades locales ante cualquier incremento leve de casos o el reporte de ingreso de variantes. Destacando que Morona Santiago y Sucumbíos mantuvieron un envío parcial de muestras, al tener en conjunto laboratorios de diagnóstico con cercanía en Quito y Cuenca, como también la disponibilidad del laboratorio de IKIAM brindando el diagnóstico para el distrito de salud 21D02 (Sucumbíos) e Hospital IESS Puyo (Pastaza).

En cuanto al género, no es posible determinar características en cada género que permitan inferir vulnerabilidad para cualquiera de los dos casos. En vista que, el ingreso de SARS-CoV-2 se da por el reconocimiento con la proteína S conjuntamente con ACE2; y para ambos grupos se obtiene las mismas características citológicas, esto se denota en la similaridad de incidencia presentado para los ambos casos. En cuanto al tipo de muestra, el mayor número fue receptado en hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos, lo cual, aumenta la sensibilidad en la detección molecular del SARS-CoV-2 [73]. Sin embargo, el protocolo in-house implementado por el CRNI abarcó un amplio rango de muestras, presentando positividad inclusive en $\frac{1}{4}$ de aspirados bronquealveolares analizados.

La prevención y control de la pandemia por entidades gubernamentales produjo el lanzamiento de campañas para tomas de muestras a personas sin referencia de síntomas, dando como resultado, que 120 pacientes asintomáticos fueran aislados, evitando la propagación de más casos. Pues es conocido que, a pesar de no existir síntomas asociados al diagnóstico, igualmente se podría dar transmisibilidad [74].

4.3 Genotipificación en el tiempo y sublinajes de delta

A escala regional, se observa que, tanto Costa como Sierra tienen el ingreso de variantes de interés y preocupación antes que la Amazonía. Esto principalmente se encuentra ligado a la presencia de aeropuertos internacionales en ambos sitios. La variante Delta desplazó la dominancia presentada por Alfa, lo cual se ha descrito en otros lugares como Estados Unidos y Europa que afirman el incremento de transmisibilidad debido a la elevación de la carga viral en los periodos iniciales de infección [75]. A escala genética, la alteración más importante en la proteína Spike, específicamente el segmento P681R una mutación no silenciosa transforma un residuo de prolina a arginina y facilita la entrada viral de manera más eficiente que Alfa, puesto que, también se ha reportado el cambio aminoacídico en la misma posición, pero por un residuo diferente [76].

El SARS-CoV-2 original requiere dos cortes de la proteína S, en S1 y S2 por enzimas del hospedero para poder ingresar a la célula y continuar con el ciclo de replicación. Mientras que, para SARS-CoV-2 con mutaciones N501Y, E484K y L452R específicamente en la variante Delta y Alfa, el cambio genera un sitio de clivaje de furina (enzima presente en la célula hospedera). Es así que se da una preactivación viral en las nuevas partículas que emergen de una célula infectada, de manera que para poder ingresar hacia otras células es requerido un único corte lo cual lo hace más efectivo para la replicación [77–79]. Estas no son las únicas mutaciones que han generado una propagación más acelerada en la variante Delta, esta se ve complementada por varias otras, como A222V y Y145H (AY.X) que ha provocado la clasificación por sublinajes basado en variaciones dentro de estos segmentos. Pues es conocido que, alteraciones de estos nucleótidos aumentan la afinidad entre S-ACE2, esto quedó reportado con Delta AY.42 o también llamada Delta Plus que colapsó los servicios de atención médica en la India [76].

Mutaciones en Mu se localizan en el dominio N-terminal de la proteína S y en otras regiones, varias de ellas ya descritas en otras variantes de preocupación. Sin embargo, E484K afecta el dominio de reconocimiento para anclaje y ha mostrado una gran reducción en la sensibilidad de los anticuerpos generados por infección natural y vacunación [69]. A pesar de no tener gran incidencia, ha sido reportada en 39 países siendo Estados Unidos, Colombia, Canadá y Ecuador, como aquellos con mayor infecciones diagnosticadas [80] Cabe recalcar que, esta variante a pesar de encontrarse en VOI no ha sido punto de atención para el desarrollo de estudios a fin de elucidar más a profundidad las posibles afectaciones que pudiese generar. Finalmente, el ingreso de la variante de preocupación Omicron a Ecuador el 29 de noviembre del 2021 despertó alerta en las entidades de salud. Sus 37 mutaciones, de las cuales 15 están en RBD deja en claro que es necesario mantener la vigilancia genómica. Y a su vez, promover la investigación en la elucidación de la actividad clínica relacionada tanto a las mutaciones en la proteína Spike como al resto del genoma [81].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El brote de SARS-CoV-2 en la región Amazónica tuvo la incidencia más elevada durante la semana epidemiológica 26 y 27 (julio) del 2021. Posteriormente, se mantuvo en decrecimiento con hasta la semana 35. A partir de allí, se tuvo un incremento paulatino de las cifras de incidencia. Los grupos etarios más susceptibles comprenden aquellos que se encuentran en el estrato laboral. El resultado de secuenciamiento del genoma de SARS-CoV-2 reveló el ingreso de la variante de preocupación Delta (B.1.617.2) a la Amazonía en la semana epidemiológica 36 y su posterior dominio. Es así que se tiene como agente etiológico del incremento de casos a la variante Delta. Mismo que presenta diferentes mutaciones en la proteína Spike y su región RBD como las más destacadas se tiene a P681R y L452R que le confieren mayor transmisibilidad y evasión inmunitaria. Motivo por el cual, es necesario la vigilancia epidemiológica y genómica a fin de generar insumos para la toma de decisiones en salud pública.

REFERENCIAS

1. Huaremovic D. Brief history of pandemics. 2019. doi:10.1007/978-3-030-15346-5
2. Elbay RY, Kurtulmuş A, Arpacioğlu S, Karadere E. Depression, anxiety, stress levels of physicians and associated factors in Covid-19 pandemics. *Psychiatry Res.* 2020;290: 1–5. doi:10.1016/j.psychres.2020.113130
3. Venkatapuram S. Human Capabilities and Pandemics. *J Hum Dev Capab.* 2020;21: 280–286. doi:10.1080/19452829.2020.1786028
4. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10: 35–66. doi:10.1128/cmr.10.1.35
5. Kerbl R, Zepp F. Coronavirus disease 2019. *Monatsschrift fur Kinderheilkunde.* 2021. doi:10.1007/s00112-021-01158-0
6. Cardoso CW, Kikuti M, Prates APPB, Paploski IAD, Tauro LB, Silva MMO, et al. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11: e0005334. doi:10.1371/journal.pntd.0005334
7. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O’Toole Á, Haverkate M, Mollers M, et al. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med.* 2020;26: 1405–1410. doi:10.1038/s41591-020-0997-y
8. Looi LM, Chua KB. Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays J Pathol.* 2007;29: 63–67.
9. Wenham C, Kavanagh M, Torres I, Yamey G. Preparing for the next pandemic. *BMJ.* 2021;373: 1839–1842. doi:10.1136/bmj.n1295
10. Peeri NC, Shrestha N, Siddikur Rahman M, Zaki R, Tan Z, Bibi S, et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int J Epidemiol.* 2021;49: 717–726. doi:10.1093/IJE/DYAA033

11. Berger D. A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. Part 1--Ancient times through the 19th century. *MLO Med Lab Obs.* 1999;31.
12. Kornes HM. A Brief History of Physical Diagnosis. *Ann Med Hist.* 1939;1: 50–67.
13. Peterson EM, Nakasone A, Platon-DeLeon JM, Jang Y, De la Maza LM, Desmond E. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 3564–3568. doi:10.1128/jcm.37.11.3564-3568.1999
14. Gasser T, Bressman S, Dürr A, Higgins J, Klockgether T, Myers RH. Molecular diagnosis of unherited movement disorders. Movement disorders society task force on molecular diagnosis. *Mov Disord.* 2003;18: 3–18. doi:10.1002/mds.10338
15. Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell Biosci.* 2020;10: 1–5. doi:10.1186/s13578-020-00404-4
16. Guo G, Ye L, Pan K, Chen Y, Xing D, Yan K, et al. New Insights of Emerging SARS-CoV-2: Epidemiology, Etiology, Clinical Features, Clinical Treatment, and Prevention. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 1–22. doi:10.3389/fcell.2020.00410
17. Khan M, Khan ST. Epidemiology and Progress So Far. *Moléculas.* 2021;26 (1): 1–25.
18. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579: 270–273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
19. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5: 536–544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
20. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol.* 2020;30: 1346-1351.e2. doi:10.1016/j.cub.2020.03.022
21. Juengling FD, Maldonado A, Wuest F, Schindler TH. The Role of Nuclear Medicine for

- COVID-19: Time to Act Now. *J Nucl Med.* 2020;61: 781–782.
doi:10.2967/jnumed.120.246611
22. Ioannidis JPA. Global perspective of COVID-19 epidemiology for a full-cycle pandemic. *Eur J Clin Invest.* 2020;50: 1–9. doi:10.1111/eci.13423
 23. Yang J, Chen X, Deng X, Chen Z, Gong H, Yan H, et al. Disease burden and clinical severity of the first pandemic wave of COVID-19 in Wuhan, China. *Nat Commun.* 2020;11: 1–10. doi:10.1038/s41467-020-19238-2
 24. Hunter DJ. Engla, Journal - 2010 - New engla nd journal. *N Engl J Med.* 2020;31: 1969–73. Available: nejm.org
 25. Shantanam S. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol.* 2018;176: 139–148. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301.Structure
 26. Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, et al. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res.* 2021;232: 60–74. doi:10.1016/j.trsl.2021.02.006
 27. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci.* 2021;30: 1114–1130. doi:10.1002/pro.4075
 28. Lippi G, Mattiuzzi C. Update picture of SARS-CoV-2 variants and mutaitons. *Diagnosis.* 2022;9;11-17. doi: 10.1515/dx-2021-0149
 29. Rahimi A, Mirzazadeh A, Tavakolpour S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics.* 2021;113: 1221–1232. doi:10.1016/j.ygeno.2020.09.059
 30. Broadbent AJ, Santos CP, Anafu A, Wimmer E, Subbarao K, Diseases I, et al. of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus , in ferrets. 2017;34: 563–570. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.054.Evaluation

31. Ron Gilat, M.D., Eric D. Haunschild B.S., Tracy Tauro B.S. B.A., Brian J. Cole M.D. MB. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-. *Ann Oncol.* 2020; 19–21.
32. Pallesen J, Wang N, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfer RN, Turner HL, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114: E7348–E7357. doi:10.1073/pnas.1707304114
33. Dagotto G, Yu J, Barouch DH. Approaches and Challenges in SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Cell Host Microbe.* 2020;28: 364–370. doi:10.1016/j.chom.2020.08.002
34. Chen WH, Tao X, Agrawal AS, Algaissi A, Peng BH, Pollet J, et al. Yeast-expressed SARS-CoV recombinant receptor-binding domain (RBD219-N1) formulated with aluminum hydroxide induces protective immunity and reduces immune enhancement. *Vaccine.* 2020;38: 7533–7541. doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.061
35. Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med.* 2006;3: 2359–2375. doi:10.1371/journal.pmed.0030525
36. Vajo Z, Kosa L, Szilvasy I, Pauliny Z, Bartha K, Visontay I, et al. Yearly licensing studies from 1997 to 2007 of the inactivated whole virus seasonal influenza vaccine fluval - A useful approach to pandemic vaccine development even in less well developed countries? *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;2: 221–228. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00053.x
37. Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, et al. SARS-CoV-2 pandemic. 2020; 19–21.
38. Sun W, Leist SR, McCroskery S, Liu Y, Slamanig S, Oliva J, et al. Newcastle disease virus (NDV) expressing the spike protein of SARS-CoV-2 as a live virus vaccine candidate. *EBioMedicine.* 2020;62. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103132
39. Case JB, Rothlauf PW, Chen RE, Kafai NM, Fox JM, Smith BK, et al. Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus Vaccine Vector Protects against SARS-CoV-2-Mediated

- Pathogenesis in Mice. *Cell Host Microbe*. 2020;28: 465-474.e4. doi:10.1016/j.chom.2020.07.018
40. Silveira MM, Moreira GMSG, Mendonça M. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life Sci*. 2021;267: 118919. doi:10.1016/j.lfs.2020.118919
 41. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med*. 2020;383: 1544–1555. doi:10.1056/nejmoa2024671
 42. Or Caspi, Michael J. Smart RBN. *Fssf. Ann Oncol*. 2020; 19–21.
 43. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Triggler CR. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11: 1–17. doi:10.3389/fimmu.2020.585354
 44. WHO. Who COVID-19 dashboard. 2022.
 45. Virus adaptation at different levels. 2021.
 46. van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol*. 2020;83: 104351. doi:10.1016/j.meegid.2020.104351
 47. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*. 2020;7: 1012–1023. doi:10.1093/nsr/nwaa036
 48. Parums D V. Editorial: Revised world health organization (who) terminology for variants of concern and variants of interest of sars-cov-2. *Med Sci Monit*. 2021;27: 5–6. doi:10.12659/MSM.933622
 49. Konings F, Perkins MD, Kuhn JH, Pallen MJ, Alm EJ, Archer BN, et al. SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. *Nat Microbiol*. 2021;6: 821–823. doi:10.1038/s41564-021-00932-w
 50. Lippi G, Mattiuzzi C, Henry BM. Updated picture of SARS-CoV-2 variants and mutations.

Diagnosis. 2022;9: 11–17. doi:10.1515/dx-2021-0149

51. Salleh MZ, Derrick JP, Deris ZZ. Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi:10.3390/ijms22147425
52. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol.* 2022; 1–8. doi:10.1002/jmv.27643
53. Nelson G, Buzko O, Spilman P, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv.* 2021; 2021.01.13.426558. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.13.426558v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.13.426558v1.abstract>
54. Wang H, Jean S, Eltringham R, Madison J, Snyder P, Tu H, et al. Mutation-specific sars-cov-2 pcr screen: Rapid and accurate detection of variants of concern and the identification of a newly emerging variant with spike I452r mutation. *J Clin Microbiol.* 2021;59. doi:10.1128/JCM.00926-21
55. Sarkar R, Lo M, Saha R, Dutta S, Chawla-Sarkar M. S glycoprotein diversity of the Omicron variant. *medRxiv.* 2021; 2021.12.04.21267284. Available: <http://medrxiv.org/content/early/2021/12/06/2021.12.04.21267284.abstract>
56. Sarif S, Lundstrom K, Adadi P, Alaa A. Emergence of unique SARS-CoV-2 ORF10 variants and their impact on protein structure and function. 2020.
57. Harankhedkar S, Chatterjee G, Rajpal S, Khan A, Mirgh S, Gokarn A, et al. N Gene Target Failure (NGTF) for detection of Omicron: a 1 way out for the “stealth” too? 2022. Available: <https://doi.org/10.1101/2022.01.28.22269801>
58. Torres A, Fors M, Rivero T, Pantoja K, Ballaz S. Comparison between RT-qPCR for SARS-

- CoV-2 and expanded triage in sputum of symptomatic and asymptomatic COVID-19 subjects in Ecuador. *BMC Infect Dis.* 2021;21: 1–6. doi:10.1186/s12879-021-06272-8
59. Santander-Gordon D, Iturralde GA, Freire-Paspuel B, Zambrano-Mila MS, Morales-Jadan D, Vallejo-Janeta PA, et al. Crucial contribution of the universities to SARS-CoV-2 surveillance in Ecuador: Lessons for developing countries. *One Heal.* 2021;13. doi:10.1016/j.onehlt.2021.100267
60. Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, Voysey M, Koen AL, Fairlie L, et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N Engl J Med.* 2021;384: 1885–1898. doi:10.1056/nejmoa2102214
61. Gutierrez B, Márquez S, Prado-Vivar B, Becerra-Wong M, Guadalupe JJ, da Silva Candido D, et al. Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 Transmission Lineages in Ecuador. *Virus Evol.* 2021; 1–12. doi:10.1093/ve/veab051
62. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance.* 2020;25: 1–8. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
63. Thongpan I, Suntronwong N, Vichaiwattana P, Wanlapakorn N, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus infection in Bangkok, 2016-2017. *PeerJ.* 2019;2019: 2016–2017. doi:10.7717/peerj.6748
64. Jaramillo-Monge J, Obimpeh M, Vega B, Acurio D, Boven A, Verhoeven V, et al. Covid-19 vaccine acceptance in azuay province, ecuador: A cross-sectional online survey. *Vaccines.* 2021;9: 1–10. doi:10.3390/vaccines9060678
65. Danese E, Montagnana M, Salvagno GL, Peserico D, Pighi L, De Nitto S, et al. Comprehensive assessment of humoral response after Pfizer BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccination: a three-case series. *Clin Chem Lab Med.* 2021;59: 1585–1591. doi:10.1515/cclm-2021-0339
66. Chagla Z. The BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) vaccine had 95% efficacy against COVID-19 ≥ 7

- days after the 2nd dose. *Ann Intern Med.* 2021;174: JC15. doi:10.7326/ACPJ202102160-015
67. Mahase E. Covid-19: Pfizer vaccine efficacy was 52% after first dose and 95% after second dose, paper shows. *BMJ.* 2020;371: m4826. doi:10.1136/bmj.m4826
 68. Mahase E. Delta variant: What is happening with transmission, hospital admissions, and restrictions? *BMJ.* 2021;373: n1513. doi:10.1136/bmj.n1513
 69. Mb KS. Ineffective neutralization of the SARS-CoV-2 Mu variant by convalescent and vaccine sera. 2021; 4–10.
 70. Anderson EJ, Roupheal NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, et al. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med.* 2020;383: 2427–2438. doi:10.1056/nejmoa2028436
 71. Organización Mundial de la Salud. Manejo clínico de la infección respiratoria aguda grave presuntamente causada por el nuevo coronavirus (nCoV). *Organ Mund la Salud.* 2020;1: 1–11. Available: <https://extranet.who.int/iris/restricted/handle/10665/330856>
 72. Wise J. Covid-19: Exponential growth in infections in England is driven by young people. *Bmj.* 2021; n1568. doi:10.1136/bmj.n1568
 73. Pan American Health Organization. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of COVID-19 Virus Infection. *Paho.* 2020; 1–7. Available: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52458/PAHOIMSPHECOVID-19200038_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 74. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020;26: 1200–1204. doi:10.1038/s41591-020-0965-6
 75. Bolze, Alexandre and Luo, Shishi and White, et al. SARS-CoV-2 Variant Delta Rapidly Displaced Variant Alpha in the United States and Led to Higher Viral Loads. Disponiblen: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3952083>

76. Callaway E. The mutation that helps Delta spread like wildfire A key amino-acid change might underlie the coronavirus variant's ferocious infectivity. 2021; 1–6. Available: https://www.nature.com/articles/d41586-021-02275-2?utm_source=Nature+Briefing&utm_campaign=3e50acf932-briefing-dy-20210823&utm_me
77. Peacock TP, Sheppard CM, Brown JC, Goonawardane N, Zhou J, Whiteley M, et al. The SARS-CoV-2 variants associated with infections in India, B.1.617, show enhanced spike cleavage by furin. *bioRxiv*. 2021;44: 2021.05.28.446163. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.28.446163v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.28.446163v1.abstract>
78. Zhang J, Xiao T, Cai Y, Lavine CL, Peng H, Zhu H, et al. Membrane fusion and immune evasion by the spike protein of SARS-CoV-2 Delta variant. *Science*. 2021. doi:10.1126/science.abl9463
79. Liu Y, Liu J, Johnson BA, Xia H, Ku Z, Schindewolf C, et al. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2021;1: 1–29. doi:10.1101/2021.08.12.456173
80. Our World In Data. SARS-COV-2 sequences by variant. Disponible en: <https://ourworldindata.org/covid-cases>
81. Carrasco-Montalvo A, Armendáriz-Castillo I, Tello CL, Morales D, Armas-Gonzalez R, Guizado-Herrera D, et al. First detection of SARS-CoV-2 variant B.1.1.529 (Omicron) in Ecuador. *New Microbes New Infect*. 2022;45: 100951. doi:10.1016/j.nmni.2022.100951

ANEXOS

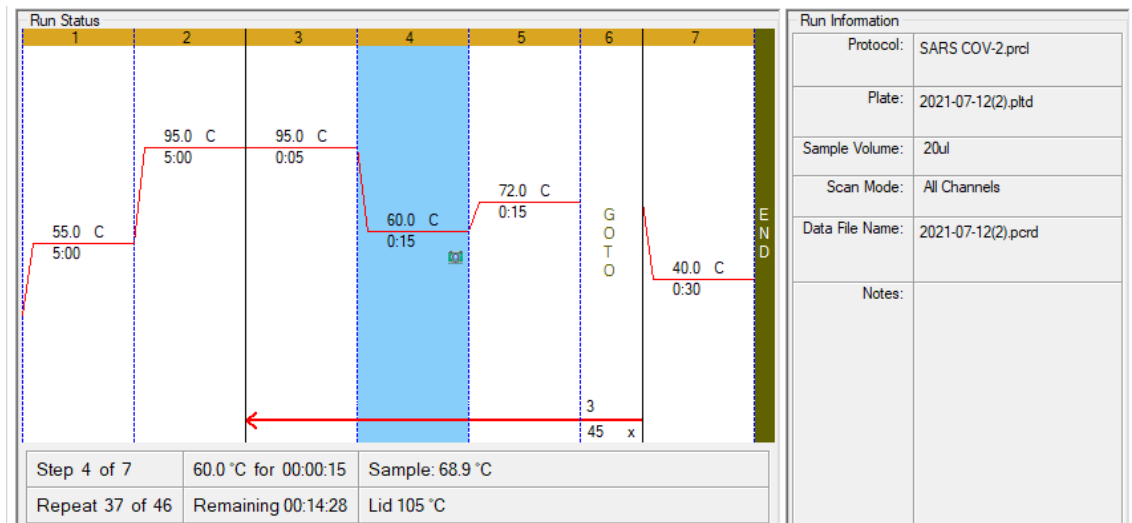
Anexo 1. Tabla detallada de los diferentes medios de transporte viral usado para la colecta de especímenes sospechosos de COVID-19.

Marca	Formulación	Almacenamiento	Volumen [mL]	Color
Linkgen	Guanidina Isocianato , citrato de sodio, etanol, agua ultrapura.	4 °C.	3	Incoloro
Citoswab	Búfer Tris-HCl, EDTA, NaCl, Sal de Guanidina.	4 °C.	3	Coral
DMEM	1X (Modificación de Dulbecco del medio de Eagle) con 4,5 g/L de glucosa y L-glutamina sin piruvato de sodio.	4 °C	3	Rojo
Kang Jian	Solución de sal de Hank (Isocianato de guanidina)	4 °C	3	Incoloro
PBS	PBS	4 °C	3	Incoloro
BDS	No refiere, sin embargo, contiene sal de Guanidina.	4 °C	3	Verde amarillento

Anexo 2. Composición de master mix para llevar a cabo la amplificación de los genes *E* y *GAPDH* en la detección molecular de SARS-CoV-2.

INSPI-LIP, CRN Influenza y otros virus respiratorios		
Reactivos	Volumen μL (1x)	Volumen μL (100x)
H2O Ultra Pura	4,7	530
Master mix	5	500
Primer _ GenE (F)	1	100
Primer_GenE (R)	1	100
Sonda_GenE (Fam)	0,5	50
Primer _ GenGAPDH (F)	1	100
Primer_Gen GenGAPDH (R)	1	100
Sonda_Gen GenGAPDH (Rox)	0,5	50
Enzima	0,3	30
Gen amplificado: Gen E - SARS-CoV-2, GenGAPDH-Control interno		
Sonda usada: FAM y ROX		
Taq: Transcriptasa inversa recombinante única (200x concentrada) y una mezcla completa de reacción dePCR 5x con AptaTaq Fast DNA Polimerasa (Roche).		

Anexo 3. Condiciones del termociclador para la corrida



Anexo 4. Diagnóstico molecular de un caso positivo para SARS-CoV-2 denotando la curva sigmoideal y un Ct < 33.

