

# Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN, UNSAM) -  
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos  
de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (ANLIS)

## Título

# Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas

Tesis presentada para optar al título de  
Magister en Microbiología Molecular

**Autor:** Lic. En Cs. Biol. Carlos José Cimmino

Director/a: Dr. Osvaldo César Uez  
Codirector/a: Dra. Débora Natalia Marcone  
Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Epidemiología Dr. J. H. Jara-ANLIS

Buenos Aires – 2023

## **Agradecimientos.**

*Al INE Dr. J. H. Jara, personal del Laboratorio y sector de Virología*

*A mis directores Dres. O. Uez y D. N. Marcone*

*A Dras. A. Pontoriero, E. Baumeister, J. Campos y sus grupos de trabajo en Instituto Malbrán.*

*A Dra. M. Viegas y su grupo de trabajo en Proyecto PAIS (Proyecto Argentino Interinstitucional de genómica de SARS-CoV-2)*

*A Dres. R. Campos y A. Culasso de la Facultad de Farmacia y Bioquímica*

*A ing. en Informática Carolina F. Diaz*

*Al acompañamiento de todos mis familiares y amigos*

## Trabajos presentados a Congresos relacionados con la Tesis “Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas”

- Vigilancia Integral de SARS-CoV-2 en la Ciudad de Mar del Plata. Carlos Cimmino, Andrea Silva, Gabriela Von Haften, Ana Paula Comino, Luciana Cigoy, Marcelo Scagliola , Andrea Lerman , Lucia López Miranda , Gonzalo Caló , Irene Pagano , Osvaldo Uez , Corina Berón. XIII Congreso Argentino de Virología 2021. CABA, Argentina. 29-noviembre a 1 diciembre 2021.
- Vigilancia epidemiológica y genómica de SARS-CoV-2 en la ciudad de Mar del Plata y alrededores. C Cimmino, A Lerman, PAIS, MALBRAN, A Culasso, DN Marcone, O Uez. XIII Congreso Argentino de Virología 2021. CABA, Argentina. 29-30 noviembre a 1 diciembre 2021.
- VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA Y GENOMICA DE SARS-CoV-2 EN UNA REGIÓN SANITARIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA. Carlos Cimmino, Andrea Lerman, Andrés Culasso, Rodolfo Campos, Osvaldo Uez, Débora N. Marcone. XXII Congreso SADI 2022. CABA, Argentina. 15-17 de septiembre, 2022.

## Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas.

### Resumen.

La emergencia del coronavirus SARS-CoV-2 a fines de 2019 en China, y su rápida transmisión por el mundo generó una pandemia de gran impacto sanitario y económico. Su diagnóstico temprano y las medidas restrictivas de aislamiento permitieron limitar y controlar la diseminación regional, hasta el rápido desarrollo de vacunas eficaces que permitieron disminuir la gravedad de las infecciones respiratorias agudas (IRA). La secuenciación del genoma viral fue importante para el desarrollo de métodos diagnósticos moleculares sensibles y específicos, y para conocer su epidemiología molecular en tiempo real y evolución en el tiempo, así como detectar tempranamente mutaciones que pudieran afectar los métodos diagnósticos.

Esta tesis se centra en la descripción de la epidemiología clásica y molecular del SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII de la provincia de Buenos Aires, Argentina, durante los dos primeros años de pandemia (marzo 2020 -diciembre 2021). Los principales objetivos fueron realizar la detección viral por RT-qPCR en pacientes con IRA para describir la frecuencia de SARS-CoV-2, y obtener secuencias del genoma viral completo o parcial del gen que codifica la proteína espícula, para conocer la diversidad viral y su dinámica en nuestra región mediante análisis de filogenia identificando linajes y variantes virales. Se analizaron muestras respiratorias obtenidas de 120421 pacientes con IRA, mediante extracción del ARN viral y posterior RT-qPCR. Los resultados se informaron al sistema Nacional SISA. La frecuencia de positividad de SARS-CoV-2 durante 2020 fue 37,4%, significativamente superior al 31,9% durante 2021 ( $p < 0,001$ ). Determinamos un aumento exponencial de casos positivos durante 2020 con pico en la SE37 (primera ola) seguido de un amesetamiento y disminución hacia la SE50; un rebrote de verano con pico de casos positivos en la SE2 de 2021 que descendió hacia la SE13; una segunda ola con pico en la SE20; y finalmente, un nuevo incremento de la positividad viral las últimas dos semanas de 2021. La mayoría de las muestras provenían de residentes de nuestra región, especialmente de General Pueyrredón (Mar del Plata); las muestras de viajeros representaron el 19% y 29% durante 2020 y 2021, respectivamente. Las muestras estudiadas y positivas para SARS-CoV-2 provenían mayoritariamente de adultos masculinos de 45-65 años.

Se secuenciaron 22 muestras positivas del 2020 y detectamos por análisis de filogenia 4 linajes de SARS-CoV-2: B.1.1.33 y N.3 en la SE27, luego B.1.499 que fue el predominante, y a fin de año N.5. Durante 2021 se secuenciaron 235 genomas completos y 114 regiones parciales de espícula; detectamos 5 variantes de interés epidemiológico: las VOC Alpha, Gamma, Delta y Épsilon, y la VOI Lambda; Lambda y Gamma predominaron hasta el ingreso de Delta.

Los resultados de esta tesis fueron fundamentales para conocer la frecuencia de SARS-CoV-2 y determinar los linajes y variantes que fueron ingresando y se diseminaron durante los dos primeros años de pandemia en la Región Sanitaria VIII. Ayudaron a la toma de decisiones de salud pública y contribuyeron al control de la transmisión, a partir de la colaboración de grupos multidisciplinarios de los Ministerios de Salud y Ciencia, Tecnología e Innovación Argentinos.

*Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, variantes, alineamiento de secuencias, Región Sanitaria VIII*

## Molecular epidemiology of coronavirus SARS-CoV-2 in Mar del Plata and surrounding areas.

### Summary.

The emergence of the SARS-CoV-2 coronavirus at the end of 2019 in China, along with its rapid transmission worldwide, resulted in a pandemic with significant health and economic consequences. Early diagnosis and strict isolation measures helped limit and control regional spread. Additionally, the development of effective vaccines reduced the severity of acute respiratory infections (ARI). The sequencing of viral genome played a crucial role in creating sensitive and specific molecular diagnostic methods, as well as understanding the real-time molecular epidemiology and evolutionary changes of the virus. It also facilitated the early detection of mutations that could impact diagnostic methods.

This thesis focuses on describing the classical and molecular epidemiology of SARS-CoV-2 in the VIII Health Region of Buenos Aires, Argentina, during the first two years of the pandemic (March 2020 to December 2021). The main objectives were to detect the presence of the virus using RT-qPCR in patients with ARI, determine the frequency of SARS-CoV-2, and obtain sequences of the complete or partial viral genome, specifically the gene encoding the spike protein. These sequences were analyzed to assess viral diversity and dynamics in our region through phylogenetic analysis, allowing the identification of lineages and variants.

Respiratory samples obtained from 120,421 patients with ARI were subjected to viral RNA extraction and subsequent RT-qPCR analysis. The results were reported to the National SISA system. The frequency of SARS-CoV-2 positivity in 2020 was 37.4%, significantly higher than the 31.9% recorded in 2021 ( $p < 0.001$ ). Positive cases experienced an exponential increase during 2020, peaking in EW37 (first wave), followed by a plateau and subsequent decrease towards EW50. There was a summer outbreak with a peak in positive cases during EW2 of 2021, which decreased towards EW13. This was followed by a second wave with a peak in EW20, and finally, a new increase in viral positivity in the last two weeks of 2021. Most of the samples were from residents of our region, particularly from General Pueyrredón (Mar del Plata). Traveler samples accounted for 19% and 29% of the total in 2020 and 2021, respectively. Samples tested and positive for SARS-CoV-2 mainly came from adult males aged 45-65 years.

Twenty-two positive samples from 2020 were sequenced, and phylogenetic analysis identified four SARS-CoV-2 lineages: B.1.1.33 and N.3 in EW27, followed by B.1.499 as the predominant lineage, and finally N.5 towards the end of the year. In 2021, a total of 235 complete genomes and 114 partial spike regions were sequenced. Five variants of epidemiological interest were detected: the VOC Alpha, Gamma, Delta, and Epsilon, as well as the VOI Lambda. Lambda and Gamma were predominant until the emergence of the Delta variant.

The results of this thesis were crucial in determining the frequency of SARS-CoV-2 and understanding the lineages and variants that entered and spread within the VIII Health Region during the first two years of the pandemic. They contributed to public health decision-making and facilitated the control of transmission through collaboration between multidisciplinary groups from the Argentine Ministries of Health and Science, Technology, and Innovation.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, variants, sequence alignment, Health Region VIII

## Contenido

Agradecimientos.....	ii
Trabajos presentados a Congresos relacionados con la Tesis “Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas” .....	iii
Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas. Resumen. .	iv
Molecular epidemiology of coronavirus SARS-CoV-2 in Mar del Plata and surrounding areas. Summary.	vi
Abreviaturas.....	1
1. Introducción .....	4
1.1 Infecciones respiratorias virales .....	4
1.1.1 Impacto y epidemiología de las infecciones respiratorias virales .....	4
1.1.2 Virus respiratorios .....	5
1.1.3 Las Pandemias de virus respiratorios.....	7
1.1.4 Diagnóstico de Infecciones Respiratorias Virales.....	8
1.2 Coronavirus humanos.....	10
1.2.1 Generalidades, estructura, clasificación .....	10
1.2.2 Estructura .....	11
1.2.3 Clasificación .....	13
1.2.4 Coronavirus clásicos HKU1, NL63, OC43 y 229E .....	14
1.2.5 SARS-CoV .....	15
1.2.6 MERS-CoV .....	16
1.2.7 Zoonosis y el origen zoonótico de los coronavirus humanos.....	17
1.3 SARS-CoV-2.....	20
1.3.1 Origen de la pandemia .....	20
1.3.2 Clasificación del SARS-CoV-2 .....	21
1.3.3 Genoma y estructura del SARS-CoV-2 .....	22
1.3.4 Patogenia y respuesta inmune del SARS-CoV-2 .....	23
1.3.5 Características clínicas de la COVID-19 .....	26
1.3.6 Diagnóstico del SARS-CoV-2 .....	28
1.3.7 Epidemiología del SARS-CoV-2 .....	31
1.3.8 Epidemiología Molecular del SARS-CoV-2. ....	34
1.3.9 Estrategias para la contención de la pandemia por SARS-CoV-2 .....	42
1.4 Genética y evolución viral.....	48
1.4.1 Herramientas para el estudio de la epidemiología molecular .....	49
2. Hipótesis y Objetivos .....	53
2.1 Hipótesis de trabajo .....	53
2.2 Objetivos generales .....	53

2.3	Objetivos específicos .....	53
3.	Materiales y métodos.....	54
3.1	Diseño y población de estudio.....	54
3.2	Criterios de inclusión y exclusión.....	54
3.2.1	Criterios de inclusión .....	54
3.2.2	Criterios de exclusión .....	54
3.3	Diagnóstico de SARS-CoV-2 .....	55
3.3.1	Muestras respiratorias.....	55
3.3.2	Extracción de material genético viral.....	55
3.3.3	RT-PCR para detección de virus SARS-CoV-2 .....	55
3.4	Secuenciación y procesamiento bioinformático de secuencias de SARS-CoV-2 .....	56
3.4.1	Selección de muestras para obtención de genomas por secuenciación .....	56
3.4.2	Secuenciación de SARS-CoV-2 .....	57
3.4.3	Visualización y edición de secuencias genómicas de SARS-CoV-2 .....	57
3.4.4	Clasificación de secuencias genómicas de SARS-CoV-2 .....	57
3.4.5	Análisis de filogenia de SARS-CoV-2 .....	58
3.5	Análisis de datos clínico-epidemiológicos.....	58
3.5.1	Registro de variables y obtención de datos .....	58
3.5.2	Análisis de datos .....	59
4.	Resultados.....	60
4.1	Epidemiología de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, Prov. De Buenos Aires.....	60
4.2	Epidemiología molecular de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, 2020-2021 .....	66
4.2.1	Secuencias genómicas estudiadas .....	66
4.2.2	Procesamiento informático .....	67
4.2.3	Caracterización de linajes y variantes de SARS-CoV-2 durante 2020.....	70
4.2.4	Caracterización de linajes y variantes de SARS-CoV-2 durante 2021 .....	72
4.2.5	Distribución de linajes y variantes de SARS-CoV-2 por rango etario y sexo .....	79
4.2.6	Distribución regional de las muestras secuenciadas por localidad .....	79
5.	Discusión .....	81
6.	Conclusiones .....	93
7.	Referencias bibliográficas.....	94
8.	Anexo .....	116
8.1	Anexo 1. Aprobación del proyecto por el Comité de Ética Institucional.....	116
8.2	Anexo 2. Listado de secuencias de la región parcial del gen S con los linajes asignados según las posiciones marcadoras (mutaciones), Región Sanitaria VIII.....	119
8.3	Anexo 3. Detalle del árbol filogenético con las secuencias de SARS-CoV-2 de muestras de la Región Sanitaria VIII, comparado con secuencias de genoma completo de referencia de cada linaje.	





## Abreviaturas

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2

AdV: Adenovirus

ANLIS: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud.

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

BIV: Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud, Argentina

BoV: Bocavirus

CFR: índice de fatalidad por caso

CoV: Coronavirus

COVID-19: Enfermedad por Coronavirus SARS-CoV-2 (del inglés: *Coronavirus disease 2019*)

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas dirigidas al ARN. (Del inglés: *RNA-targeting clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

Ct: Umbral de Ciclo (del inglés: *Cycle Threshold*)

EE. UU.: Estados Unidos

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FCS: sitio de escisión de furina (del inglés: *Furine cleavage site*)

FluA: Influenza A

FluB: Influenza B

HCoV: Coronavirus Humano (del inglés: *Human Corona Virus*)

ICTV: (del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IF: Inmunofluorescencia

INE J. H. Jara –ANLIS: Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan Héctor Jara-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

IRA: infecciones respiratorias agudas

IRAB: infecciones respiratorias agudas bajas

KDa: KiloDalton

LAMP: amplificación isotérmica mediada por asa o bucle (del inglés: *Loop-mediated isothermal amplification*)

MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (del inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)

MPV: metapneumovirus

Nsp: proteína no estructural (del inglés: *Non-structural protein*)

OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud (del inglés: *World Health Organization*)

Orf: marco de lectura abierto (del inglés: *Open reading Frame*)

PIV: Parainfluenza

qPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa (del inglés: *Quantitative Polymerase chain reaction*)

RBD: dominio de unión al receptor (del inglés: *Receptor Binding Domain*)

RdRP: ARN-polimerasa dependiente de ARN

RT-qPCR: Retrotranscripción seguida de Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés: *Retro transcriptase quantitative Polymerase chain reaction*)

RV: Rinovirus

S2: Proteína S dominio 2

SARS: síndrome respiratorio agudo severo (del inglés: *Severe acute respiratory syndrome*)

SARS-CoV: Coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*)

SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome respiratorio agudo grave (del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)

SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda.

SE: Semana Epidemiológica

UTR: Región no traducida (del inglés: *Untranslated Region*)

VOC: Variantes de preocupación (del inglés: *variants of concern*)

VOI: Variantes de interés (del inglés *variants of interest*)

VSR: Virus Sincial Respiratorio

# 1. Introducción

## 1.1 Infecciones respiratorias virales

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una de las primeras causas de morbi-mortalidad en los seres humanos en todo el mundo (Girard et al., 2005), (Ferkol & Schraufnagel, 2014). Las IRA se clasifican en altas o bajas según afecten al tracto respiratorio superior o inferior, respectivamente. Las IRA altas afectan órganos ubicados por encima de la laringe y los cuadros clínicos pueden ser rinitis, laringitis supraglótica, faringitis, sinusitis y otitis. Las IRA bajas (IRAB) afectan los órganos ubicados por debajo de la laringe y los cuadros son: laringitis subglótica, laringotraqueobronquitis, traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y neumonía. Las IRAB constituyen la mayor causa de hospitalización en edades extremas de la vida, una de las causas más frecuentes de mortalidad en menores de 5 años en países en vías de desarrollo, además, en Argentina, son la tercera causa de muerte en niños menores de un año (Carballal, 2015). La etiología de las IRA puede ser viral, bacteriana, por micoplasmas, clamidias, rickettsias, hongos y parásitos. Sin embargo, las causas más frecuentes son los virus y las bacterias (Di Simone et al., 2023). Entre los virus respiratorios más frecuentes podemos nombrar a los rinovirus (RV), virus sincicial respiratorio (VSR), influenza (Flu), parainfluenza (PIV), coronavirus (CoV), adenovirus (AdV) y metapneumovirus (MPV). Se debe diferenciar a estos virus respiratorios propiamente dichos, de otros que también emplean el tracto respiratorio como puerta de entrada y replican en su mucosa y tejido linfoide pero no quedan allí localizados, sino que se diseminan por viremia a otros órganos para causar otras patologías como los virus de rubéola, sarampión, parotiditis, etc. (Gwaltney, 2002), (Carballal, 2015)

A pesar de los grandes esfuerzos en salud pública, las infecciones virales del tracto respiratorio siguen siendo muy frecuentes en las poblaciones humanas de todo el mundo, produciendo cuadros de variada gravedad e incluso con consecuencias letales.

### 1.1.1 Impacto y epidemiología de las infecciones respiratorias virales

Los individuos con mayor riesgo de padecer IRAB grave de origen viral son aquellos en edades extremas de la vida: niños pequeños y adultos mayores, pacientes con enfermedades crónicas e inmunosuprimidos (Jackson et al., 2013).

Las IRA tienen altos costos directos e indirectos para las familias, los servicios de salud y la comunidad en general.

Los virus respiratorios pueden producir cuadros clínicos similares, por ello es importante realizar el diagnóstico de certeza y conocer el agente causal, para conocer la epidemiología viral respiratoria en las distintas regiones y su estacionalidad (Carballal, 2015). El diagnóstico rápido y específico de las IRA de origen viral contribuye a un mejor manejo del paciente, la contención en la propagación de estos virus y una mejor descripción de la epidemiología de estas infecciones (Gwaltney, 2002). Las infecciones respiratorias, ya sean agudas o crónicas, son extremadamente frecuentes tanto en adultos como en niños, lo que representa una mayor carga económica para los sistemas de salud, morbilidad y mortalidad (Niederman & Torres, 2022). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones respiratorias son la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2020, causaron 4,1 millones de muertes, lo que representa el 12% de todas las muertes.

En Argentina se realiza la vigilancia epidemiológica de los virus respiratorios que causan IRA, y los datos que incluyen la frecuencia de acuerdo a los rangos etarios y estacionalidad se encuentran disponibles en el boletín de vigilancia de influenza y otros virus respiratorios en la página web del Ministerio de Salud {Boletín Integrado de Vigilancia} (*Recursos Relacionados a La Problemática | Banco de Recursos de Comunicación Del Ministerio de Salud de La Nación*, n.d.). En nuestro país, los brotes de la mayoría de los virus respiratorios se producen en otoño e invierno, mientras que virus como RV y AdV pueden detectarse durante todos los meses del año (Marcone et al., 2013a).

Respecto a la gravedad de las enfermedades virales respiratorias, la misma es el resultado de la interacción de factores del huésped y del virus. Se han descripto varios factores que pueden predisponer a la mayor gravedad del cuadro, entre los cuales se incluyen la presencia de enfermedades crónicas subyacentes tales como enfermedades respiratorias crónicas, diabetes, enfermedad hepática crónica, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, inmunodeficiencia primaria o secundaria, edades extremas de la vida, el embarazo, presencia de variantes virales más patógenas, emergencia de un virus pandémico, etc. (Tregoning & Schwarze, 2010).

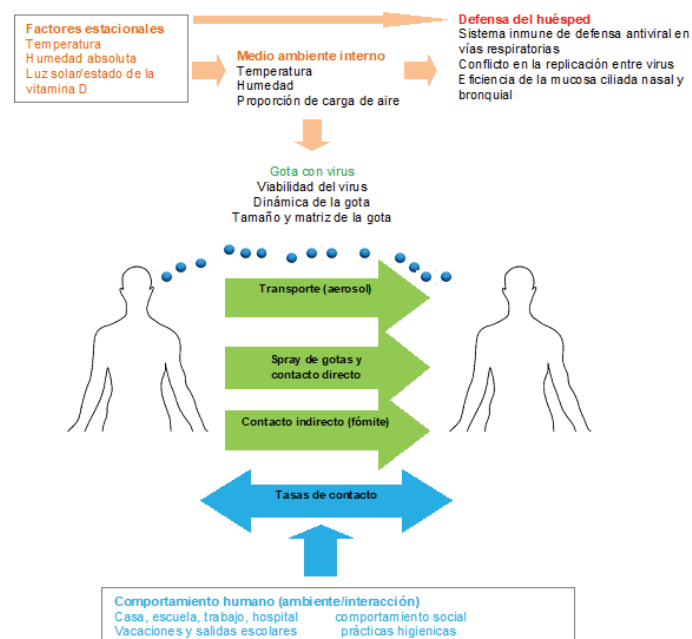
### 1.1.2 Virus respiratorios

Los virus que pueden producir IRA y son conocidos desde hace muchos años son: RV, RSV, AdV, influenza A y B (FluA y FluB), PIV, los coronavirus clásicos CoV-NL63, HKU1, OC43, 229E, MPV (Carballal, 2015). Los virus respiratorios emergentes en los últimos años han sido el virus pandémico de influenza A (H1N1) pdm09 en 2009 y los coronavirus del síndrome agudo

respiratorio severo (SARS-CoV) en 2002, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012, y el coronavirus del síndrome agudo respiratorio severo 2 (SARS-CoV-2) en 2019.

Este grupo de virus respiratorios comprende virus con diferentes estructuras, incluyendo virus desnudos como los RV y envueltos, con genoma ARN como RV, RSV e Influenza o genoma ADN como AdV, con genoma lineal simple cadena como RSV o RV, o con el genoma fragmentado como Flu (Carballal, 2015).

Todos estos virus respiratorios tienen como puerta de entrada la mucosa respiratoria, replican en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior y pueden producir cuadros respiratorios de diferente gravedad (**Figura I1**). Algunos virus se eliminan de las células por lisis celular y otros por brotación. Se transmiten de persona a persona. La vía de eliminación es respiratoria y el principal mecanismo de transmisión es directo, mediante inhalación de aerosoles y gotas de *Flügge*; sin embargo, algunos también pueden transmitirse por manos contaminadas o fómites (indirecta) (Sato & Kiyono, 2012).



**Figura I1.** Las infecciones respiratorias virales son el resultado de múltiples factores. Los factores ambientales afectan la susceptibilidad del huésped al modular los mecanismos de defensa de las vías respiratorias y afectan la viabilidad y transmisión de los virus respiratorios. Los patrones de comportamiento humano afectan las tasas de contacto entre las personas infectadas. Entre los posibles impulsores de la estacionalidad, la fluctuación de la temperatura y la humedad absoluta a lo largo del año se ha propuesto como un factor crítico en el aumento estacional de las infecciones por virus respiratorios, especialmente en el contexto de las epidemias en la temporada de invierno (Moriyama et al., 2020).

Estas infecciones presentan un período de incubación corto, de 1 a 4 días. Debido a que la inmunidad contra estos virus no es completa o es de corta duración, sumado a la alta variabilidad genética que poseen muchos de los virus antes mencionados, todo esto contribuye a que las reinfecciones sean frecuentes (Carballal, 2015). Como complicación de los cuadros puede ocurrir sobreinfección bacteriana.

Los virus respiratorios tienen una distribución global y las infecciones ocurren en todos los grupos etarios. La frecuencia de su detección difiere ampliamente según la edad de los pacientes y la época del año, siendo más prevalentes durante los meses invernales (Fisman, 2012). Para muchos de estos virus no hay vacunación disponible o están en desarrollo, por lo tanto, entre las medidas propuestas para evitar la propagación se recomienda la vacunación cuando en caso de estar disponible (Flu y SARS-CoV-2), y ante una infección tomar medidas como toser o estornudar en pliegue del codo, distancia social, uso correcto del barbijo, ventilación de ambientes y lavado correcto y frecuente de manos. Además, se ha desarrollado recientemente la vacuna contra el virus sincicial respiratorio, y se encuentra en desarrollo una vacuna contra los rinovirus. La mayor dificultad para desarrollar vacunas para estos patógenos reside en la gran variabilidad que tienen estos virus (Chu & Quan, 2023).

### 1.1.3 Las Pandemias de virus respiratorios.

Es importante destacar que los virus respiratorios pueden circular anualmente, otros causar epidemias anuales e incluso pandemias. Desde 1918, los virus de la influenza A han causado cuatro pandemias. La primera y más grave pandemia de la historia reciente, conocida como "gripe española", ocurrió en 1918 y fue causada por una cepa del virus de la influenza A (H1N1). Aproximadamente 500 millones de personas se infectaron y entre 20-50 millones de personas murieron durante esta pandemia (Kuszewski & Brydak, 2000). La segunda pandemia, conocida como "influenza asiática", ocurrió en 1957, fue causada por una cepa de FluA (H2N2) y provocó ~1,1 millones de muertes en todo el mundo (Glezen, 1996) . La tercera pandemia, conocida como "gripe de Hong Kong", ocurrió en 1968 y fue causada por una cepa de FluA (H3N2), lo que resultó en ~1 millón de muertes en todo el mundo (Viboud et al., 2005). La cuarta pandemia fue causada por el virus de FluA (H1N1) pdm09, también conocido como el "nuevo virus de la influenza A", y resultó en 1 678 817 casos confirmados y 19 274 muertes en todo el mundo (Garten et al., 2009), (Shieh et al., 2010). Desde entonces, este virus continúa circulando, generando cuadros clínicos compatibles con otros resfríos estacionales.



En noviembre de 2002, años antes de la cuarta pandemia de FluA, se produjo una epidemia causada por un coronavirus “SARS-CoV”, cuya enfermedad fue conocida como síndrome respiratorio agudo severo (SARS), que comenzó en el sur de China y se extendió a 29 países (Se acaba la emergencia por la pandemia, pero el COVID continua | Noticias ONU, 2023). El brote de SARS-CoV causó ~8000 infecciones y 774 muertes antes de que se contuviera en julio de 2003, con una tasa de letalidad de 9,6 % (la tasa de fatalidad fue de ~50 % entre los pacientes de 65 años o más). Sin embargo, desde 2004, no se ha informado ningún caso de SARS-CoV en ninguna parte del mundo (Ye et al., 2020). En septiembre de 2012, Arabia Saudita informó el primer caso del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), que fue causado por otro tipo de *Betacoronavirus*: “MERS-CoV”. MERS-CoV se propagó a 27 países y causó 2519 infecciones y 866 muertes hasta enero de 2020, con una fatalidad de 34,4 % (Zumla et al., 2015). Por último, en diciembre de 2019, se detectaron por primera vez en Wuhan, China, casos de la nueva enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por un nuevo *Betacoronavirus*: “SARS-CoV-2”. Estos casos se caracterizaron por presentar síntomas respiratorios que incluían fiebre, tos seca, escalofríos, dificultad para respirar y dolor muscular, y podían evolucionar a neumonía. La pandemia de SARS-CoV-2 se propagó rápidamente en todo el mundo, y a la fecha (24 de abril de 2023) se registran 763 740 140 casos confirmados y 6 908 554 muertes confirmadas por COVID-19 (Heikkinen et al., 2002), (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>).

#### 1.1.4 Diagnóstico de Infecciones Respiratorias Virales

Para realizar la detección adecuada de un virus respiratorio, es importante tanto el método diagnóstico a utilizar como la toma de la muestra respiratoria que se va a estudiar (Heikkinen et al., 2002). Las IRA virales son infecciones agudas y autolimitadas que cursan con alto título de virus en las secreciones respiratorias en los primeros días del inicio del cuadro clínico, y luego va disminuyendo hasta que el individuo logra eliminar el virus del organismo. Por lo tanto, es importante para un diagnóstico de certeza una correcta toma de muestra de secreciones respiratorias por personal con entrenamiento, utilizando el equipo de bioseguridad adecuado, y en el momento correcto: dentro de los 4 o 5 días a partir del inicio de los síntomas (Carballal, 2015)(“*Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing*”) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>).

Los métodos diagnósticos utilizados para detectar virus respiratorios pueden ser directos o indirectos, de acuerdo a si detectan alguna estructura viral, como su genoma o proteínas virales, o si detectan los anticuerpos que se generan en respuesta a la infección, respectivamente (Carballal, 2015). Entre los directos, la técnica reconocida clásicamente como patrón es el aislamiento en cultivo celular, con la visualización de la acción citopática seguida por la identificación de antígenos virales utilizando anticuerpos monoclonales marcados por inmunofluorescencia (IF), hemaglutinación, hemadsorción o detección de genoma viral por técnicas moleculares. Entre los métodos directos rápidos podemos encontrar técnicas que detectan antígenos virales por inmunofluorescencia, ELISA, inmunocromatografía. Desde hace años se considera método patrón también a la detección de los ácidos nucleicos que conforman el genoma viral, mediante la amplificación de una región por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que puede realizarse en forma convencional con detección del producto amplificado en un gel de agarosa, conocida como PCR de punto final, o utilizar sondas marcadas fluorescentes que permiten la detección de los productos durante el avance de la reacción en termocicladores que emiten y detectan fluorescencia, conocida como PCR en tiempo real. En el caso de los virus ARN, debe realizarse un paso de transcripción reversa previamente a la reacción de PCR, lo que se conoce como RT-PCR (H. Zhu et al., 2020). Actualmente existe un mayor número de técnicas que permiten la detección de los genomas virales, incluyendo la amplificación mediada por bucle (LAMP) que puede visualizarse colorimétricamente, amplificación por recombinasa (RPA), por helicasa (HDA) o la detección por CRISPR que puede visualizarse por fluorescencia o difusión en flujo lateral en una tira reactiva.

El empleo de las técnicas moleculares ha abierto una nueva era en el diagnóstico, permitiendo identificar virus de manera muy sensible y específica, incluyendo la detección de virus respiratorios para los cuales no existen métodos rápidos o no son cultivables (como los rinovirus), e incluso detectar un mayor número de coinfecciones virales (Mahony et al., 2011). Cabe destacar que la RT-qPCR se estableció como el método de referencia para el diagnóstico del virus pandémico SARS-CoV-2, desde su emergencia.

Para el diagnóstico de los virus respiratorios se han desarrollado sistemas automatizados basados en la amplificación y detección en tiempo real de los ácidos nucleicos. Pueden detectar un único virus o varios de ellos, constituyendo PCR múltiples (CDC, 2020), (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex.html>). Algunos incluso permiten

realizar en un único paso la extracción del material genético viral, la amplificación y la detección de más de 20 patógenos respiratorios en solo 1 hora y media, como el panel de virus respiratorios de FilmArray®.

Otros equipos son una herramienta extremadamente útil en escenarios en los que es necesario evaluar varias muestras a la vez. Actualmente, hay varios sistemas disponibles para la detección sensible de alto rendimiento de ácidos nucleicos, entre los que se incluyen los sistemas FilmArray (BioFire) (de BioMérieux, MARCY L'ETOILE Francia), Verigene System (de Luminex de DiaSorin company, ia Crescentino SNC, 13040 Saluggia), Gen-Probe (San Diego, California, United States, Prodesse Foster City, California, EE.UU.) y Cepheid (Sunnyvale, California, EE.UU) (Ruggiero et al., 2014), (Van Wesenbeeck et al., 2013).

Entre los métodos indirectos se utilizan técnicas que permitan la detección de los anticuerpos específicos, como por ejemplo ELISA (Grandien, 1996). Sin embargo, en el caso de los virus respiratorios, la utilidad de los métodos indirectos se limita a su uso en trabajos de epidemiología que permitan conocer si una población estuvo en contacto con determinado virus, dado que la aparición de los anticuerpos demora unos días desde el inicio de la infección, y esto hace que no sean las técnicas más adecuadas para hacer diagnóstico de infecciones agudas (Carballal, 2015).

## 1.2 Coronavirus humanos

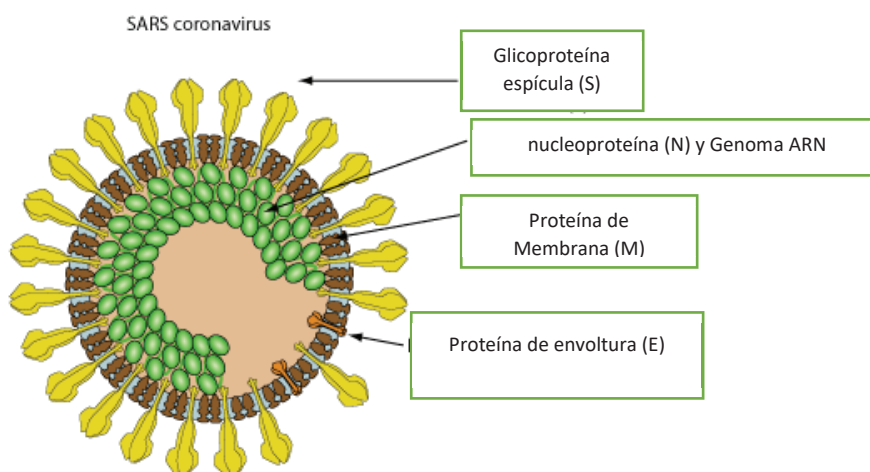
### 1.2.1 Generalidades, estructura, clasificación

Los coronavirus son virus envueltos que poseen un genoma ARN simple cadena, y tienen la capacidad de infectar diferentes hospedadores vertebrados, incluyendo humanos, otros mamíferos y aves, causando infecciones agudas o persistentes. Los miembros de esta familia fueron aislados en la década de 1930 como los agentes causantes de bronquitis en pollos, gastroenteritis transmisibles en cerdos, y hepatitis severa y enfermedades neurológicas en ratones (Pugliese et al., 2007) (Firth et al., 2011); (Sun et al., 2009). Sin embargo, en la década de 1960 también se reconocieron como agentes productores de infecciones respiratorias en humanos (Cancel-Tirado et al., 2004), (Z. Chen et al., 1997). En ese momento, la microscopía electrónica reveló que la característica estructural más notable y distinguida era una franja de espacios muy separados con picos en forma de maza que se proyectaban desde la superficie del virión y, además, que estos picos eran morfológicamente distintos de las proyecciones de superficie de los *Orthomixovirus* y *Paramixovirus*. Este halo de picos o púas le otorgaba a la partícula viral la forma de una corona solar, lo que llevó a los investigadores a nombrar a este

gran grupo de virus como “coronavirus”. Durante los siguientes 40 años, los coronavirus se estudiaron, principalmente, porque causaban enfermedades respiratorias y gastrointestinales en animales domésticos, y porque proporcionaban modelos únicos para el estudio de la patogénesis viral. En los humanos, se sabía que los coronavirus eran responsables de una fracción sustancial de los resfriados comunes, en particular durante los meses de invierno (Heikkinen & Järvinen, 2003).

### 1.2.2 Estructura

Los coronavirus son virus esféricos, de aproximadamente 120 nm de diámetro, tienen una envoltura con una franja prominente de proyecciones superficiales (puntas o espículas) en forma de pétalo de 20 nm de largo, compuestas de una glicoproteína de tipo I fuertemente glicosilada, denominada proteína de punta o espícula (S, del inglés *Spike*), como se muestra en la **Figura 12**.



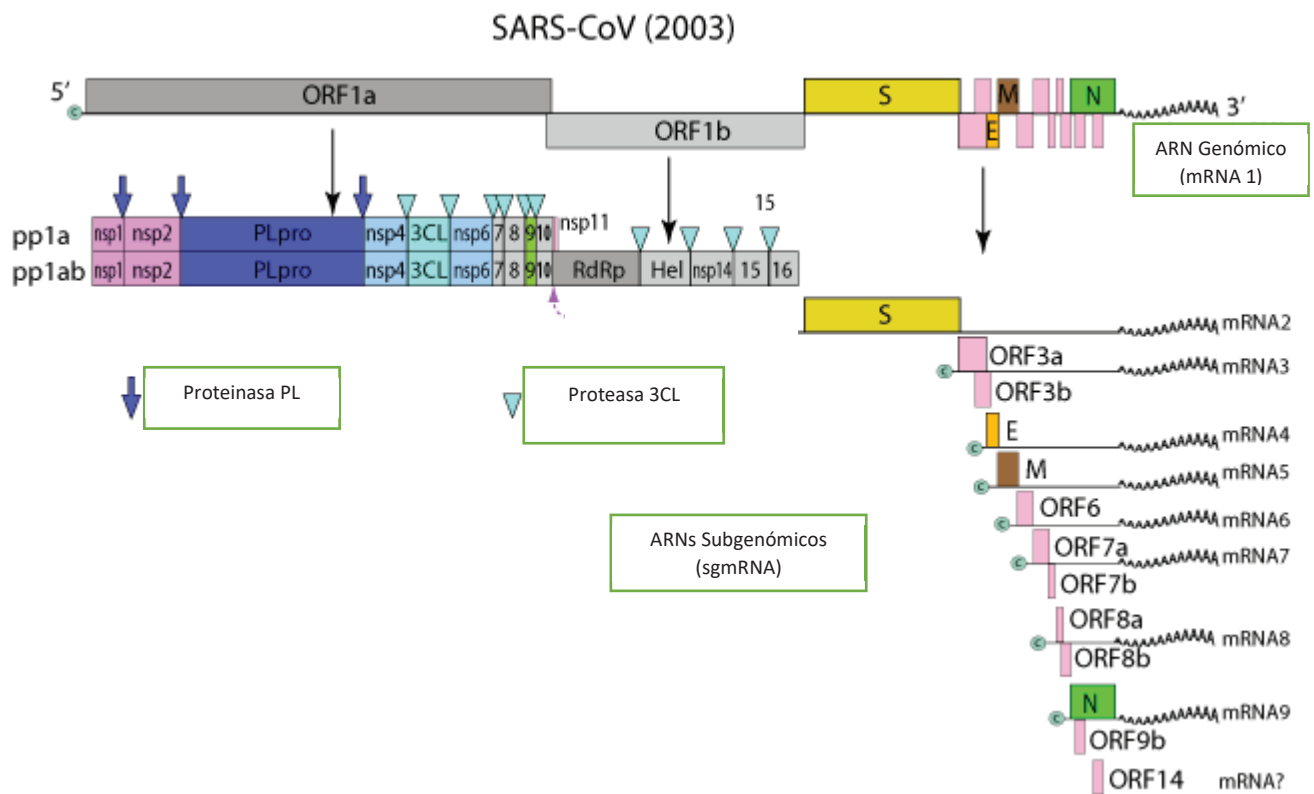
**Figura 12.** Estructura de los coronavirus (adaptado de ViralZone, Expaty).

Un subconjunto de los coronavirus tiene una capa adicional de puntas cortas que consisten en proteínas hemaglutinina-esterasa (HE), también una glicoproteína tipo I (Caul & Egglestone, 1977); (Dea & Tijssen, 1988). Tanto los picos grandes como los pequeños están anclados en la envoltura, que es una bicapa lipídica. La envoltura está asociada, además de las proteínas S y HE, con una proteína de membrana integral (M) más pequeña, que abarca tres veces la envoltura y una proteína aún más pequeña, la proteína de la cubierta (E) o membrana pequeña (sM), que es una proteína de membrana integral de la cubierta viral. Dentro de la envoltura hay un núcleo de ribonucleoproteína (RNP), que comprende el genoma de ARN y

una sola especie de proteína de la nucleocápside (N). La observación con microscopio electrónico de la RNP viral mostró una hélice larga de 14 a 16 nm (Tyrrell et al., 1978); (Lai & Cavanagh, 1997).

El tamaño del genoma de los coronavirus es de unos 30000 nt aproximadamente, y varía de 27317 nt para HCoV-229E a 31357 nt para MHV-A59, lo que los establece como los virus de ARN más grandes conocidos (Enjuanes et al., 2001); (Lai & Cavanagh, 1997).

Se pueden observar las siguientes similitudes en la estructura del genoma entre los integrantes de la familia coronavirus (**Figura 13**): **1.** Las 5'UTR, que varían en longitud de 209 a 528 nt, contienen un marco de lectura abierto (ORF) corto, iniciado por AUG. **2.** Las 3'UTR varían de 288 a 506 nt; todas poseen una secuencia octámera de GGAAGAGC que comienza en la base 73 a 80 aguas arriba de la cola poli(A), y todos poseen una cola poli(A) en el extremo 3' terminal. **3.** Todos tienen un gen 1 (ORF 1) extremadamente grande (separado en ORF 1a y 1b y que se extiende por aproximadamente dos tercios del genoma) que codifica proteínas no estructurales involucradas en el procesamiento proteolítico de los productos de poliproteína del gen 1, la replicación del genoma del virus y la síntesis de ARN subgenómicos (sgmRNA) (transcripción). En cada uno, el gen 1 se traduce como ORF 1a y 1ab, con 1ab como resultado de un evento de cambio de marco ribosómico 1 inducido por una estructura de ARN que afecta la forma en que el ribosoma lee la secuencia (pseudonudo) en una secuencia resbaladiza de UUUAAAC en la unión ORF 1a/1b, (de Vries et al., 1997), (Torres Carolina et al., 2021). **4.** Todos codifican la glucoproteína de espícula (S), la proteína de envoltura pequeña (E), la glucoproteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N), en ese orden, 5'-3', dentro del tercio proximal 3' del genoma.



**Figura 13.** Estructura del genoma de los coronavirus (adaptado de ViralZone, Expaty).

El genoma también posee un número variable de otros ORF que parecen ser específicos de virus o grupos, muchos de los cuales codifican proteínas no estructurales. Estos (y sus productos potenciales) incluyen: ORF 3a (proteína de 7,7 kDa), ORF 3b (proteína de 27,7 kDa) y ORF 7 [proteína hidrófoba (HP) de 0,7 kDa] en TGEV; ORF 3 (proteína de 25,3 kDa) en PEDV; ORF 4a (proteína de 15,3 kDa) y ORF 4b (proteína de 10,2 kDa) en HCoV-229E; ORF 2a (proteína de 32 kDa), ORF 2b [proteína hemaglutinina esterasa (HE) truncada de 65 kDa o 34,6 kDa, según la cepa], ORF 4 (proteína de 17,8 kDa), ORF 5a (proteína de 13,1 kDa) , y un ORF interno al gen 7 [proteína interna (I) de 23 kDa] en MHV; ORF 2a (proteína de 32 kDa), ORF 2b (proteína HE de 65 kDa), ORF 4a (proteína de 4,9 kDa), ORF 4b (proteína de 4,8 kDa), ORF 5 (proteína de 12,7 kDa) y un ORF interno al gen 7 (proteína I de 23 kDa) en BCoV; y ORF 3a (proteína de 6,7 kDa), ORF 3b (proteína de 7,4 kDa), ORF 5a (proteína de 7,5 kDa) y ORF 5b (proteína de 9,5 kDa) en IBV (Brown & Brierley, 1995).

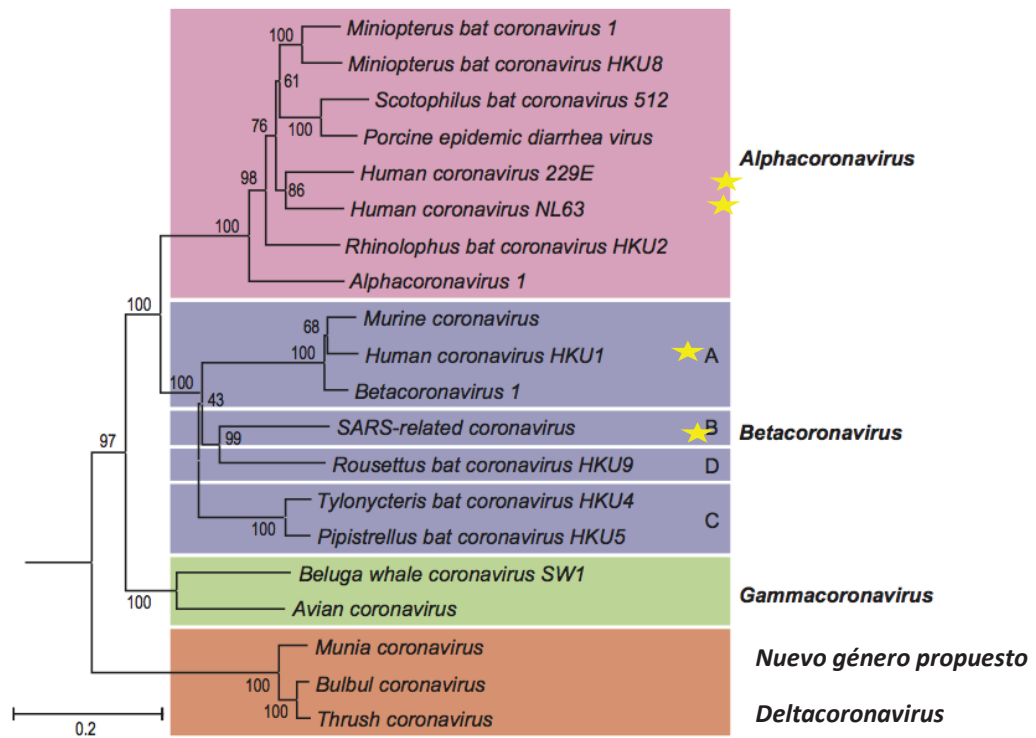
### 1.2.3 Clasificación

Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV*), en el 2021 se estableció la siguiente clasificación para los coronavirus:

*Reino Riboviria › Orthornavirae › Phylum Pisuviricota › Clase Pisoniviricetes › Orden Nidovirales, Suborden Coronidoviridae, familia Coronaviridae.* La familia *Coronaviridae* tiene 4 géneros—*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, y *Deltacoronavirus*—cada uno de los cuales ha sido subdividido en un número de subgéneros: *Pedacovirus* en el género de *Alphacoronavirus*, *Merbecovirus*, *Embecovirus*, *Nobecovirus*, y *Sarbecovirus* en el género *Betacoronavirus*, *Igacovirus* en el género *Gammacoronavirus* (de Klerk et al., 2022). El SARS-CoV-2 se ubica en el género *Betacoronavirus* (**Figura I4**).

#### 1.2.4 Coronavirus clásicos HKU1, NL63, OC43 y 229E

Los *Alfacoronavirus* HCoV-229E y HCoV-NL63, y los *Betacoronavirus* HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, generalmente causan resfriados comunes. Notablemente, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 se descubrieron recientemente, en la era post-SARS, (van der Hoek et al., 2004), (Woo et al., 2005) a pesar de que tienen una prevalencia mundial y han estado en circulación durante mucho tiempo (Pyrk et al., 2006), (van der Hoek et al., 2005). Aunque generalmente están asociados con IRA altas, estos HCoV clásicos también pueden causar infecciones del tracto respiratorio inferior y tienen consecuencias más graves en niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos. En particular, HCoV-NL63 está asociado con crup infantil (van der Hoek et al., 2005).



**Figura I4.** Arbol filogenético de distancia (“neighbor joining”) de los miembros de la subfamilia *Coronavirinae*, utilizando el alineamiento de RdRp y helicasa. El árbol muestra 4 grupos monofiléticos correspondientes a los géneros Alpha, Beta, Gamma y un nuevo género propuesto Delta; dentro de los *Betacoronavirus* se muestran los 4 linajes A-D. Se indica con una estrella aquellos que infectan a los humanos. (Adatado de ICTV).

### 1.2.5 SARS-CoV

El síndrome respiratorio agudo grave (del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) es una enfermedad respiratoria viral causada por un coronavirus, llamado coronavirus asociado al SARS (SARS-CoV). Los primeros casos de infección respiratoria grave asociados al virus emergente SARS-CoV fueron en Foshun, China, en noviembre de 2002. Para febrero de 2003, ya se habían informado más de 300 casos, con más de un tercio de ellos en trabajadores de la salud. A los pocos meses, la enfermedad se propagó en más de dos docenas de países en Norteamérica, Sudamérica, Europa y Asia (*SRAS | Información Básica Sobre El SRAS | CDC*, n.d.). Recién en abril de 2003, los esfuerzos dirigidos por la OMS permitieron identificar al SARS-CoV como el agente causante de la enfermedad. Debido a las medidas de control de infecciones implementadas, no se detectaron más casos después de julio de 2003. La pandemia terminó con 8422 casos notificados y 916 muertes en 27 países (Enserink, 2003), (W. Li et al., 2005), (Vaqué Rafart, 2005). Existen importantes evidencias de que este virus



zoonótico SARS-CoV se originó a partir de la transmisión interespecie desde el gato civeta del Himalaya (*Viverra civetta*) a los humanos, aunque existen otras especies implicadas (Vaqué Rafart, 2005).

La forma principal de transmisión de SARS-CoV fue por el contacto cercano entre las personas por las gotitas respiratorias (contagio por gotitas respiratorias) que se producían cuando una persona infectada tosía o estornudaba y a través de ductos de ventilación (propagación por aire). El virus también se podía propagar por superficies u objetos contaminado con gotitas infectadas, y luego tocar la boca, la nariz o los ojos.

La enfermedad comenzaba generalmente con fiebre alta (superior a los 38.0°C), y podía incluir dolor de cabeza, una sensación general de incomodidad y dolor en el cuerpo. Algunas personas experimentaron síntomas respiratorios leves al principio de la enfermedad, pero la mayoría de los pacientes presentó neumonía. Cerca del 10 - 20 % de los pacientes sufrieron de diarrea (Peiris et al., 2003). La tasa de letalidad fue de ~10 % (Peiris et al., 2003).

#### 1.2.6 MERS-CoV

El MERS-CoV [Coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (del inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)] se identificó por primera vez en junio de 2012, asociado a la muerte de un hombre en Arabia Saudita por neumonía aguda e insuficiencia renal. El espectro clínico de la infección por MERS-CoV varía desde ausencia de síntomas (asintomático), síntomas respiratorios leves hasta enfermedad respiratoria aguda grave y muerte. Los síntomas de la infección son comunes a otras enfermedades respiratorias: fiebre, tos, dificultad para respirar, neumonía, y puede afectar a distintos grupos etarios. Tres a cuatro de cada diez personas infectadas con MERS-CoV mueren, generalmente por edad avanzada o debido a otras enfermedades crónicas subyacentes. Todos los casos registrados hasta ahora han ocurrido en Medio Oriente o tuvieron relación con individuos que visitaron esa zona. Se han informado casos en Corea del Sur, Abu Dabi, Qatar, Líbano, Argelia, Jordania, Irán, Omán, Kuwait, Estados Emiratos Árabes, Yemen, Bangladesh, Filipinas, China, Túnez, Malasia, Tailandia, Turquía, Italia, Grecia, Francia, Austria, Reino Unido, Alemania y EE.UU (Bratanich, 2015).

A diferencia de la línea de tiempo del SARS-CoV, el MERS-CoV se aisló del esputo del caso índice, lo que demuestra la importancia de los avances en la genómica de patógenos durante los años intermedios. Hubo un grupo de casos relacionados con viajes en el Reino Unido en

septiembre de 2012 y en 2015 un brote hospitalario (nosocomial) en Corea del Sur que involucró a 16 hospitales y 186 pacientes, pero la gran mayoría de los casos se observaron en Arabia Saudita. Hasta enero de 2020, se habían notificado a la OMS un total de 2494 casos confirmados por laboratorio en 27 países, y un total de 858 muertes. (Enserink, 2003), (Mackay & Arden, 2015), con una tasa de letalidad cercana al 35-40%.

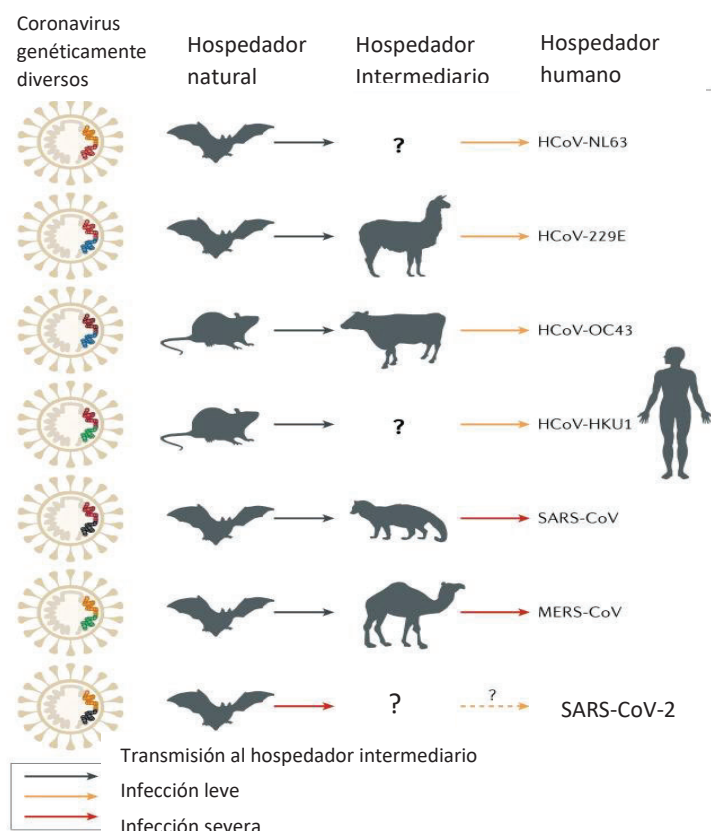
El virus tiene un probable origen zoonótico, y los estudios han demostrado que los humanos se infectan a través del contacto directo o indirecto con dromedarios infectados (Mackay & Arden, 2015). La transmisión de persona a persona es posible y ha ocurrido predominantemente entre contactos cercanos y en entornos de atención médica. Esto incluye familiares y miembros del hogar, trabajadores de la salud y otros pacientes. Los brotes más grandes han ocurrido en centros de salud en Arabia Saudita, los Emiratos Árabes Unidos y la República de Corea. Fuera del ámbito de la atención de la salud, no ha habido transmisión sostenida de persona a persona documentada en ninguna parte del mundo. Los casos de MERS-CoV aún permanecen activos, aunque solo hay transmisión limitada.

#### 1.2.7 Zoonosis y el origen zoonótico de los coronavirus humanos

Una zoonosis es una enfermedad infecciosa que ha saltado de un animal no humano a los humanos. Los patógenos zoonóticos pueden ser bacterianos, virales o parasitarios, y pueden propagarse a los humanos a través del contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente. Representan un importante problema de salud pública en todo el mundo debido a nuestra estrecha relación con los animales en la agricultura, como compañeros y en el medio natural (Ye et al., 2020). Las zoonosis también pueden causar interrupciones en la producción y el comercio de productos animales para alimentos y otros usos. Los seres humanos, los animales y el medio ambiente juegan un papel importante en la aparición y transmisión de diferentes enfermedades infecciosas (Thompson & Kutz, 2019). El informe "Estrategia de Asia Pacífico para enfermedades emergentes: 2010" estimó que alrededor del 60% de las infecciones humanas emergentes son de naturaleza zoonótica y entre estos patógenos, más del 70% se originaron en especies de vida silvestre (A. Li & Kasai, 2011). Las enfermedades de reciente aparición en humanos en las últimas décadas eran de origen animal y estaban directamente asociadas a los alimentos de origen animal (Ferkol & Schraufnagel, 2014), (Slingenbergh, 2013). Las zoonosis son un gran problema de salud pública y un peligro directo para la salud humana que puede incluso provocar la muerte.

El término “Zoonosis” se deriva de la palabra griega “Zoon”, que significa animal, y “nosos”, que significa enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cualquier enfermedad o infección que sea transmisible naturalmente de animales vertebrados a humanos o de humanos a animales se clasifica como zoonosis (<https://www.who.int/topics/zoonoses/en/> accessed on 20 July 2020) (Woolhouse et al., 2001).

Brevemente, destacamos el origen zoonótico de los coronavirus humanos. El SARS-CoV es un coronavirus que surgió a través de la recombinación de coronavirus relacionados con el SARS de murciélago (SARSr-CoV), (Hu et al., 2017) (**Figura I5**). El virus recombinante infectó civetas y humanos y se adaptó a estos huéspedes antes de causar la epidemia de SARS (Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, 2004). El MERS-CoV probablemente se propagó de los murciélagos a los camellos dromedarios hace al menos 30 años y desde entonces ha prevalecido en los camellos dromedarios, desde los cuales se transmite en ocasiones a los humanos. Para los virus HCoV-229E y HCoV-NL63, que generalmente causan infecciones leves en humanos, se han encontrado ancestros en murciélagos africanos (Huynh et al., 2012; Tao et al., 2017) y los camélidos son probablemente huéspedes intermedios de HCoV-229E. HCoV-OC43 y HKU1, que generan cuadros respiratorios leves en humanos, probablemente se originaron en roedores.



**Figura 15.** Esta figura muestra el origen zoonótico de los coronavirus que afectan a los humanos en la actualidad, y la implicancia de los animales salvajes en la transmisión y amplificación de agentes etiológicos de zoonosis emergentes y reemergentes (Rahman et al., 2020).

Las zoonosis comprenden un gran porcentaje de todas las enfermedades infecciosas recientemente identificadas, así como muchas de las existentes. Algunas enfermedades, como el VIH, comienzan como una zoonosis, pero luego mutan en cepas exclusivas para humanos. Otras zoonosis pueden causar brotes de enfermedades recurrentes, como la enfermedad por el virus del Ébola y la salmonelosis. En esta tesis abordaremos el estudio del SARS-CoV-2, el último virus zoonótico que afectó a los humanos generando una pandemia desde el 2020 y aún en la actualidad continúa en circulación en todo el mundo. El 5 de mayo de 2023 la OMS declaró el fin de la emergencia sanitaria internacional por este virus. (*Se acaba la emergencia por la pandemia, pero el COVID continua | Noticias ONU, 2023*), (<https://news.un.org/es/story/2023/05/1520732>).

### 1.3 SARS-CoV-2

El nuevo coronavirus emergente SARS-CoV-2, Coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) es responsable de la enfermedad por coronavirus 2019 denominada COVID-19, y surgió durante diciembre de 2019 en Wuhan, China. Desde esta región se diseminó y extendió hacia todos los países del mundo, y fue declarada por la OMS una emergencia de salud pública de preocupación internacional el 30 de enero de 2020, alcanzando el nivel de pandemia el 11 de marzo de 2020.

El SARS-CoV-2 es estructuralmente similar al SARS-CoV y se une mediante la proteína S a la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) en las células huésped (He et al., 2020).

El genoma de SARS-CoV-2 varias proteínas que incluyen proteínas no estructurales, estructurales y accesorias que están involucradas en la adsorción viral, entrada y desnudamiento, replicación y transcripción de ácidos nucleicos, ensamblaje y liberación (Yan et al., 2022). Las mutaciones en las distintas regiones del genoma pueden generar expresión alternativa de proteínas (Park et al., 2023). El número de proteínas expresadas por el SARS-CoV-2 puede variar en función de la variante del virus. Por ejemplo, la variante Omicron presenta una mutación en la proteína S que podría provocar la expresión de una nueva proteína accesoria.

#### 1.3.1 Origen de la pandemia

Como muchos de los primeros casos de COVID-19 estaban relacionados con el mercado de Huanan, en Wuhan, China, es posible que una fuente animal estuviera presente en este lugar (Zhou et al., 2020a), (Wu et al., 2020). La evidencia sugiere que el SARS-CoV-2 es un virus zoonótico, dado que es un virus que saltó de un animal a un humano y causa una enfermedad. Una posibilidad es que el linaje responsable de dar origen al SARS-CoV-2 ha estado circulando desapercibido durante décadas en los murciélagos. Sin embargo, los murciélagos no estaban disponibles para la venta en el mercado de Huanan; por lo tanto, este virus podría haber surgido primero en otro lugar. Sigue siendo posible que el mercado haya sido el sitio de un evento de "superpropagación", donde un individuo infectó a muchos otros (Wu et al., 2020). A pesar de todos los avances realizados, la comunidad científica internacional continúa con el estudio para describir su origen.

### 1.3.2 Clasificación del SARS-CoV-2

Los virus SARS-CoV-2 pertenecen a la familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*. Según el ICTV, en el 2021 se estableció la siguiente clasificación para SARS-CoV-2: *Reino Riboviria* › *Orthornavirae* › *Phylum Pisuviricota* › *Clase Pisoniviricetes* › *Orden Nidovirales*, *Suborden Cornidoviridae*, *familia Coronaviridae*, *subfamilia orthocoronaviridae*, *Género Betacoronavirus*, *Subgénero Sarbecovirus*, especie *Severe Acute Respiratory Syndrome related coronavirus* (Figura I6).

– Suborder: <i>Cornidovirineae</i>	Order: <i>Nidovirales</i>
– Family: <i>Coronaviridae</i>	Suborder: <i>Cornidovirineae</i>
+ Subfamily: <i>Letovirinae</i>	Family: <i>Coronaviridae</i>
– Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>	Family: <i>Coronaviridae</i>
+ Genus: <i>Alphacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i> HCoV-229E, HCoV-NL63
– Genus: <i>Betacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>
+ Subgenus: <i>Embecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i> HCoV-OC43 y HCoV-HKU1
+ Subgenus: <i>Hibecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>
+ Subgenus: <i>Merbecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i> MERS
+ Subgenus: <i>Nobecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>
– Subgenus: <i>Sarbecovirus</i>	Genus: <i>Betacoronavirus</i>
Species: <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>	Subgenus: <i>Sarbecovirus</i> SARS, SARS-CoV-2
+ Genus: <i>Deltacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>
+ Genus: <i>Gammacoronavirus</i>	Subfamily: <i>Orthocoronavirinae</i>

**Figura I6.** Clasificación la Familia *Coronaviridae* dentro del orden *Nidovirales*, Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV). Se indican en la tabla los coronavirus que afectan a los humanos. Adaptado de <https://ictv.global/taxonomy>

Los virus como el SARS-CoV-2 evolucionan constantemente a medida que se producen cambios en el código genético (provocados por las mutaciones o la recombinación viral) durante la replicación del genoma. A partir de la secuenciación genómica de los virus circulantes pueden clasificarse, siguiendo recomendaciones de diferentes grupos de expertos y organismos, en linajes, variantes, recombinantes. Un linaje es un grupo de variantes de virus estrechamente relacionados desde el punto de vista genético derivados de un ancestro en común. Una variante tiene una o más mutaciones que la diferencian de las otras variantes del virus del SARS-CoV-2. Un recombinante es una variante creada por la combinación de material genético de dos variantes diferentes (CDC, 2020). Las mutaciones adaptativas en el genoma viral podrían alterar su potencial patogénico, afectar a los métodos que se utilizan para su

diagnóstico y aumentarían la dificultad para desarrollar fármacos y vacunas (Giovanetti et al., 2021).

La variante con la mutación puntual D614G en la proteína S del SARS-CoV-2, rápidamente se convirtió en la más extendida (Pachetti et al., 2020) que también se ha asociado con cargas virales más altas en pacientes con COVID-19 (Lorenzo-Redondo et al., 2020), (Korber et al., 2020); esta mutación se agrupaba con una serie de otras mutaciones puntuales, incluida una en el gen de la polimerasa (Pachetti et al., 2020). Luego, comenzaron a identificarse otras mutaciones (Andersen et al., 2020), lo que permitió la clasificación de SARS-CoV-2 en muchísimos linajes, variantes de interés y preocupación (CDC, 2022, Nextstrain: <https://nextstrain.org/>). Estos conceptos serán abordados en el capítulo 2.3.8. Epidemiología molecular de SARS-CoV-2.

### 1.3.3 Genoma y estructura del SARS-CoV-2

Como todos los coronavirus, poseen una envoltura lipoproteica y su genoma está conformado por una hebra no segmentada de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 30.000 nucleótidos (Hu et al., 2021; N. Zhu et al., 2020a). El genoma posee 14 marcos abiertos de lectura (ORF, “*open reading frame*”) y codifica para 27 proteínas. En el extremo 5’ se ubican los genes ORF1a y ORF1b, que codifican para las proteínas no estructurales (Nsp, del inglés *non-structural protein*) Nsp1 a Nsp16. Las proteínas Nsp7, Nsp8 y Nsp12 forman el complejo RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) necesario para que ocurra la replicación viral. En el extremo 3’ se codifican cuatro proteínas estructurales: la glicoproteína de superficie espícula (S), la proteína de la envoltura (E), la glicoproteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N), y ocho proteínas accesorias no estructurales: 3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b y 9.

De la envoltura lipoproteica emerge la glicoproteína de superficie espícula (S), que le da la apariencia de corona al microscopio electrónico y es la encargada de actuar como ligando para la adsorción del virus a las células respiratorias a través de su unión al receptor celular ACE2. La superficie del trímero S está fuertemente glicosilada. Esta proteína es el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes; es clave en la inducción de inmunidad humoral y celular durante la infección con SARS-CoV-2 y por este motivo es utilizada para el desarrollo de las vacunas. La proteína M es una glicoproteína transmembrana que da la forma al virus y permite la unión a la nucleocápside (N); la proteína E tiene un papel clave en el ensamblaje y liberación del virus, y la proteína N forma parte de la nucleocápside al unirse al material genético (Hu et al., 2021; Sofi et al., 2020).

#### 1.3.4 Patogenia y respuesta inmune del SARS-CoV-2

Este virus se transmite persona a persona por contacto directo con gotas respiratorias y aerosoles infectados que contienen el virus, entre individuos infectados e individuos susceptibles, como otros virus respiratorios.

La infección comienza por la adsorción del virus SARS-CoV-2 a la membrana celular de las células del epitelio respiratorio, por dos vías: con escisión de S2 por TMPRSS2 (Proteasa transmembrana serina 2) o sin escisión de S2, por endocitosis, luego de la unión a ACE2 (**Figura 17**). Una vez que la partícula viral ingresa a la célula, se produce el desnudamiento, la replicación del genoma y la síntesis de proteínas, el ensamblado y la maduración y liberación de las nuevas partículas virales. Algunos de los ARN subgenómicos también tienen efecto sobre el huésped.

La transmisión de las nuevas partículas virales puede comenzar desde 24-48 horas antes del inicio de los síntomas y se mantiene durante una semana. El período de incubación tiene una media de 5 días, pero puede extenderse hasta los 14 días (Dhama et al., 2020).

La mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 son asintomáticas o presentan síntomas leves (80%), mientras que el 20% desarrolla cuadros graves que llevan a requerir internación e incluso cuidados intensivos, y de ellos hasta 2-3% puede ser letal (García-Salido, 2020). A la patología contribuyen el daño desencadenado por el propio virus y luego, la respuesta inmune del huésped que puede desarrollar una tormenta de citoquinas que lo lleva al empeoramiento del cuadro, e incluso la muerte.

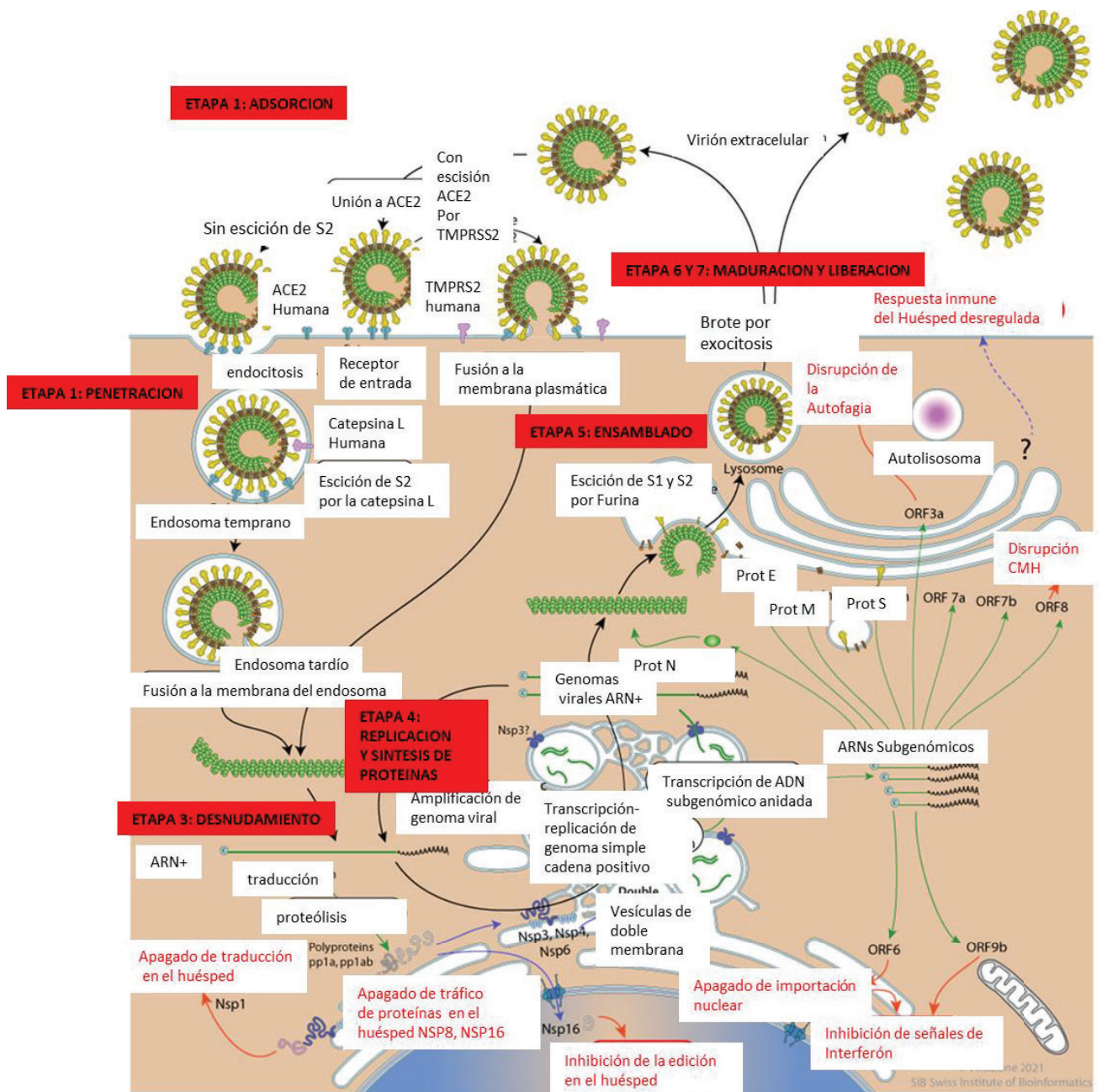
Se clasifica la enfermedad COVID-19 en 3 etapas o estadíos: infección primaria, fase pulmonar y fase hiperinflamatoria, reconociendo que la enfermedad de COVID-19 exhibe 3 grados de gravedad creciente, que se corresponden con distintos hallazgos clínicos, respuesta a la terapia, y desarrollo de la clínica (**Figura 18**).

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa desempeñan un papel esencial en la inmunopatogénesis de la COVID-19. La expresión de los receptores ACE2 y su interacción con la proteína S, que permite el acceso viral a la célula huésped y la liberación desregulada y elevada de citocinas proinflamatorias e inflamatorias se considera una consecuencia esencial e inevitable de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes gravemente infectados. La secreción

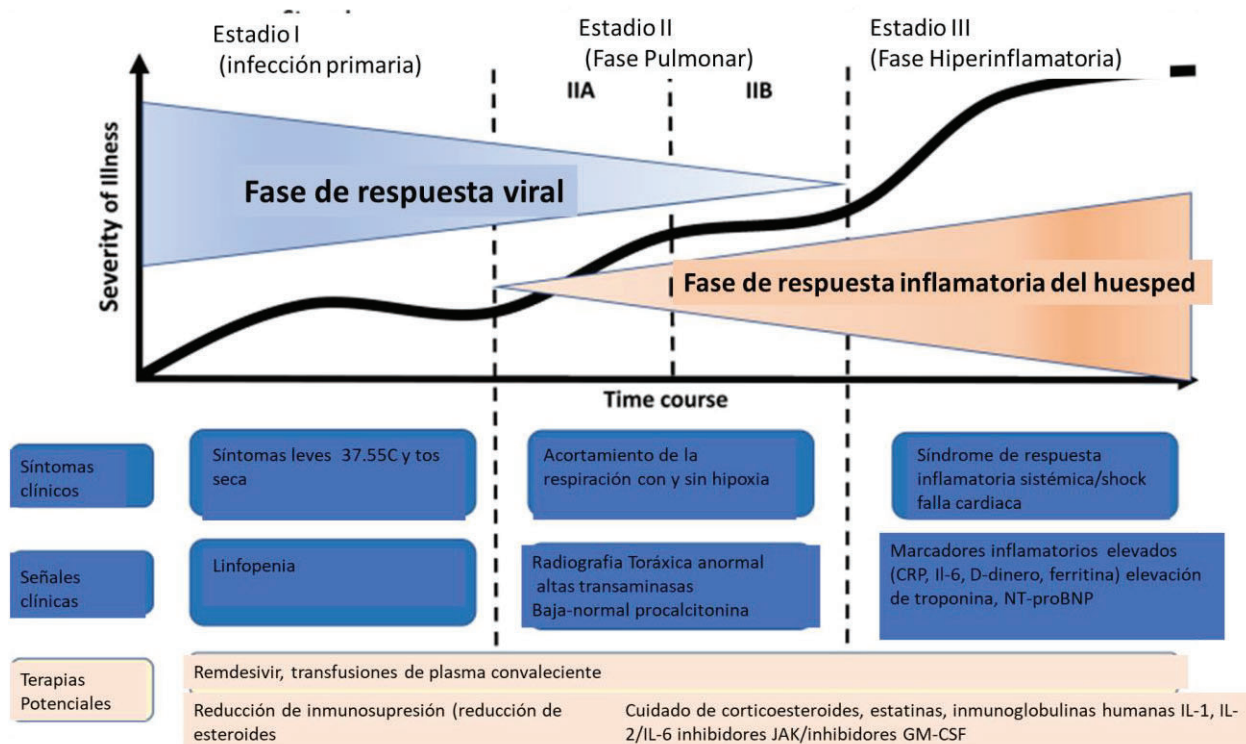


de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) conduce a una respuesta hiperinflamatoria al reclutar macrófagos, células T y B en las células alveolares pulmonares.

La interacción entre el virus SARS-CoV-2 y el sistema inmunológico de un individuo da como resultado manifestaciones clínicas diversa de la enfermedad COVID-19. Si bien las respuestas inmunitarias adaptativas son esenciales para la eliminación del virus SARS-CoV-2, las células inmunitarias innatas, como los macrófagos, pueden contribuir, en algunos casos, a la progresión de la enfermedad (PACES et al., 2020). Los macrófagos han mostrado una producción significativa de IL-6, lo que sugiere que pueden contribuir a la inflamación excesiva. El Síndrome de Activación de Macrófagos puede explicar aún más los altos niveles séricos de CRP (CRP="C reactive protein"), que normalmente faltan en las infecciones virales.



**Figura 17.** Ciclo de replicación viral del SARS-CoV-2. La proteína S se une al receptor ACE2 en la célula huésped usando el dominio S1. Esto permite que TMPRSS2 (Proteasa transmembrana serina 2) escinda la proteína S, lo que lleva a la activación del dominio S2 para la fusión. El S2 activado fusiona las bicapas lipídicas virales y del hospedador, lo que conduce a la deposición del genoma viral de ARN monocatenario de sentido positivo en la célula hospedadora. La replicación viral crea intermediarios de replicación de ARN de doble cadena (dsRNA) que pueden activar vías de inhibición inmunitarias. La replicación viral crea intermediarios de replicación de ARN de doble cadena (dsRNA) que pueden activar vías inmunitarias innatas citoplásmicas. Adaptado de (Lamers & Haagmans, 2022), (Y.-D. Li et al., 2020), (Izda et al., 2021) (Y.-D. Li et al., 2020, p. 19), ViralZone-Expassy)



**Figura 18.** Clasificación de los estados patológicos de la COVID-19 y posibles dianas terapéuticas. La figura ilustra 3 fases crecientes de la progresión de la enfermedad COVID-19, con signos, síntomas y posibles terapias específicas de fase asociadas. PCR, proteína C reactiva; JAK, janus quinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; NT-proBNP, péptido natriurético tipo B N-terminal pro; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Adaptado de (Siddiqi & Mehra, 2020).

En las respuestas inmunes adaptativas, se ha revelado que las células T CD8+ citotóxicas exhiben patrones de agotamiento funcional. Dado que el SARS-CoV-2 restringe la presentación de antígenos al regular a la baja las moléculas MHC de clase I y II y, por lo tanto,

disminuye las respuestas inmunitarias mediadas por células T; las respuestas inmunitarias humorales también desempeñan un papel importante. Los anticuerpos IgM e IgG son importantes y aparecen a la semana de la infección, y la respuesta de IgA específica parece ser más fuerte y persistente que la respuesta de IgM (PACES et al., 2020).

Un estudio realizado por personal del Laboratorio del INE-J. H. Jara, en Mar del Plata, Argentina, evaluó la respuesta inmune celular y humoral específica anti-SARS-CoV-2 en pacientes recuperados de COVID-19. A diez meses de la infección, el 74% de los voluntarios tenían anticuerpos IgG anti-proteína spike. Se observó una respuesta celular de memoria significativa para las 3 subpoblaciones linfocitarias estudiadas (LT CD4 y CD8 y LB). Los resultados sugieren que la respuesta inmune específica anti-SARS-CoV-2 es duradera, al menos durante 10 meses. Sin embargo, no se puede descartar que la respuesta celular de memoria observada se deba a una o más reexposiciones al virus, (Libera et al).

### 1.3.5 Características clínicas de la COVID-19

En general, el período de incubación del SARS-CoV-2 es de 5,1 días, y la mayoría de los pacientes desarrollarán síntomas dentro de los 11,5 días posteriores a la infección (Lauer et al., 2020). El espectro clínico de la COVID-19 varía desde formas asintomáticas o paucisintomáticos (forma clínica con escasa y/o poco expresiva sintomatología) hasta enfermedades clínicas caracterizadas por insuficiencia respiratoria aguda que requiere ventilación mecánica, shock séptico y falla multiorgánica. Los síntomas característicos y más frecuentes de la infección por SARS-CoV-2 incluyen cefalea, mialgia, fiebre, diarrea, anosmia (pérdida de olfato), ageusia (pérdida de gusto), entre otros (Huang et al., 2020). Cabe destacar que tanto factores virales como del huésped influyen en el desarrollo y desenlace de la enfermedad.

Los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. (NIH, del inglés *National Institute of Health*) emitieron pautas que clasifican la COVID-19 en cinco tipos distintos, en individuos infectados por SARS-CoV-2:

**\*Infección asintomática o presintomática:** ningún síntoma clínico compatible con COVID-19.

\***Enfermedad leve:** Individuos que tienen algún síntoma de COVID-19, como fiebre, tos, dolor de garganta, malestar general, dolor de cabeza, dolor muscular, náuseas, vómitos, diarrea, anosmia o disgeusia, pero sin dificultad para respirar ni imágenes anormales del tórax.

\***Enfermedad moderada:** Individuos que tienen síntomas clínicos o evidencia radiológica de enfermedad del tracto respiratorio inferior y que tienen saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) ≥ 94% en aire ambiente.

\***Enfermedad grave:** Individuos que tienen síntomas clínicos o evidencia radiológica de enfermedad del tracto respiratorio inferior y que tienen (SpO<sub>2</sub>) ≤ 94% en aire ambiente; una relación de presión parcial de oxígeno arterial a fracción de oxígeno inspirado, (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) <300 con taquipnea marcada con frecuencia respiratoria >30 respiraciones/min o infiltrados pulmonares >50%.

\***Enfermedad crítica:** Individuos que tienen insuficiencia respiratoria aguda, shock séptico y/o disfunción multiorgánica. Pueden desarrollar un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que tiende a ocurrir aproximadamente una semana después del inicio de los síntomas.

En adultos mayores e individuos con comorbilidades como EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), diabetes, enfermedad cardiovascular, obesidad, puede ocurrir un mayor riesgo de progresión a enfermedad respiratoria grave y aún fatal. En estos pacientes, se produce una rápida evolución a la hipoxemia y falla ventilatoria, trastornos en la coagulación, shock séptico y falla multiorgánica (Hu et al., 2021). También, se observa una respuesta desregulada de secreción de citoquinas (inflamación sistémica o tormenta de citoquinas) que produce una cascada de efectos que conducen a un daño microvascular, y explican el síndrome de dificultad respiratoria aguda y la falla orgánica múltiple (Dabanch, 2021).

En un estudio de metaanálisis que evaluó las características clínico-patológicas de 8697 pacientes con COVID-19 en China, informó anomalías de laboratorio que incluyeron linfopenia (47,6 %), niveles elevados de proteína C reactiva (65,9 %), enzimas cardíacas elevadas (49,4 %) y anomalías hepáticas. pruebas funcionales (26,4 %). Otras anomalías de laboratorio incluyeron leucopenia (23,5 %), dímero D elevado (20,4 %), velocidad de sedimentación globular elevada (20,4 %), leucocitosis (9,9 %), procalcitonina elevada (16,7 %) y función renal anormal (10,9 %) (J. Zhu et al., 2020). En otro metaanálisis de 212 estudios publicados que incluyeron a 281 461 personas de 11 países o regiones, se notificó un curso grave de la enfermedad en alrededor del 23 % con una tasa de mortalidad cercana al 6 % (J. Li et al., 2020).

Aparte de la dificultad respiratoria, algunos pacientes con COVID-19 mostraron síntomas de efectos neurológicos como náuseas, vómitos y dolor de cabeza, que también se manifiesta en otras infecciones por coronavirus (Glass et al., 2004). Estudios en Europa y los Estados Unidos, destacaron una condición hiperinflamatoria por un síndrome inflamatorio multisistémico grave (MIS-C) asociado con SARS-CoV-2 en niños (Hennon et al., 2020). Los principales síntomas incluyen: insuficiencia multiorgánica, hiperferritinemia y shock cardiogénico o vasopléjico (Hennon et al., 2020). Además, los parámetros anormales de coagulación sanguínea debido a irregularidades en el flujo sanguíneo, lesiones vasculares y anomalías pueden conducir a coagulopatía sistémica en pacientes con COVID-19 (Becker, 2020).

En algunos pacientes que ya resolvieron la infección aguda, puede observarse la presencia de *Long-COVID* o COVID prolongada, que es un síndrome debilitante que a menudo incluye síntomas respiratorios persistentes y, en menor grado, anomalías en la fisiología pulmonar o en las imágenes radiológicas. Las características respiratorias de COVID-19 prolongada pueden reducirse con el tiempo, pero no se observa una resolución en todos los casos (Daines et al., 2022). Las personas experimentan COVID prolongada como una condición heterogénea, con una variedad de consecuencias físicas y emocionales (Macpherson et al., 2022; N. N. Nguyen et al., 2022).

### 1.3.6 Diagnóstico del SARS-CoV-2

Desde enero de 2020, a inicios de la pandemia, los investigadores del *Center for Disease Control* (CDC) de China publicaron la información de secuencia del genoma completo del virus SARS-CoV-2, y esto permitió el rápido desarrollo de protocolos de RT-qPCR que permitieron amplificar y detectar regiones blanco del genoma viral, para hacer su diagnóstico en muestras respiratorias (V. M. Corman et al., 2020a; Vogels et al., 2020). Desde entonces, se han desarrollado métodos moleculares que detectan el genoma viral como la RT-PCR, RT-PCR isotérmica basada en LAMP y detección colorimétrica o detección por CRISPR, PCR digital. También, métodos rápidos que detectan los antígenos virales por Inmunocromatografía y métodos indirectos que detectan la presencia de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2. La **Tabla I1** presenta las técnicas diagnósticas disponibles en la actualidad, cada una con sus ventajas y desventajas. Sin embargo, cabe destacar que actualmente, la reacción de RT-qPCR sigue siendo el método estándar recomendado para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, debido a su alta sensibilidad y especificidad, amplia disponibilidad de kits de

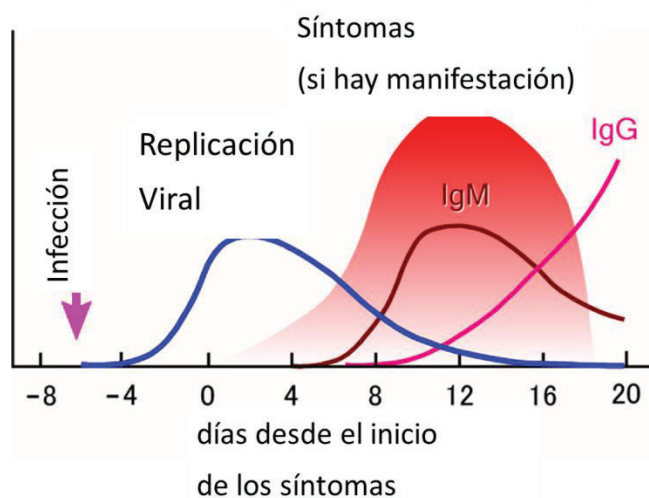
diagnóstico comerciales, equipamiento disponible y personal entrenado. Las herramientas de diagnóstico molecular basadas en RT-PCR se desarrollaron utilizando cebadores y sondas específicos para amplificar y detectar genes virales de la envoltura (E), la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), la proteína de la nucleocápside (N) o el marco de lectura abierto ORF1a y ORF1b (V. M. Corman et al., 2020a), (Li et al., 2020) (CDC 2019-nCoV real-time RT-PCR diagnostic panel. 2020).

La selección del método diagnóstico apropiado depende de la situación: la presentación del paciente, el momento relativo a la enfermedad en curso, la infraestructura de laboratorio, necesidades de salud pública y agendas de investigación. Los ensayos de anticuerpos están indicados principalmente con fines epidemiológicos debido a los tiempos de la seroconversión; el ensayo basado en detección de antígeno puede estar indicado para una identificación rápida de casos lo que podría ayudar a reducir la transmisión viral (Mardian et al., 2021).

En la **Figura 19** se puede apreciar la dinámica de la infección por coronavirus y los distintos enfoques diagnósticos según el transcurso de la infección. El pico de título de SARS-CoV-2 se da entre el día 0 y 7 desde el inicio de síntomas, y en ese momento es mayor la probabilidad de detectarlo con un método directo como la RT-qPCR o un test rápido de detección de antígenos (Dhar, 2022). Luego comienzan a aumentar los títulos de anticuerpos, y podemos utilizar su detección con fines epidemiológicos.

**Tabla I1.** Comparación de distintas técnicas de diagnóstico, ventajas y desventajas. (Adaptado de (Kumar et al., 2020)).

Técnicas	Tiempo para su desarrollo	Tiempo para el resultado	Disponibilidad comercial	Ventajas	Desventajas
RT-PCR	días después del conocimiento de la secuencia genómica	1-2 horas	si	Alta sensibilidad, especificidad confiable y es ideal para análisis de alta productividad.	Requiere transporte de muestras, equipamiento, reactivos y personal entrenado
PCR ISOTERMICA	días después del conocimiento de la secuencia genómica	15-60 minutos	si	Alta sensibilidad, especificidad testeado en puntos de cuidado, amigable para el usuario	diseño de <i>primers</i> complejo, propenso a amplificación no específica y resultados falsos positivos
ddPCR	días después del conocimiento de la secuencia genómica	horas	si	Ultra-alta sensibilidad, alta especificidad.	más costosa que la RT-PCR común
Test de Anticuerpos	meses después del patógeno cultivado	15 minutos a horas	si	conveniente y seguro, alta especificidad	Sensibilidad moderada, reactividad cruzada, naturaleza retrospectiva, no apropiado para diagnóstico
Test rápido de detección Antígeno	meses después del patógeno cultivado	15-30 minutos	si	rápido y lectura visual.	Requiere diseño estricto de anticuerpos sintético y conocimiento de la etiología viral, propenso a resultados falsos negativos
LAMP-CRISPR	días después del conocimiento de la secuencia genómica	15-60 minutos	no	Alta Sensibilidad, alta especificidad, confiable, lectura visual y posible de multiplexar	diseño de <i>primers</i> complejo, contaminación



**Figura 19.** La figura muestra la historia natural de SARS-CoV-2 incluyendo el rango de replicación viral y las inmunoglobulinas del huésped (IgM e IgG), así como la cinética temporal

de los síntomas de la COVID-19. Las cantidades de replicación viral y cada anticuerpo que se muestran en esta figura son solo para fines ilustrativos y no representan valores reales. Adaptado de Dhar, (Dhar, 2022).

### 1.3.7 Epidemiología del SARS-CoV-2

La Epidemiología es el estudio de la distribución, frecuencia y de los factores determinantes de las enfermedades en poblaciones humanas (Frérot et al., 2018). Se ha definido como la ciencia que estudia la dinámica de la salud en las poblaciones y se diferencia de la medicina clínica en que estudia grupos de personas y no individuos; se estudian personas sanas y enfermas, y se busca encontrar diferencias entre ellas. El conocimiento epidemiológico de una enfermedad se utiliza para entender las causas y programar políticas de salud pública y encauzar el tratamiento.

La capacidad de contener un patógeno emergente depende en parte de su número básico de reproducción  $R_0$  (Fraser et al., 2004), definido como el número promedio de casos secundarios que surgen de un caso primario en una población completamente susceptible (Anderson & May, 1992). No se requieren esfuerzos de contención activa cuando  $R_0 < 1$ , pero los valores más altos de  $R_0$  hacen que la contención sea más difícil (Anderson & May, 1992).

Los primeros casos de SARS-CoV-2 se informaron por primera vez en China a fines de 2019, y desde aquí se diseminó rápidamente por todo el mundo, hasta ser declarado por la OMS en marzo de 2020 como una nueva pandemia. Durante la primera ola epidémica que se dio en varios países simultáneamente, se estimaron valores de  $R_0$  entre 2 y 3, con un período medio de incubación de 5,7 (rango de 2 a 14) días. Sin embargo, en algunos casos se detectaron circunstancias donde el valor  $R_0$  fue muy superior, y se los caracterizó como eventos de superpropagación (cuando una persona infectada puede contagiar a 20 o más personas) (J. Wang et al., 2021). Las medidas de salud pública a nivel nacional y mundial buscaron disminuir el  $R_0$ , con la instauración de políticas de aislamiento social, que llegaron a incluir el cierre de fronteras, y uso de barbijos obligatorio, para evitar nuevos contagios y cortar las cadenas de transmisión (Salzberger et al., 2021), (Focosi et al., 2022). La mayoría de las infecciones por SARS-CoV-2 no presentan complicaciones y 5 a 10% de los pacientes son hospitalizados, principalmente por neumonía con inflamación grave. La estimación de la tasa de letalidad de la infección por SARS-CoV-2 es del 0,5 al 1%. Sin embargo, cabe destacar que durante la primera ola de COVID-19, en países como Italia o España, la tasa de letalidad superó el 10%



(<https://es.statista.com/estadisticas/1107849/covid-19-casos-confirmados-muertes-y-recuperados-por-dia-italia>) (Martín-Sánchez et al., 2020). A partir de estudios epidemiológicos, los factores de riesgo que se determinaron para la enfermedad grave son la edad avanzada, la hipertensión, la diabetes mellitus, las enfermedades cardíacas o pulmonares crónicas y la inmunodeficiencia (Salzberger et al., 2021). La evaluación de la mortalidad después de un periodo de 2.5 años de pandemia se estimó en un decrecimiento respecto del primer año llegando a fines del 2022 a una tasa de mortalidad similar a la gripe estacional, 0,05%–0,5% a pesar de una considerable variabilidad según el año observado y la edad del paciente (Horita & Fukumoto, 2023).

El 3 de marzo de 2020, Argentina confirmó su primer caso de COVID-19; se trató de un caso importado: un viajero proveniente de Italia que llega a la CABA, al cual se colocó en aislamiento respiratorio y del cual se estudiaron los contactos posibles (<https://www.argentina.gob.ar/noticias/salud-confirma-el-primer-caso-de-coronavirus-en-el-pais>). Como este suceso se sucedieron muchos más, y por ello los primeros casos fueron de individuos viajeros, casos importados. Luego, comenzaron a aparecer los casos de contactos estrechos (conglomerados de casos), y posteriormente, la transmisión comunitaria en donde no se podía establecer el nexo con viajeros ni contactos estrechos de casos importados. Por este motivo, el 19 de marzo de 2020, se implementó el aislamiento social preventivo y obligatorio (Decreto 297/2020, <https://www.boletinoficial.gob.ar/>) en todo el país, con el objetivo de minimizar la circulación de las personas y de este modo limitar la diseminación viral de manera inmediata y al mismo tiempo fortalecer el sistema de salud para hacer frente al aumento exponencial de casos que se daba en otros países del mundo que no tomaban este tipo de medidas. El Art 1 del Decreto mencionaba que *“se establece para todas las personas que habitan en el país o se encuentren en él en forma temporaria, la medida de “aislamiento social, preventivo y obligatorio” en los términos indicados en el presente decreto. La misma regirá desde el 20 hasta el 31 de marzo inclusive del corriente año, pudiéndose prorrogar este plazo por el tiempo que se considere necesario en atención a la situación epidemiológica”*. El Art. 2: *“Deberán abstenerse de concurrir a sus lugares de trabajo y no podrán desplazarse por rutas, vías y espacios públicos, todo ello con el fin de prevenir la circulación y el contagio del virus COVID-19 y la consiguiente afectación a la salud pública y los demás derechos subjetivos derivados, tales como la vida y la integridad física de las personas”*. Estas medidas se sostuvieron más del plazo original varias veces mediante prorrogas, pero las cuales fueron

abriendo paulatinamente el acceso a la circulación de mayor número de personas esenciales y no esenciales, y el resultado fue que sirvieron para postergar el inicio del aumento de casos exponenciales. El Distanciamiento social, preventivo y obligatorio se impuso el 20 de noviembre de 2020, con medidas focalizadas en conductas de distanciamiento y el establecimiento de protocolos sanitarios para el regreso de todas las actividades sociales, culturales, deportivas, etc. (Decreto 956/2020: <https://www.boletinoficial.gob.ar/>).

La primera ola en Argentina, tuvo su pico de casos a mediados de octubre (mayor a 15 mil casos en un día). A fines de 2020 los casos bajaron, pero se produjo un rebrote de casos en verano, del 2 de diciembre de 2020 al 16 de febrero de 2021, y luego del descenso, una nueva ola se inició, la segunda ola, del 17 de febrero de 2021 hasta fines de 2021, con un pico a mediados de mayo, con más de 30 mil casos positivos por día. A mediados de diciembre de 2021 comenzaron a aumentar los casos exponencialmente en lo que se convirtió en la tercera ola en nuestro país desde el 10 de diciembre, con pico a mediados de enero de 2022 con más de 100 mil casos por día (<https://coronavirus.jhu.edu/region/argentina>) (**Figura I10**). En la Provincia de Buenos Aires, en la cual se ubica la Región Sanitaria VIII, la primera ola tuvo una incidencia de 36,7 casos confirmados cada 1000 habitantes, y el pico se registró en agosto de 2020 con su máximo de media móvil el 28 de agosto (5780 casos diarios); el rebrote del verano tuvo una incidencia de 13,3 casos confirmados cada 1000 habitantes y su pico máximo el 8 de enero de 2021 (4677 casos diarios); y la segunda ola tuvo una incidencia de 66,9 casos confirmados cada 1000 habitantes y su máximo absoluto el 10 de abril de 2021 (12160 casos confirmados diarios) (Irassar et al., 2022). La mortalidad en la primera ola fue de 1268, 7 casos fallecidos por millón de habitantes; durante el rebrote del verano fue de 295,4 casos fallecidos por millón de habitantes, mientras que en la segunda ola fue de 1548,5 casos fallecidos por millón de habitantes. La letalidad resultó ser de 3,5% en la primera ola, mientras que en el rebrote de verano fue de 2,2 y en la segunda ola fue de 2,3%.

La implementación de la vacunación contra el SARS-CoV-2 se inició en todo el país el 29 de diciembre de 2020, en etapas, comenzando por vacunar al personal de salud y personal estratégico, luego individuos con riesgo de enfermedad grave como: mayores de 60 años, menores de 60 con factores de riesgo, y finalmente al resto de la población, de forma gratuita (<https://bancos.salud.gob.ar/recurso/actualizacion-de-los-lineamientos-tecnicos-campana-nacional-de-vacunacion-contra-la-covid>). Este plan de vacunación masiva ayudó a reducir la tasa de casos nuevos y hospitalizaciones por cuadros graves. Mas aún, durante la segunda ola,

con un alto número de casos por día, la tasa de hospitalización y muerte fue menor que la ola anterior, y en esto contribuyó la campaña de vacunación.



**Figura I10.** Casos confirmados y muertes por SARS-CoV-2 en Argentina, 2020-2021. Adaptado de Johns Hopkins University & Medicine, disponible en <https://coronavirus.jhu.edu/region/argentina>. ASPO: aislamiento social preventivo y obligatorio (19-3-2020); DISPO: Distanciamiento social, preventivo y obligatorio (20-11-2020).

### 1.3.8 Epidemiología Molecular del SARS-CoV-2.

La Epidemiología Molecular es una ciencia que estudia la contribución de los posibles factores de riesgo genéticos y ambientales, identificados a nivel molecular, a la etiología, distribución y prevención de enfermedades en las poblaciones (Lorenzo-Redondo et al., 2021). La secuenciación genómica permite describir en algunos casos la secuencia completa de los agentes causantes de la enfermedad, rastrear los orígenes del patógeno y su diseminación.

A partir del estudio del genoma viral de SARS-CoV-2 en diferentes regiones del mundo y a diferentes tiempos, se determinó que este virus ha evolucionado en diferentes grupos genéticos, debido a la ocurrencia de mutaciones, cambios nucleotídicos, que ocurren en distintas regiones del genoma viral y que suceden naturalmente dentro del proceso de evolución viral y por procesos de recombinación (*Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, 2021). Algunas mutaciones en posiciones específicas definen los grupos genéticos virales, los virus mutados son variantes del virus original, y las variantes pueden diferir en una o más mutaciones. Estas mutaciones

pueden ser sinónimas o no sinónimas y generalmente no tener impacto; sin embargo, algunas mutaciones pueden implicar un aumento en la transmisión o facilitar el escape viral de la respuesta inmune y afectar la eficacia de las vacunas y la sensibilidad de los métodos de diagnóstico basados en detección del genoma. En comunidades con alto nivel de transmisión viral es mayor la posibilidad de que ocurran mutaciones (Attwood et al., 2022). La OMS, en colaboración con redes de expertos, autoridades nacionales, instituciones e investigadores de todo el mundo, ha estado monitoreando y evaluando la evolución del SARS-CoV-2 desde enero de 2020, a través del banco de datos de secuencias GISAID (del inglés, *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data-GISAID (GISAID - Initiative, n.d.)*). Desde la primera secuencia disponible de SARS-CoV-2 a la actualidad han surgido numerosas variantes, definidas por combinaciones de mutaciones presentes en distintas regiones del genoma, que se han diseminado mundialmente, y algunas de ellas han mostrado tener características diferentes respecto la transmisibilidad, evasión de respuesta inmune o ambas.

Actualmente se utilizan sistemas de nomenclatura para nombrar y clasificar los linajes genéticos del SARS-CoV-2 basados en: 1-la presencia de mutaciones marcadoras características de clado (S, V, G, GH, GR) por GISAID, 2- el año de detección y la presencia de mutaciones características de clado (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 21A, etc.) por Nextstrain (Hadfield et al., 2018; *Updated Nextstrain SARS-CoV-2 Clade Naming Strategy, 2021*), y 3- la presencia de SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) utilizando un sistema de *machine learning* de PangoLearn (Rambaut et al., 2020) (<https://cov-lineages.org/> PANGOLEARN V2). Como se mencionó anteriormente, las mutaciones pueden ocurrir en todo el genoma, pero las variantes se definen en base a los cambios que originan mutaciones no sinónimas, por ejemplo, cambios en los aminoácidos en la región que codifica para la proteína S.

La aparición de variantes virales de SARS-CoV-2 con un potencial impacto o mayor riesgo para la salud pública desde fines de 2020, impulsó la caracterización de Variantes de Interés (VOI, del inglés: *variant of interest*) y Variantes de Preocupación (VOC, del inglés: *variant of concern*) definidas por la OMS. Para cada una de estas variantes se evalúa si tienen impacto sobre la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad, la eficacia de los métodos diagnóstico y las vacunas (*Tracking SARS-CoV-2 Variants, 2021*). En la actualidad, la OMS ha recomendado para la nomenclatura el uso de etiquetas con letras del alfabeto griego: Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron, etc. (*Tracking SARS-CoV-2 Variants, 2021*) (**Tablas 12, 13 e 14**).

**Variantes de interés (VOI).** Un aislamiento de SARS-CoV-2 es una variante de interés (VOI) si tiene cambios fenotípicos en comparación con un aislamiento de referencia o tiene un genoma con mutaciones que conducen a cambios de aminoácidos asociados con implicancias fenotípicas establecidas o sospechadas y se ha identificado que causa transmisión comunitaria, múltiples casos o *clusters* de casos de la COVID-19, o se ha detectado en varios países, o es evaluado como una VOI por la OMS en consulta con el Grupo de Trabajo de Evolución del Virus del SARS-CoV-2. **Tabla I2.**

**Tabla I2.** Variantes de interés (VOI), tomado de WHO, 2022

WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	Peru, Dec-2020	14-Jun-21
Mu	B.1.621	GH	21H	Colombia, Jan-2021	30-Aug-21

**Variantes de preocupación (VOC).** Una VOI es una variante de preocupación (VOC) si, a través de una evaluación comparativa, se ha demostrado que está asociada con un aumento de la transmisibilidad o cambio perjudicial en la epidemiología de la COVID-19; a un aumento de la virulencia o cambio en la presentación clínica de la enfermedad y a una disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de los diagnósticos, vacunas y terapias disponibles.

**Tabla I3.** Variantes de preocupación (VOC), tomado de WHO, 2022

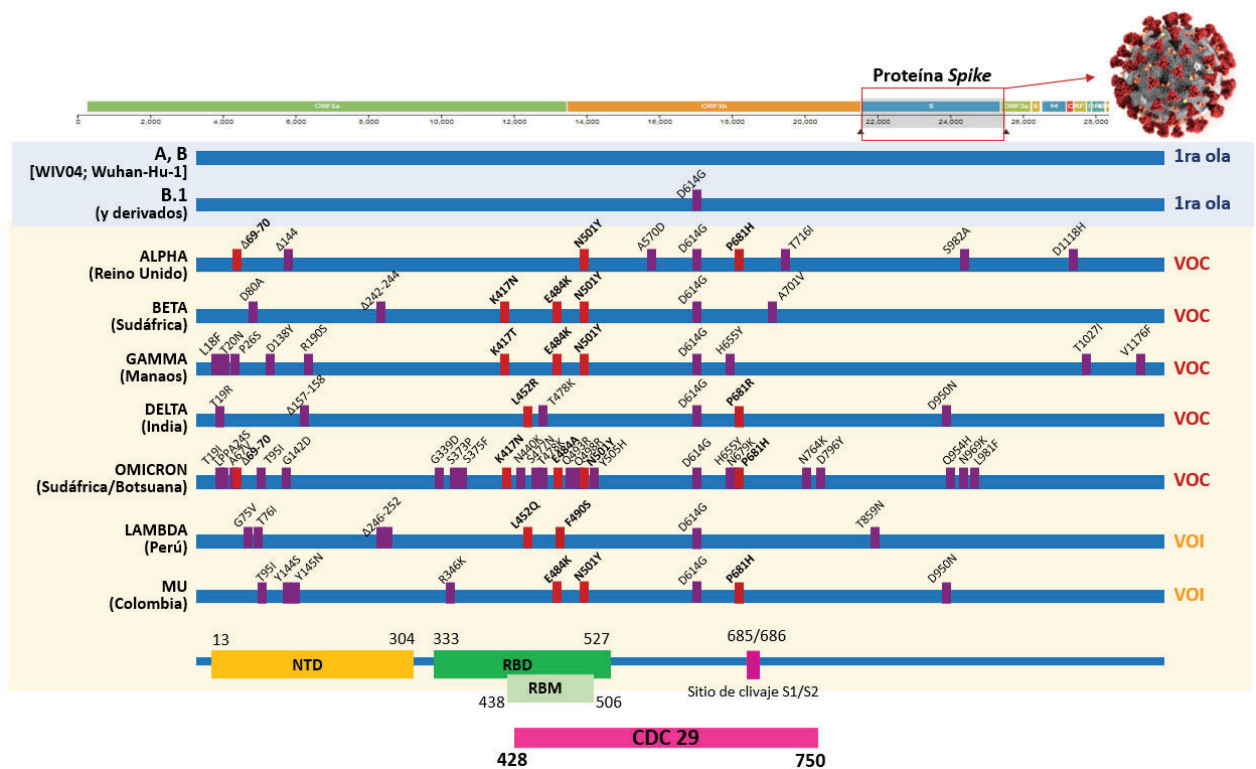
WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Additional amino acid changes monitored°	Earliest documented samples	Date of designation
Omicron*	B.1.1.529	GR/484A	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C, 22D	+S:R346K +S:L452X +S:F486V	Multiple countries, Nov-2021	VUM: 24-Nov-2021 VOC: 26-Nov-2021

\* Incluye BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 y linajes descendientes. También incluye formas recombinantes circulantes BA.1/BA.2 como XE.

**Tabla I4.** Variantes de preocupación previas, tomado de WHO, 2022

WHO label	Pango lineage•	GISAID clade	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Alpha	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	United Kingdom, Sep-2020	VOC: 18-Dec-2020 Previous VOC: 09-Mar-2022
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	South Africa, May-2020	VOC: 18-Dec-2020 Previous VOC: 09-Mar-2022
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	Brazil, Nov-2020	VOC: 11-Jan-2021 Previous VOC: 09-Mar-2022
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	India, Oct-2020	VOI: 4-Apr-2021 VOC: 11-May-2021 Previous VOC: 7-Jun-2022

En Argentina, desde el inicio de la pandemia, el Instituto ANLIS Malbrán y el Proyecto PAIS, realizan la vigilancia genómica mediante la secuenciación de muestras respiratorias positivas de SARS-CoV-2, obtenidas en todo el país, con el objetivo de reportar la introducción, circulación y el establecimiento de los linajes y las variantes virales en Argentina (*Informes vigilancia genómica*, 2021; Torres Carolina et al., 2021). En el marco de ambos proyectos, el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara ANLIS participó proporcionando muestras respiratorias positivas de SARS-CoV-2, para colaborar y poder llegar a una descripción epidemiológica que incluya a todas las regiones del país (Larrosa, 2021). En el marco del Proyecto PAIS, como estrategia más reciente, además de secuenciar el genoma completo, se comenzó con la secuenciación de una porción de la región del gen S, que luego se analiza en detalle para evaluar las posiciones marcadoras que definen a las distintas variantes, y de esta manera poder aumentar el número de muestras caracterizadas genéticamente. Se muestra en la **Figura I11** la región del gen S que se amplifica y se secuencia, y los cambios aminoacídicos característicos de las variantes de interés epidemiológico.



**Figura I11.** Esquema de la región parcial del gen que codifica para la proteína S que se amplifica y secuencia, con los cambios aminoacídicos característicos de las variantes de interés y preocupación. Fragmento 29 del protocolo del CDC utilizado para la vigilancia activa de variantes (codones S\_428 a S\_750). Tomado de Reporte PAIS n30. Feb 2022. Los cambios indicados en rojo corresponden a los de mayor impacto potencial sobre la biología viral o la neutralización por anticuerpos.

A modo de resumen, durante 2020 y 2021, algunas de las variantes mayoritarias identificadas en Argentina fueron:

- La Variante D614G: Esta variante fue identificada por primera vez en Argentina en marzo de 2020 y se convirtió en la variante predominante en el país.
- Variante Alpha B.1.1.7: También conocida como la variante del Reino Unido, fue identificada por primera vez en Argentina en enero de 2021. Asociada con un aumento en la transmisibilidad (transmisión más eficiente y rápida) y con un aumento en el riesgo de mortalidad en comparación con otras variantes.
- Variante Gamma P.1: También conocida como la variante de Manaus, Brasil, fue identificada por primera vez en Argentina en febrero de 2021. Algunas de las mutaciones de esta variante se asociaron con una mayor tasa de transmisión y rápida propagación, respecto de variantes observadas en la primera ola. Resultados

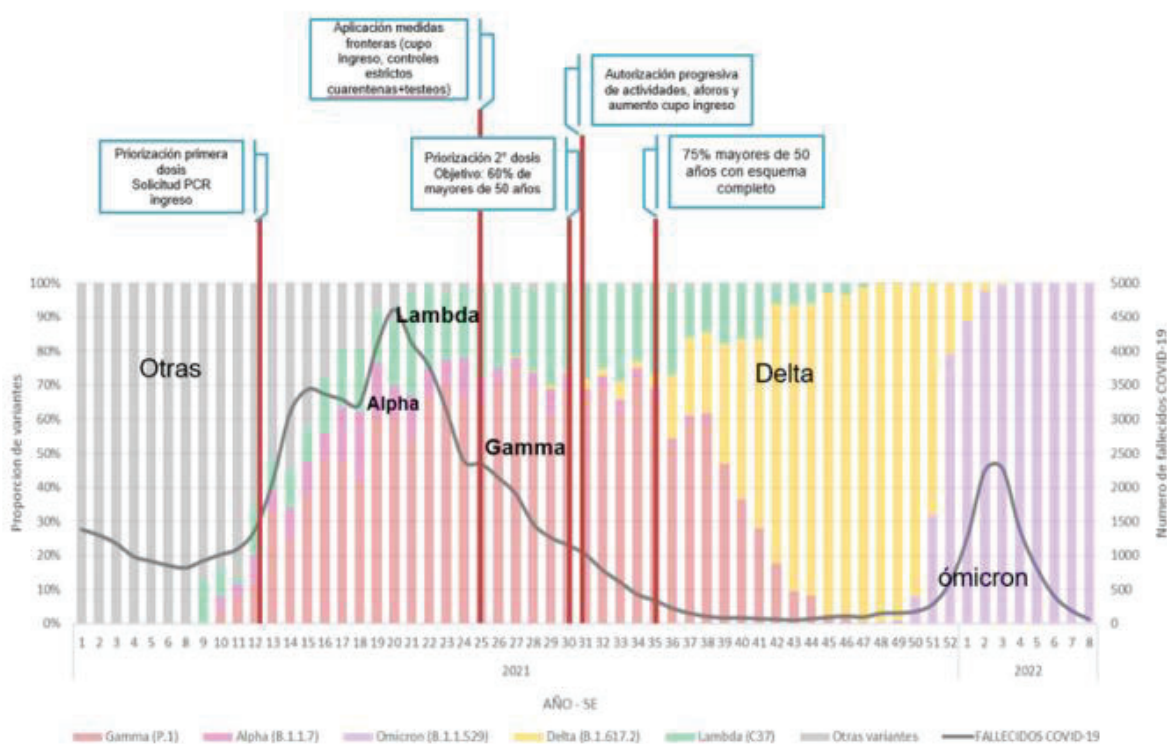
preliminares sugieren una correlación entre la infección por esta variante y mayor carga viral. Asimismo, los cambios antigénicos podrían afectar la capacidad de los anticuerpos producidos por infección natural previa o mediada por vacunación de reconocer y neutralizar el virus.

- Variante Delta B.1.617.2: También conocida como la variante de la India, fue identificada por primera vez en Argentina en mayo de 2021; se convirtió en la predominante en Argentina en octubre de 2021.
- Variante Lambda C37. La variante Lambda fue identificada por primera vez en Perú en agosto de 2020. Ha sido clasificada como una "variante de interés" por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su potencial de propagación y resistencia a las vacunas. Se ha informado de la presencia de la variante Lambda en varios países de América Latina, así como en Europa y Oceanía. Se ha asociado con un aumento de la transmisibilidad y una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes en comparación con la variante original del SARS-CoV-2.
- Variante Omicron B.1.1.529. La variante Omicron fue identificada por primera vez en Sudáfrica en noviembre de 2021. Ha sido clasificada como una "variante de preocupación" por la OMS debido a su rápida propagación y a las mutaciones que pueden afectar la eficacia de las vacunas y los tratamientos. Ha sido detectada en varios países de todo el mundo y ha llevado a la reintroducción de medidas de salud pública como el uso de mascarillas y el distanciamiento social. Se asocia a mayor transmisibilidad y tiene un mayor número de mutaciones en la proteína S, lo que podría reducir la eficacia de los anticuerpos neutralizantes producidos por las vacunas y la inmunidad natural.

En la **Figura I12** se presenta la distribución de las variantes de SARS-CoV-2 detectadas en Argentina desde 2020 a inicio de 2022 (<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2022-estrategia-ira.pdf>). A partir de los reportes generados por ambos proyectos, se logró describir que, durante la primera ola ocurrida en 2020, en Argentina la variante mayoritaria fue B.1.499 en todas las regiones del país analizadas; además circularon otras variantes no reconocidas como VOC o VOI (NO VOC). Luego surgió la aparición de las nuevas variantes como Alpha, Lambda y Gamma, que fueron luego reemplazadas por Delta durante la segunda



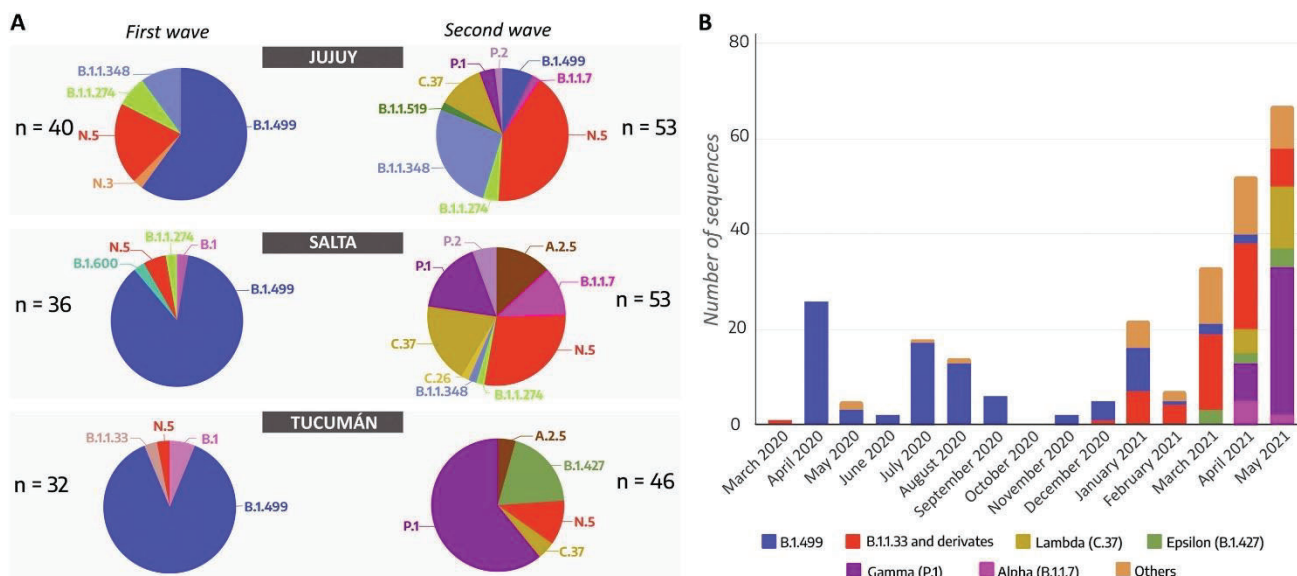
ola, y finalmente la aparición y el reemplazo por Omicron, quien provocó la tercer ola desde mediados de diciembre de 2021 (Torres Carolina et al., 2021)(Dirección Nacional de Epidemiología y del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS).



**Figura I12.** Distribución de variantes, casos fallecidos y medidas sanitarias implementadas en Argentina. 2021- 2022. Tomado de Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud. (<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2022-estrategia-ira.pdf>).

Es importante destacar que los estudios realizados sugieren que los anticuerpos generados a través de la vacunación reconocen todas estas variantes. Asimismo, que todas las vacunas son eficaces frente a las hospitalizaciones y muertes causadas por el SARS-CoV-2, tanto frente a los linajes que han circulado desde los inicios de la pandemia como a las variantes de preocupación.

En un análisis descriptivo de las variantes de SARS-CoV-2 en la región norte de Argentina, encontraron que los linajes y variantes presentes fueron completamente diferentes, como puede observarse en la **Figuras I13A y B** (Zambrana Montañó et al., 2022). Se observa el linaje B.1.499 predominando durante 2020 y las variantes B.1.1.33 y Gamma durante 2021. Sin embargo, en las tres provincias analizadas, la distribución porcentual de variantes fue muy diferente en los dos años estudiados.



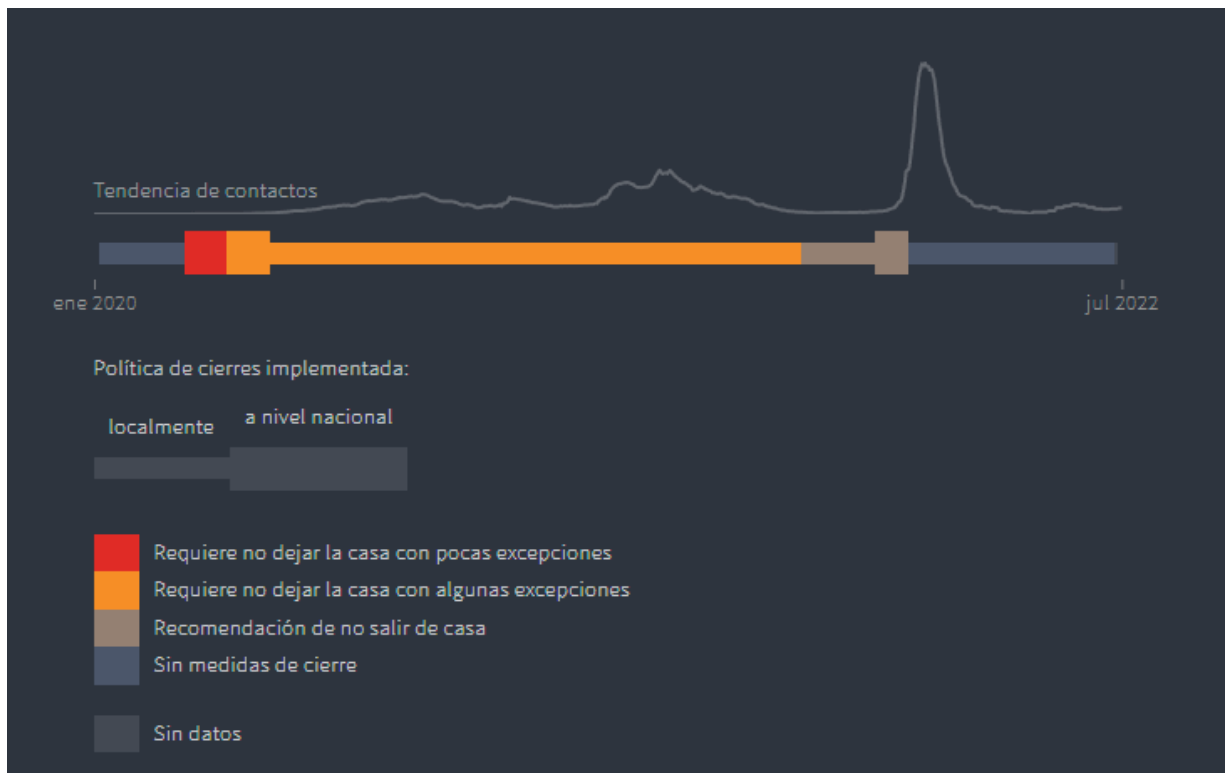
**Figura 113.** Distribución del linaje del SARS-CoV-2 en el noroeste argentino durante la primera y segunda ola. (A) Gráficos circulares que muestran y comparan la proporción de linajes que se detectaron en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán durante la primera ola y principios de la segunda ola en Argentina. (B) Representación temporal de secuencias de SARS-CoV-2 y linajes PANGO en provincias del noroeste argentino entre marzo de 2020 y mayo de 2021. Adaptado de (Zambrana Montaña et al., 2022).

Respecto las variantes reportadas en el periodo 2020-2021 a nivel mundial: en América del Sur las variantes descritas más relevantes fueron: Gamma (P.1), Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) y P.2. En América Central las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) y la Gamma (P.1). En América del Norte, las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) y la variante Delta (B.1.617.2). En Europa entre las variantes más comunes incluyeron: Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2). En Asia, al igual que en otras partes del mundo, las variantes incluyen: Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1), Lambda (C.37) y Mu (B.1.621). En Oceanía, aunque en general la región ha tenido una menor cantidad de casos y variantes en comparación con otras partes del mundo, algunas de estas variantes incluyen: Delta (B.1.617.2), detectada en varios países, incluyendo Australia, Nueva Zelanda y Papúa Nueva Guinea, Alfa (B.1.1.7) y Beta (B.1.351) (Adaptado de: <https://www.javiercolomo.com/coro.htm>), (covid data tracker <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#datatracker-home>), (COVID19 Map <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>).

### 1.3.9 Estrategias para la contención de la pandemia por SARS-CoV-2

Desde principios de 2020, la pandemia de SARS-CoV-2 avanzó en todo el mundo, infectando a la fecha (24 de abril de 2023) un total de 763.740.140 casos confirmados y ocasionando 6.908.554 muertes confirmadas por COVID-19., lo que ha representado una gran amenaza para la salud humana (<https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>) (coronavirus.jhu.edu). Desde la declaración de la emergencia internacional el 31 de enero de 2020, los distintos países han ideado estrategias que les permitieran contener el número de casos para dar un servicio de salud adecuado a todos los que lo requieran, debido a que el aumento abrupto de casos terminó llevando a los servicios de salud de muchas regiones al colapso. Se fueron implementando intervenciones no farmacéuticas, desde enfoques convencionales de cuarentena y aislamiento hasta bloqueos en diferentes escalas, el requerimiento de utilizar mascarillas o barbijos, el distanciamiento obligatorio, para intentar contener el brote. Estas medidas fueron de mucha utilidad hasta que comenzó la distribución de vacunas efectivas desarrolladas en tiempo récord, que se fueron aplicando en los países, con el objetivo de que los individuos vacunados no presenten enfermedad grave que requiera internación y de este modo poder atender a los enfermos de mayor gravedad de forma adecuada y oportuna (R. E. Chen et al., 2021).

En Argentina, al inicio de la pandemia se estableció un plan de preparación y respuesta diseñado para el sector sanitario basado en los siguientes puntos: 1-Detectar oportunamente a las personas que padecen COVID-19 e ingresan al país; 2- Minimizar la diseminación de la enfermedad, la morbilidad y la mortalidad; 3- Asistir en forma adecuada a las personas enfermas; 4 Monitorear e investigar brotes que puedan ocurrir; 5- Identificar y caracterizar la naturaleza del virus y la gravedad clínica de la enfermedad; 6- Recomendar estrategias de manejo específicas de enfermedades respiratorias; 7- Contribuir a la recuperación rápida y segura de individuos (*Cuidados principales*, 2021) (**Figura I14**). Como se detalló anteriormente, dos decretos se firmaron para establecer el ASPO en marzo de 2020 y el DISPO en noviembre de 2020, para establecer medidas de aislamiento en un primer momento, y de distanciamiento después, hasta poder a fines de 2020 regresar a la normalidad de la vida prepandemia. Además, Argentina inició una campaña nacional de vacunación a fines de 2020 con el objetivo de inmunizar al total de la población con al menos una dosis, mediante la aplicación a grupos de riesgo en etapas, hasta llegar a vacunar a todos los habitantes del país.



**Figura I14.** Medidas de cierre (confinamiento) que fueron implementadas durante la pandemia en Argentina. Cuando los contagios de COVID-19 comenzaron a ser reportados en todo el mundo, muchos países respondieron cerrando escuelas, espacios de trabajo y fronteras internacionales para contener la propagación del virus. Tomado de <https://www.reuters.com/graphics/world-coronavirus-tracker-and-maps/es/countries-and-territories/argentina>.

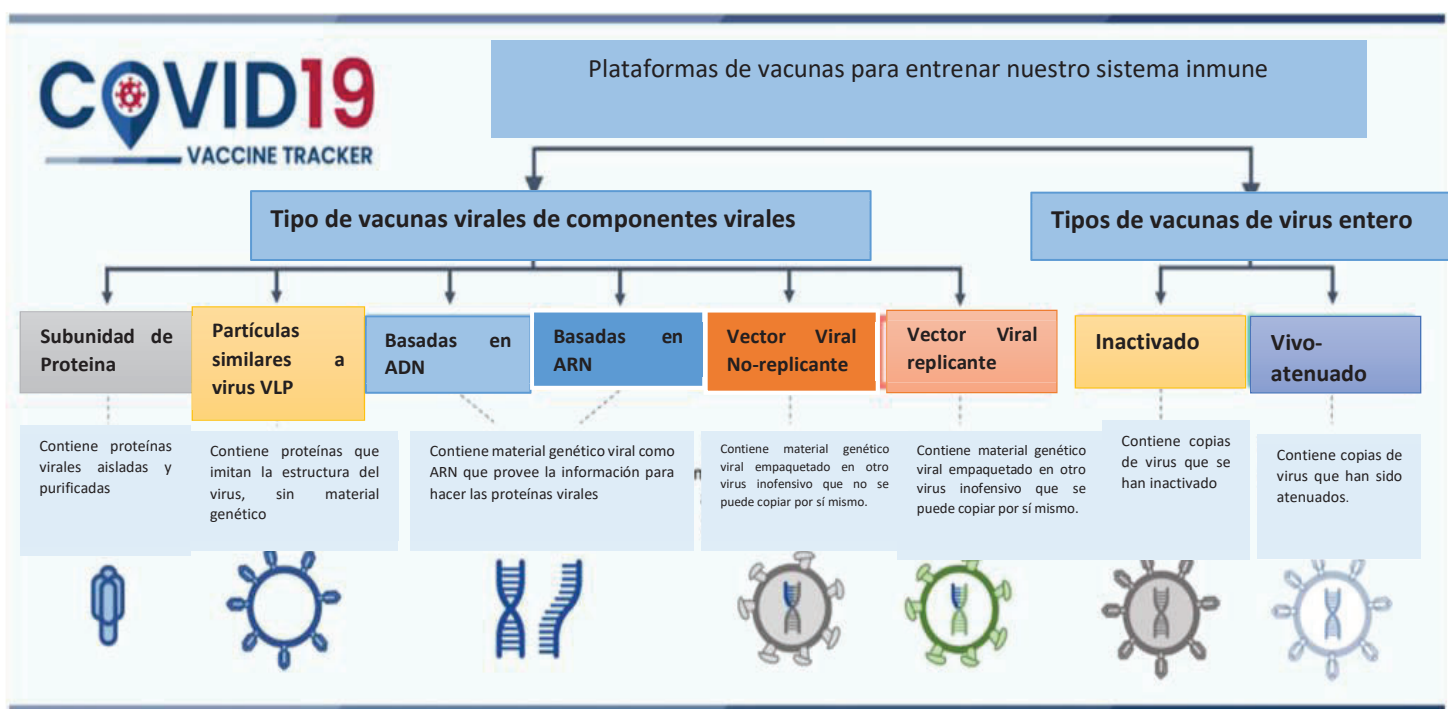
### 1.3.9.1 Vacunas

Cuando un virus o bacteria ingresa al organismo, éste desarrolla una defensa inmunitaria innata (no específica) y una respuesta inmunitaria adaptativa (específica). La respuesta innata es la primera línea de defensa del organismo contra las infecciones. Incluye mecanismos como la piel, las membranas mucosas, las enzimas y las citocinas, que ayudan a eliminar los patógenos. La respuesta adaptativa es más específica y se desarrolla con el tiempo. Incluye la producción de anticuerpos, que se unen a los patógenos y los neutralizan, y la activación de los linfocitos B y T, que son células especializadas en la respuesta inmune.

Las vacunas son una suspensión que puede contener microorganismos vivos atenuados, muertos o inactivados, fracciones de estos o partículas proteicas, polisacáridos o ácidos nucleicos de los patógenos, vectores virales, que al ser administradas inducen una respuesta inmune específica que luego permite inactivar, destruir o evitar que el patógeno contra la que

está dirigida invada y genere una infección previniendo la enfermedad, sobre todo las formas graves.

Comenzaron en todo el mundo los desarrollos sin precedentes de vacunas de diversos tipos, para intentar ayudar a la humanidad a contener la pandemia. Se probaron diversos formatos y plataformas, basados en la partícula viral completa o en componentes, ya sea una proteína o su genoma (**Figura I15**).



**Figura I15.** Tipos de vacunas para SARS-CoV2. Adaptado de <https://covid19.trackvaccines.org/types-of-vaccines/>

Para el SARS CoV-2, la proteína S ha sido muy utilizada para la fabricación de vacunas, dado que es la que le permite adherirse y entrar en las células, al interactuar con el receptor ACE2. Por lo tanto, los anticuerpos que se generen contra ella serían capaces de neutralizar a los viriones y de este modo prevenir la infección o sus formas clínicas graves.

En Argentina, se propuso la administración de las vacunas disponibles desde diciembre de 2020, para intentar alcanzar al 100% de la población, en forma gratuita. Las vacunas utilizadas han sido: 1-La vacuna **ChAdOx1-S** de origen británico (Oxford/ AstraZeneca) y la homóloga **Covishield** del Serum Institute de India utilizan plataforma de vector viral no replicativo (utiliza

adenovirus de chimpancé). 2-La vacuna de origen ruso (**Sputnik V** del Instituto Gamaleya) utiliza vector viral no replicativo (utiliza 2 adenovirus humanos: 26 y 5). 3- La vacuna de origen chino, **Sinopharm**, a virus inactivados. 4-La vacuna de origen estadounidense, **Moderna**, utiliza una plataforma de ácidos nucleicos: ARNm. 5-La vacuna **Convidecia o Ad5-nCoV** es una vacuna recombinante que utiliza vector viral no replicativo de adenovirus tipo 5 que expresa la glicoproteína S, producida por el laboratorio del Instituto de Biotecnología de Beijing (Beijing, China) y **CanSino** Biologics Inc. 6-La vacuna **Comirnaty** es una vacuna que utiliza una plataforma de ácidos nucleicos: ARNm, producida por Pfizer-BioNTech (<https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/preguntas-frecuentes#1>).

Si bien la vacunación contra SARS-CoV-2 no previene completamente la infección, en la mayoría de los reportes de vacunas, la eficacia calculada en los ensayos clínicos con voluntarios con aplicación de vacuna y placebo, y la efectividad (en la población), contra la enfermedad grave se mantuvo alta ( $\geq 70\%$ ) hasta 6 meses después de la vacunación (y en su mayoría  $\geq 80\%$  para las dos vacunas de ARNm). No obstante, a los 6 meses está descrita una caída de 9,5 - 10,0 puntos porcentuales, incluso entre las personas mayores (Ghazy et al., 2022). La evidencia demostró que después de administrar una dosis de refuerzo aumenta la eficacia o efectividad de la vacuna en comparación con las personas que solo recibieron la serie de vacunas primarias, un apoyo adicional para una posible disminución de la inmunidad (Bar-On et al., 2021), motivo por el cual en el país se decidió administrar a la población una serie de 3 o más refuerzos, distanciados por al menos 4 meses. Además, una disminución en la eficacia o efectividad de la vacuna con el tiempo puede reflejar una menor eficacia o efectividad contra una nueva variante; disminución real de la inmunidad provocada por la pérdida de la protección inmunológica inducida por la vacuna. Por este motivo, las vacunas se están reformulando para incluir las variantes más recientes, como Ómicron, en su composición (Feikin et al., 2022; Hadj Hassine, 2022; Zeng et al., 2022).

#### **1.3.9.2 Antivirales**

Otro esfuerzo para intentar contener el impacto de la pandemia fue el ensayo de antivirales contra SARS-CoV-2, tanto el testeo de antivirales ya existentes como el diseño de fármacos nuevos. Recientemente se han desarrollado algunos medicamentos para combatir el SARS-CoV-2 que recibieron autorización de uso de emergencia, incluidos los inhibidores de la polimerasa y la proteasa (Molnupavir y Nirmatrilivir respectivamente), análogos de nucleótidos para prevenir la replicación viral (Remdisivir, AT-527) e inhibidores de proteasas

para prevenir la formación de viriones (GC-376 y PBI-04551), entre otros que se están probando para determinar su eficacia clínica (Deng et al., 2022).

Otra intervención terapéutica es el uso de inmunomoduladores, como IFN-a2a/2b, IFN-b1b y corticosteroides en el tratamiento (*Interferon Alfacon-1 Plus Corticosteroids in Severe Acute Respiratory Syndrome: A Preliminary Study | Critical Care Medicine | JAMA | JAMA Network*, n.d.), (Loutfy et al., 2003), (Peiris et al., 2003) dado que múltiples estudios han demostrado la eficacia de IFN-2a/2b e IFN-b1b solos o en combinación con medicamentos antivirales (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** Antivirales para SARS-CoV-2. Adaptado de (Dal-Ré et al., 2022) y (<https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>).

Fármaco	Objetivo Viral	Química	Mecanismo de Acción	Comentario	Administración
<b>Molnupuravir</b>	RdRp	Análogo de Citidina	Mutagénesis	Reduce las hospitalizaciones y muertes en 30% en pacientes ambulatorios. Teratogenicidad Potencial	oral
<b>Nirmatrelvir</b>	Mpro	núcleo de imidazol con dos cadenas laterales	Inhibidor de Proteasa	Reduce las hospitalizaciones y muertes en 89% en pacientes ambulatorios. Potencialmente interactúa con el refuerzo de ritonavir.	oral
<b>Remdesivir Oral (GS-621763)</b>	RdRp	Análogo de Adenosina	Terminador de cadena	en desarrollo clínico	infusión intravenosa en establecimiento con atención médica por 3 días consecutivos.
<b>AT-527</b>	RdRp	Análogo de Guanosina	Terminador de cadena	en desarrollo clínico	oral
<b>GC-376</b>	Mpro	Molécula Pequeña	Inhibidor de proteasa	en desarrollo clínico	oral
<b>PBI-04551</b>	Mpro	Molécula Pequeña	Inhibidor de proteasa	en desarrollo clínico	oral

RdRp: RNA polimerasa, Mpro: Proteasa Principal

### 1.3.9.3 Plasma de convaleciente. Anticuerpos monoclonales. Suero equino hiperinmune.

**Plasma Convaleciente.** Se obtiene de pacientes que se han recuperado de la infección por SARS-CoV-2. Aunque el plasma de pacientes convalecientes es difícil de obtener, el componente activo (anticuerpos neutralizantes) se pueden aislar y posteriormente ser producidos en gran cantidad usando tecnología recombinante (Corti & Kearns, 2016). Se ha demostrado un resultado significativamente mejor, descrito como supervivencia a largo plazo, tiempo hasta el alta en la Unidad de Cuidados Intensivos y tiempo hasta el alta hospitalaria, entre los que recibieron una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes en comparación con el grupo de control (Körper et al., 2022).

**Anticuerpos Monoclonales.** Son anticuerpos producidos en el laboratorio, de un altísimo costo, que se autorizaron por FDA. REGEN-COV comprende dos monoclonales Casirivimab e Imdevimab, también Bamlanivimab administrado solo o con Etesevimab, Sotrovimab (Focosi et al, 2022). Sin embargo, el Panel de Pautas de Tratamiento para la COVID-19 de NIH de EE. UU, recomendó recientemente no utilizar Bamlanivimab y Etesevimab (administrados conjuntamente) ni REGEN-COV (Casirivimab e Imdevimab) debido a la marcada reducción de actividad contra la variante Ómicron (Commissioner, 2022; Vita et al., 2022).

**Suero Equino Hiperinmune.** Es una inmunoterapia basada en anticuerpos policlonales equinos con gran capacidad neutralizante anti-SARS-CoV-2. Se obtienen utilizando como antígeno una proteína recombinante del virus, la cual se produce mediante técnicas de biotecnología. El medicamento se logra a partir del procesamiento de los anticuerpos, generando fragmentos con alta pureza y buen perfil de seguridad. Los anticuerpos policlonales tienen la ventaja que reconocen y unen en varias regiones a la molécula clave del virus, bloqueando los sitios de interacción con sus receptores. Como ventaja adicional, pueden producirse rápidamente a gran escala. La inmunoglobulina F(ab')<sub>2</sub> equina anti-SARS-CoV-2 usando un antígeno viral de SARS-CoV-2 recientemente desarrollado que fue purificado e inactivado por radiación. Los ensayos preclínicos y basados en células mostraron que la inmunoglobulina F(ab')<sub>2</sub> neutraliza con éxito el virus, es segura en modelos animales y reduce la gravedad de la enfermedad en un modelo de hámster de infección y enfermedad por SARS-CoV-2 (Botosso et al., 2022). El 22 de diciembre de 2020, la ANMAT aprobó el uso del suero equino hiperinmune anti-SARS-CoV-2 para el tratamiento de pacientes adultos con COVID-19 moderada a severa. Se evidenció beneficio clínico considerable, la disminución de la necesidad de internación en terapia intensiva y de asistencia respiratoria mecánica.



#### 1.4 Genética y evolución viral

Los virus presentan variaciones genéticas que les dan características específicas, y pueden estudiarse utilizando estrategias de amplificación por PCR seguida de secuenciación para obtener la secuencia genómica y luego emplear herramientas bioinformáticas que permitan su análisis. Los genetistas moleculares le asignan el nombre de wild type (salvaje) a los virus cultivados en laboratorio, del que se obtienen virus mutantes que se comparan con el wild type. Los aislados del hospedero natural se denominan aislamiento de campo. Cuando se habla de cepa es designar distintos tipos de wild type y mutantes caracterizados del mismo virus. Serotipo o tipo neutralización cruzada de la infectividad (un mismo tipo puede incluir varias cepas. Variante es un virus genotípicamente diferente del wild type (Carballal, 2015).

Los virus ADN y ARN difieren no sólo en el tipo de genoma que poseen sino también en el mecanismo mediante el cual replican su genoma. Los virus ADN poseen genomas más largos y una gran precisión del proceso de replicación debido a la selección de nucleótidos y capacidad de *“proofreading”* o reparación de errores que les permite prevenir mutaciones o cambios permanentes en las secuencias; mientras que los virus ARN poseen genomas más pequeños debido a la replicación propensa a errores (*“error-prone replication”*) que poseen y a carecer de sistemas de *“proofreading”* (Carballal, 2015). Cabe aclarar que las mutaciones ocurren de manera aleatoria en los genomas.

El SARS-CoV-2, a pesar de ser un virus ARN, para mantener la integridad del genoma de más de 30000 bases cuenta con un mecanismo de *“proofreading”*, que le permite remover nucleótidos incorrectos o corregir el apareamiento incorrecto de bases (L. Lin et al., 2022). Por este motivo, SARS-CoV-2 y los otros HCoV que poseen la función de *“proofreading”*, mutan con menor frecuencia otros virus ARN (T. Lin & Sundby, 2023). Este mecanismo está compuesto por la proteína nsp14 y nsp10. El SARS-CoV-2 tiene una tasa de mutación más baja que otros virus de ARN, pero ya se han identificado aproximadamente 12,800 mutaciones en todo el mundo (Callaway, 2022).

A pesar de contener el mecanismo de *“proofreading”* las mutaciones pueden producirse. El primer paso de la infección esta mediado por la unión de S al receptor ACE2. La selección positiva de mutaciones en esta proteína permitió que nuevas variantes de SARS-CoV-2 con mayor *“fitness”* se fijan, lo que llevó a observar el aumento de infectividad para algunas de ellas. Durante el primer año de la pandemia COVID-19, el virus mostró una tasa de mutación ligeramente más alta que el SARS-CoV, el MERS-CoV o el HCoV-OC43, pero no parece haber

sufrido cambios mutacionales significativos durante el primer año de su propagación en la población humana (Markov et al., 2023; Pagani et al., 2023). El gen S tiene una tasa de mutación al menos cuatro o cinco veces mayor que el resto del genoma, y por ello, las diferentes variantes pueden ser capaces de aumentar la replicación, transmisibilidad e incluso provocar un escape inmunitario (Amicone et al., 2022), (J. Wang et al., 2021), (C. Wang et al., 2020); estos cambios nucleotídicos también alteran el patrón de glicosilación, favoreciendo el escape inmunitario (Watanabe et al., 2020), (Brun et al., 2021). Otro mecanismo que caracteriza a los HCoV es que tienen una alta tasa de recombinación intratípica y con menor frecuencia la recombinación homóloga intertípica (Amoutzias et al., 2022).

#### 1.4.1 Herramientas para el estudio de la epidemiología molecular

##### 1.4.1.1. Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

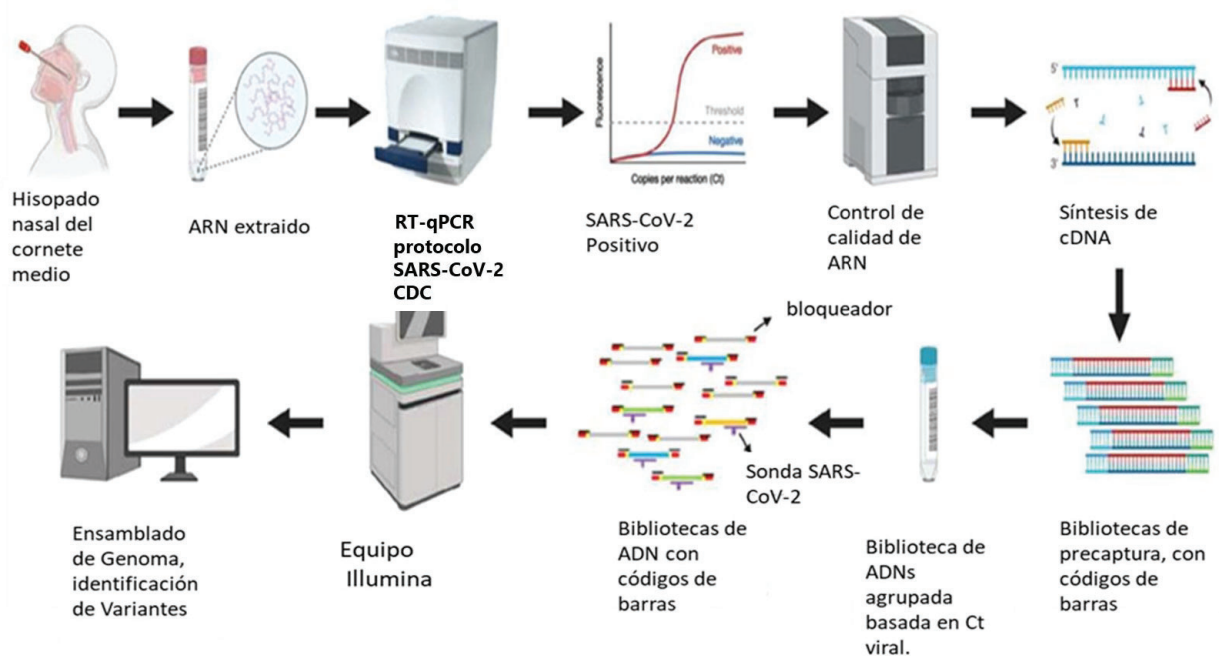
Mediante la secuenciación del genoma completo por técnicas de secuenciación masiva se obtiene una secuencia del genoma completo viral a partir de fragmentos cortos de ADN, que varían en tamaño según las plataformas utilizadas, entre 150 y 400 pares de bases. Se adicionan adaptadores a ambos extremos de cada uno de los millones de fragmentos de ADN a secuenciar (conocidos con el nombre de inserto) y se añaden etiquetas (secuencias establecidas de ADN para diferenciar cada muestra, llamados habitualmente códigos de barra de la muestra (del inglés *sample barcodes*). Por esto, en un mismo ensayo se pueden combinar múltiples muestras para secuenciar sin riesgo de entrecruzamiento entre las mismas (Yohe & Thyagarajan, 2017), (Rehm et al., 2013). La obtención de fragmentos flanqueados por adaptadores con secuencias específicas permite que sea posible realizar millones de reacciones a la vez para obtener la secuencia.

El procesamiento de datos comienza con la señal cruda obtenida por el secuenciador y finaliza con la interpretación de los resultados haciendo el ensamblado de los genomas y la identificación de las variantes (**Figura I16**).

##### 1.4.1.2. Secuenciación de SANGER

Este tipo de estrategia se utiliza para obtener secuencias de regiones genómicas de hasta unos 1000 pb, y en particular para SARS-CoV-2, es la estrategia que se usa para secuenciar una región parcial de la región que codifica para la proteína S (Fragmento 29 del protocolo recomendado por CDC para secuenciación de genoma completo).

Esta estrategia se basa en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos “especiales” o nucleótidos de parada, están diseñados para que carezcan del grupo 3'-OH, que permite la adición del nucleótido consecutivo, de forma que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa se interrumpe la síntesis de la nueva hebra. Esto lleva a que se obtengan fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los dideoxinucleótidos. De este modo, y tras una simple electroforesis, se dilucida la secuencia.



**Figura I16.** Flujo de procedimientos para obtener las secuencias de genomas completos de SARS-CoV-2 por secuenciación masiva. Adaptado de (Doddapaneni et al., 2020).

### 1.4.1.3. Filogenia

Los análisis de filogenia reconstruyen la historia evolutiva de un gen o una especie, mediante la generación de árboles, a partir de secuencias de nucleótidos o aminoácidos, y así permiten conocer las relaciones evolutivas, donde los nodos internos del árbol representan a las secuencias de los ancestros, que se dividen en ramas y a su vez se conectan con los nodos externos del árbol, que representan a los descendientes o secuencias de estudio (Nei & Takezaki, n.d.).

El análisis de filogenia comienza con el alineamiento de las secuencias, en este caso del estudio de SARS-CoV-2, de genoma completo o de la región parcial del gen S, para establecer la homología posicional (que los caracteres que se encuentren en una misma columna representen un sitio génico o locus que evolucionó a partir de un estado ancestral) (Phillips et al., 2006). Luego, el alineamiento es utilizado para la reconstrucción filogenética, empleando algún método basado en distancias o en caracteres de las secuencias. El árbol generado es posteriormente sometido a ensayos estadísticos que permiten evaluar el soporte de las ramas y conocer las regiones confiables del árbol obtenido (Wróbel, 2008).

El método de máxima verosimilitud utiliza un criterio de optimalidad, intenta encontrar un árbol con determinada topología y longitudes de ramas (medidas en sustituciones por sitio), teniendo en cuenta un modelo de evolución y sus parámetros, que maximiza la probabilidad de generar el alineamiento que se está evaluando (Felsenstein, 1981). Realiza búsquedas heurísticas, realizando rearrreglos hasta obtener el árbol más verosímil o de mayor "*likelihood*". Para su cálculo se consideran las probabilidades de cambio de todos los sitios del alineamiento para todas las ramas del árbol y las posibles asignaciones ancestrales a los nodos internos. Este valor, que representa la probabilidad de los datos, es un número muy pequeño y suele expresarse como logaritmo. Utilizando una prueba de hipótesis conocida como cociente de verosimilitudes ("*likelihood ratio test*") se pueden comparar distintos árboles, con variantes en el modelo evolutivo, y así seleccionar el más adecuado para las secuencias de estudio (Posada, 2009). Esta metodología suele generar como resultado un único árbol y permite contrastar hipótesis ya que utiliza un criterio de optimalidad, con la desventaja de ser muy lento y computacionalmente demandante, dado que optimiza la longitud de las ramas por cada rearrreglo. Además, si el modelo evolutivo utilizado es incorrecto, posiblemente el árbol obtenido también sea incorrecto.

Para estudiar la epidemiología molecular de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII de la Provincia de Buenos Aires, durante los dos primeros años de pandemia, se utilizará la secuenciación viral seguida por el análisis de filogenia por máxima verosimilitud.

## 2. Hipótesis y Objetivos

### 2.1 Hipótesis de trabajo

La vigilancia epidemiológica activa de muestras respiratorias obtenidas en la Región Sanitaria VIII permitirá establecer los modelos de circulación viral, describir los linajes virales circulantes, y evaluar la presencia de variantes de interés (VOI) y de variantes de preocupación (VOC), o la aparición de nuevos linajes o variantes en la zona del Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

### 2.2 Objetivos generales

Describir la variabilidad genética de SARS-CoV-2, incluyendo las variantes de interés (VOI) y variantes de preocupación (VOC), en la Región Sanitaria VIII que incluye a la localidad de Mar del Plata y zonas aledañas de la Provincia de Buenos Aires, durante un período de tiempo comprendido desde el inicio de la pandemia en 2020 hasta diciembre de 2021.

### 2.3 Objetivos específicos

- 1) Identificar las muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2 provenientes de pacientes con sospecha de COVID-19 o infección respiratoria aguda, de la Región Sanitaria VIII de la Provincia de Buenos Aires, mediante amplificación por RT-qPCR, y obtener secuencias de fragmentos genómicos (región de la espícula o "S") o de genoma viral completo, por secuenciación.
- 2) Identificar los linajes y las variantes virales de SARS-CoV-2, por análisis de filogenia de las secuencias obtenidas.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Diseño y población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, a partir de una selección de muestras respiratorias de virus SARS-CoV-2 obtenidas de pacientes con sospecha de COVID-19 o infección respiratoria aguda (IRA), que concurren a consulta médica de forma ambulatoria o requirieron internación en Hospitales de la Ciudad de Mar del Plata o zonas aledañas de la Región Sanitaria VIII que comprende los municipios de: *General Lavalle, Maipú, Partido de La Costa, Pinamar, Villa Gesell, General Madariaga, General Guido, Ayacucho, Tandil, Balcarce, Mar Chiquita, General Pueyrredón, General Alvarado, Lobería, Necochea, San Cayetano*. Las muestras respiratorias obtenidas en los centros médicos u Hospitales fueron remitidas al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara -ANLIS para el diagnóstico virológico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. El período de estudio está comprendido entre marzo de 2020 a diciembre de 2021.

El protocolo de este estudio recibió la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara -ANLIS. Ver ANEXO I (Código: CIMMINO 04/2021).

#### 3.2 Criterios de inclusión y exclusión

##### 3.2.1 Criterios de inclusión

Muestras respiratorias de niños/as o de adultos, con o sin patologías de base, ambulatorios o internados con IRA compatible con COVID-19, definido como la presencia de signos y síntomas tales como fiebre (37,5°C o más) y/o tos y/u odinofagia y/o dificultad respiratoria y/o cefalea y/o mialgias y/o diarrea/vómitos y/o rinitis/congestión nasal, sin otra etiología que explique completamente la presentación clínica. Pérdida repentina del olfato o del gusto, en ausencia de cualquier otra causa identificada. Los datos demográficos y clínicos de los pacientes se encuentran en el Sistema SISA.

##### 3.2.2 Criterios de exclusión

No hay criterios de exclusión al estudio.

### 3.3 Diagnóstico de SARS-CoV-2

#### 3.3.1 Muestras respiratorias

Las muestras respiratorias se colectaron en distintos centros de atención de salud y Hospitales de la Región Sanitaria VIII, y se recibieron en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Epidemiología, Dr. J. H. Jara-ANLIS. Las mismas fueron obtenidas por personal de salud debidamente entrenado siguiendo las instrucciones de bioseguridad, que incluye el uso del equipo de bioseguridad apropiado para la toma de muestras de virus respiratorios (CDC, 2020). Las muestras respiratorias obtenidas eran hisopados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, aspirados traqueales o lavados bronco-alveolares, según criterio médico. Estas muestras se conservaron en heladera (4-8°C) hasta su envío al Laboratorio, y fueron procesadas dentro de los 24-72 horas de su colección.

#### 3.3.2 Extracción de material genético viral

De las muestras de secreciones respiratorias se tomaron 200 uL y se realizó la extracción del ARN viral mediante columnas de extracción de forma manual (AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit) o automatizada (Tiangen S32 Magnetic Viral DNA/RNA KIT), dependiendo de los reactivos y el equipamiento disponible. El procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. El material genético viral se eluyó en 70-50 uL y se alicuotó en un tubo eppendorf que se conservó hasta su utilización en UltraFreezers -80°C, con control de acceso y biocustodia.

#### 3.3.3 RT-PCR para detección de virus SARS-CoV-2

Para la detección del virus SARS-CoV-2 se utilizó el kit comercial qScript XLT 1-Step RT-qPCR ThoughtMix (QuantaBio, CN 95132), que se basa en el protocolo de RT-qPCR recomendado por la OMS (V. Corman et al., n.d.; V. M. Corman et al., 2020a) que amplifica una región del gen E (envoltura) y del gen RdRp (RNA polimerasa viral RNA dependiente) y realiza la detección con uso de sondas fluorescentes en un termociclador BioRad cfx96.

Brevemente, el protocolo del kit comercial qScript XLT 1-Step RT-qPCR ThoughtMix consiste en una mezcla de reacción que contiene: 2X *Master Mix* concentrado de un solo paso que contiene: Tampón de reacción con concentraciones optimizadas de MgCl<sub>2</sub> de grado molecular, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, transcriptasa inversa qScript XLT, Proteína inhibidora de RNasa, ADN polimerasa AccuStart II Taq, Tinte de carga de placas AccuVue™ inerte, estabilizadores de enzimas y aditivos que mejoran el rendimiento. El protocolo se realizó en un volumen de 20 ul de reacción. Se usan 10 ul de la mezcla de reacción (2X Master Mix) se



agregan 0.8 ul de solución de cebadores *Forward* con concentración 10 uM y 0.8 ul de cebadores *Reverse* 10 uM y 0.4 ul de Sonda Fluorescente (FAM) con concentración 10 uM, 3 ul agua bidestilada estéril y 5 uL de ARN viral extraído de las muestras respiratorias.

Las condiciones de ciclado utilizadas en el termociclador fueron: 50 °C por 15 minutos (síntesis de cDNA), 95 °C por 2 minutos (desnaturalización anticuerpo anti-Taq Polimerasa), 95 °C por 10 segundos (apertura de la doble cadena), 60 °C por 30 segundos (hibridación de los cebadores con la secuencia blanco y extensión de cadena), repetición de 60°C a 95 °C por 45 ciclos. La visualización de las curvas de los productos amplificados en tiempo real permite el registro de un valor de Ct para aquellas positivas para SARS-CoV-2, que correlaciona con la cantidad de virus presente en la muestra: menor valor de Ct indica mayor cantidad de virus presente. El valor de validación de Ct establecido por el Laboratorio Nacional de Referencia Malbrán-ANLIS fue considerar como positivas para SARS-CoV-2 aquellas muestras con un Ct menor a 37.

### 3.4 Secuenciación y procesamiento bioinformático de secuencias de SARS-CoV-2

#### 3.4.1 Selección de muestras para obtención de genomas por secuenciación

Para realizar el estudio de la vigilancia epidemiológica molecular de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, el INE J. H. Jara-ANLIS participó en el Proyecto Argentino Interinstitucional de genómica de SARS-CoV-2 – PAIS (Dra. Mariana Viegas del Hospital Gutiérrez), y de la vigilancia genómica realizada por el Laboratorio de Virosis Respiratorias, (Dras. Elsa Baumeister y Andrea Pontoriero) y el Servicio de Secuenciación y Genómica (Dra. Josefina Campos), del Instituto Malbrán-ANLIS, ambos en Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica molecular en nuestra Región Sanitaria VIII se seleccionaron muestras positivas para SARS-CoV-2 representativas la región y del período de estudio comprendido entre marzo de 2020 a diciembre de 2021, cuyos valores de Ct hayan sido menores a 30 en la RT-qPCR utilizada para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Las muestras enviadas a secuenciar no corresponden a un conglomerado de casos, sino que provienen de casos no relacionados o bien de relación desconocida, y representan diferentes grupos de edad, sexo, criterios de gravedad (internados, ambulatorios), vacunados o no vacunados, viajeros.

Todos los casos estudiados por secuenciación genómica de SARS-CoV-2 fueron notificados con modalidad nominal al evento “Vigilancia genómica de SARS-CoV-2” del Sistema Nacional de Vigilancia SNVS consignando la identificación de linaje y/o mutaciones de interés halladas.

#### 3.4.2 Secuenciación de SARS-CoV-2

El procedimiento de la secuenciación de los genomas virales se llevó a cabo en el Hospital Gutiérrez, en el marco del Proyecto PAIS, y en el Instituto Malbrán-ANLIS. Ambos Institutos cuentan con la infraestructura, equipamiento, reactivos y personal necesario para llevar a cabo la tarea. Las secuencias de esta tesis se realizaron con los Subsidios otorgados a la Dra. Mariana Viegas, quien recibió el subsidio FONARSEC IP COVID-19 N° 247, y la Dra. Elsa Baumeister con el Subsidio MinCyt N°13 IP COVID-19 N° 786.

La secuenciación del genoma completo de SARS-CoV-2 se realizó siguiendo el protocolo recomendado por la OMS y el CDC (<https://artic.network/ncov-2019>), (Lambisia et al., 2022). Este protocolo se siguió durante todo el primer año de la pandemia y continuó también durante el segundo año. Sin embargo, durante el desarrollo del segundo año de la pandemia, debido al gran número de muestras para secuenciar y a la disponibilidad de equipamiento, recursos económicos y humanos, en el Proyecto PAIS se comenzó a utilizar la estrategia de secuenciar el fragmento 29 del par de *primers*/cebadores recomendados por el CDC: codones S\_428 a S\_750 del gen S para identificar mutaciones marcadoras e identificar variantes virales circulantes, en lugar de secuenciar todo el genoma completo.

#### 3.4.3 Visualización y edición de secuencias genómicas de SARS-CoV-2

Las secuencias de nucleótidos de SARS-CoV-2 obtenidas por ambos proyectos se visualizaron y editaron manualmente utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Como secuencias de referencia utilizamos secuencias de genomas de SARS-CoV-2 descargadas de la Base de Datos GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). El alineamiento de las secuencias de SARS-CoV-2 se realizó con el programa MAFFT (Kato et al., 2019).

#### 3.4.4 Clasificación de secuencias genómicas de SARS-CoV-2

Para la determinar a qué linaje pertenece cada una de las secuencias de genomas completos de SARS-CoV-2 obtenidas se utilizaron los programas *on-line* Pangolin (<https://cov-lineages.org/>) y Covidex (<http://covidex.unlu.edu.ar/>). Para clasificar las secuencias de la región parcial de S, se visualizaron las posiciones nucleotídicas marcadoras de cada linaje en cada secuencia, comparándolas junto a secuencias de referencia en un alineamiento.

### 3.4.5 Análisis de filogenia de SARS-CoV-2

Para la construcción del alineamiento con nuestras secuencias se utilizaron secuencias de referencia descargadas de GISAID, de diferentes linajes de SARS-CoV-2 incluyendo aquellos estimados por Pangolin y Covidex para nuestras secuencias de estudio. Para realizar el análisis de filogenia y poder enraizar el árbol, se utilizaron secuencias de referencia que incluyeron la cepa original de Wuhan y otras secuencias relacionadas.

Para el análisis de filogenia se utilizó el método de máxima verosimilitud empleando el programa IQTree (Guindon et al., 2010; Kozlov et al., 2019; Minh et al., n.d.; L.-T. Nguyen et al., 2015; Stamatakis, 2014). Para estimar el modelo evolutivo necesario para realizar el análisis por máxima verosimilitud, se utilizó el programa JModelTest (Darriba et al., 2012). El soporte estadístico de los agrupamientos se evaluó por medio de remuestreo o *bootstrapping* (1000 pseudoréplicas).

## 3.5 Análisis de datos clínico-epidemiológicos

### 3.5.1 Registro de variables y obtención de datos

Para las muestras respiratorias de los pacientes con diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 con datos demográficos (edad: en años; sexo: femenino/masculino; presencia de patología de base: si [cuál]/no; embarazo: si/no) y/o clínicos (fecha de inicio de síntomas: dd/mm/aaaa; historial de fiebre: si/no; astenia: si/no; malestar general: si/no; náuseas: si/no, taquipnea: si/no; tos: si/no; apnea si/no; bronquitis: si/no; laringotraqueítis: si/no; neumonía: si/no; pérdida repentina de gusto: si/no; pérdida repentina de olfato: si/no; internación: si [cuántos días]/no; requerimiento de internación en terapia intensiva: si [cuántos días]/no; evolución de la infección: recuperado, recuperado con secuelas, óbito) disponibles contenidos en fichas epidemiológicas del sistema SISA.

Se procedió a la descarga de datos demográficos y clínicos completos en las fichas y disponibles en SISA del sitio <https://sisa.msal.gov.ar/sisa/>, y los mismos se registraron anonimizados en una planilla de MS Excel. Las tablas obtenidas desde SISA se ensamblaron con los datos internos del laboratorio que contienen los resultados del diagnóstico de SARS-CoV-2 y la tipificación viral en una planilla de MS Excel. Los síntomas y diagnósticos clínicos registrados fueron considerados como figuran en la ficha epidemiológica disponible y fueron definidos por los médicos tratantes al momento de la evaluación clínica del paciente, de acuerdo con las definiciones de cada Centro hospitalario participante. Todas las variables fueron definidas de manera dicotómica como presencia o ausencia de la característica (si ó

no), con la excepción de aquellas variables continuas como edad (meses en menores de 1 año, o años) y días de internación (días).

### 3.5.2 Análisis de datos

Todos los datos se analizaron en MS Excel, y las estadísticas se calcularon con el programa Epidat V4.2 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS); Universidad CES, Colombia) y con el programa STATA 12 (Statacorp, College Station, TX, USA).

Se calcularon estadísticas descriptivas para las variables demográficas y clínicas completas y disponibles en SISA: para las variables continuas se calcularon medianas y sus correspondientes primer y tercer cuartil; para las variables categóricas se calcularon frecuencias absolutas, proporciones y sus intervalos de confianza 95% (IC95%). Las asociaciones entre variables fueron realizadas mediante el ensayo X<sup>2</sup> o la prueba exacta de Fisher. Las frecuencias virales se expresaron como proporción, y se incluyó el IC95%, para indicar la inferencia en la población teórica que posee iguales características que la muestra. Los intervalos de confianza de las frecuencias se calcularon por el método de Wilson. La amplitud del intervalo permite tener una medida de la precisión de la estimación de la frecuencia obtenida. En todos los casos se tomó nivel de significancia 5% ( $\alpha=0,05$ ).

La recolección de datos, procesamiento de muestras (hisopados nasofaríngeos), extracción de ARN viral, preparación de reactivos, reacciones y puesta a punto de RT-qPCR en tiempo real, análisis de datos e informes fueron llevados adelante por personal del Laboratorio del INE-J. H. Jara en los que el maestrando intervino directamente. Las muestras respiratorias SARS-CoV-2 detectables se seleccionaron, colectaron y enviaron a secuenciar a las Plataforma de Genómicas del Instituto Carlos Malbrán-ANLIS y del Proyecto PAIS en colaboración entre el maestrando y los responsables de ambas plataformas. La edición de las secuencias virales, asignación de linajes y los análisis filogenéticos, junto a los análisis clínico- epidemiológicos se llevaron adelante por el maestrando y el equipo de investigación con la supervisión de los directores de esta tesis, Dr. Uez y Dra. Marcone, y la colaboración del Dr. Campos y Dr. Culasso de la cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

## 4. Resultados

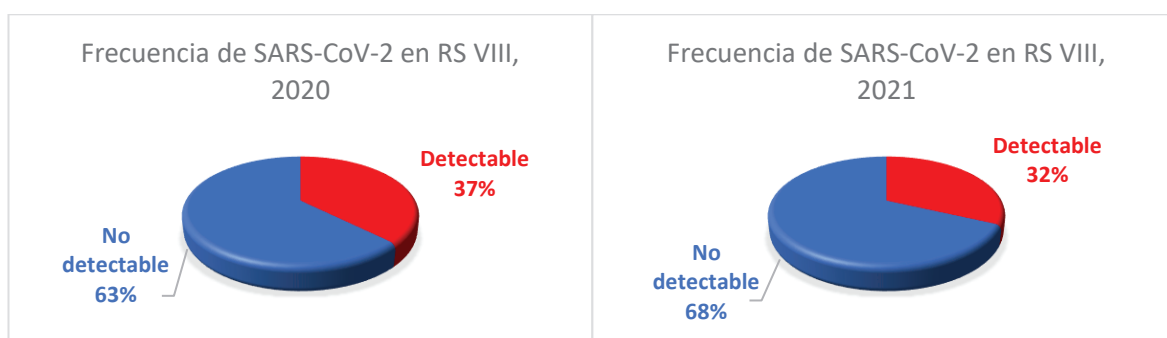
### 4.1 Epidemiología de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, Prov. De Buenos Aires.

Desde marzo de 2020, mes en el cual comenzaron los primeros casos sospechosos de SARS-CoV-2 en nuestra región, al 31 de diciembre de 2021, se recibieron en el Laboratorio de Virología del INE-J. H. Jara –ANLIS de la Ciudad de Mar del Plata, 120421 muestras respiratorias (hisopados /aspirados nasofaríngeos) provenientes de Hospitales de los municipios que conforman la Región Sanitaria VIII de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

La frecuencia de positividad de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en nuestra región, durante el período de estudio de dos años fue de 34.7%, significativamente mayor durante 2020 que durante 2021: en 2020, de un total de 60401 muestras respiratorias estudiadas, 22603 (37.42%) se confirmaron positivas para SARS-CoV-2 (**Tabla R1** y **Figura R1**); mientras que, de enero a diciembre 2021, de las 60020 muestras respiratorias recibidas, 19148 (31.90%) se confirmaron positivas para SARS-CoV-2 ( $p < 0,001$ ).

**Tabla R1.** Número de muestras respiratorias analizadas en el INE-J. H. Jara –ANLIS durante el periodo marzo 2020 a diciembre 2021.

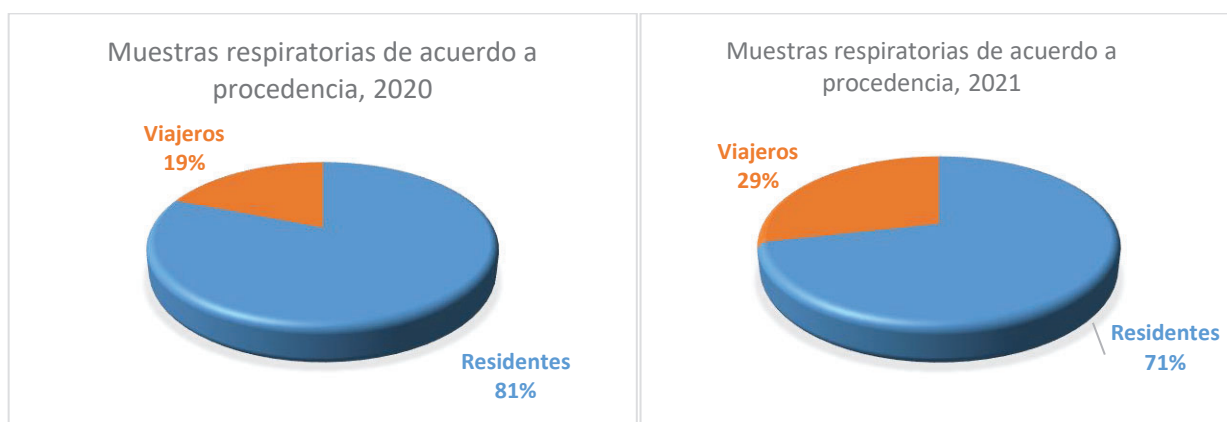
	Total muestras estudiadas	SARS-CoV-2	
		Detectable	No detectable
		n (%)	n (%)
2020	60401	22603 (37.4%)	37798 (62.6%)
2021	60020	19148 (31.9%)	40872 (68.1%)
Total	120421	41751 (34.7%)	78670 (65.3%)



**Figura R1.** Frecuencia de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, 2020-2021.

Los 16 municipios que conforman la Región Sanitaria VIII tienen distintas particularidades respecto a las actividades que se desarrollan en ella, como ser la actividad agroindustrial y el turismo. Podemos reconocer una región costera con playas, que abarca los municipios de la Costa, Pinamar, Villa Gesell, Mar Chiquita, General Pueyrredón (Mar del Plata y Batán), Miramar, Necochea; una región serrana turística en las sierras de Balcarce y Tandil; la actividad agroindustrial se desarrolla en los municipios de Balcarce, General Lavalle, Maipú, General Madariaga, General Guido, General Pueyrredón, Ayacucho, Tandil, Balcarce, Lobería, Necochea, San Cayetano.

Por este motivo y por la dinámica de transmisión del SARS-CoV-2 asociada a los viajeros, diferenciamos las muestras respiratorias que provenían de habitantes de la Región Sanitaria VIII (residentes) de aquellas provenientes de personas en tránsito (viajeros), a partir de la información disponible en SISA. En 2020, de las 60401 muestras estudiadas, 48922 (81.00%) provenían de residentes de nuestra región; mientras que, en 2021, de las 60020 muestras estudiadas, 42989 (71.47%) eran de residentes de nuestra región (**Figura R2 y Tabla R2**).



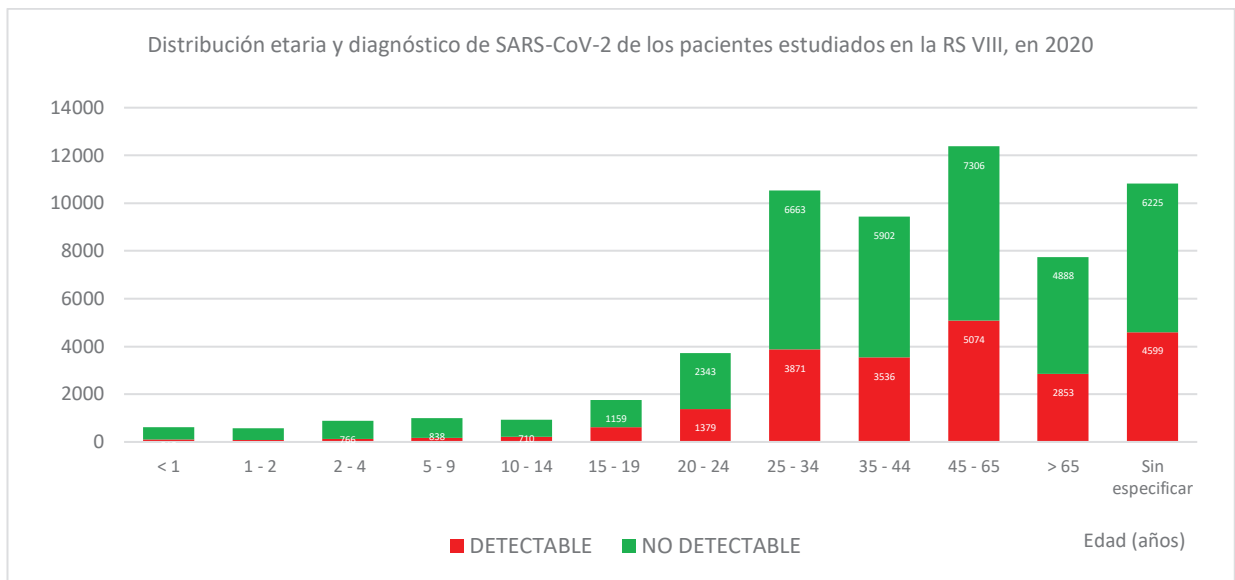
**Figura R2.** Muestras respiratorias estudiadas para SARS-CoV-2 por RT-qPCR, de acuerdo con la procedencia del caso sospechoso: residente de la Región Sanitaria VIII o viajeros, 2020-2021.

**Tabla R2.** Detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, de acuerdo con la procedencia de los casos sospechosos: personas residentes de la Región Sanitaria VIII o viajeros; marzo 2020 a diciembre 2021.

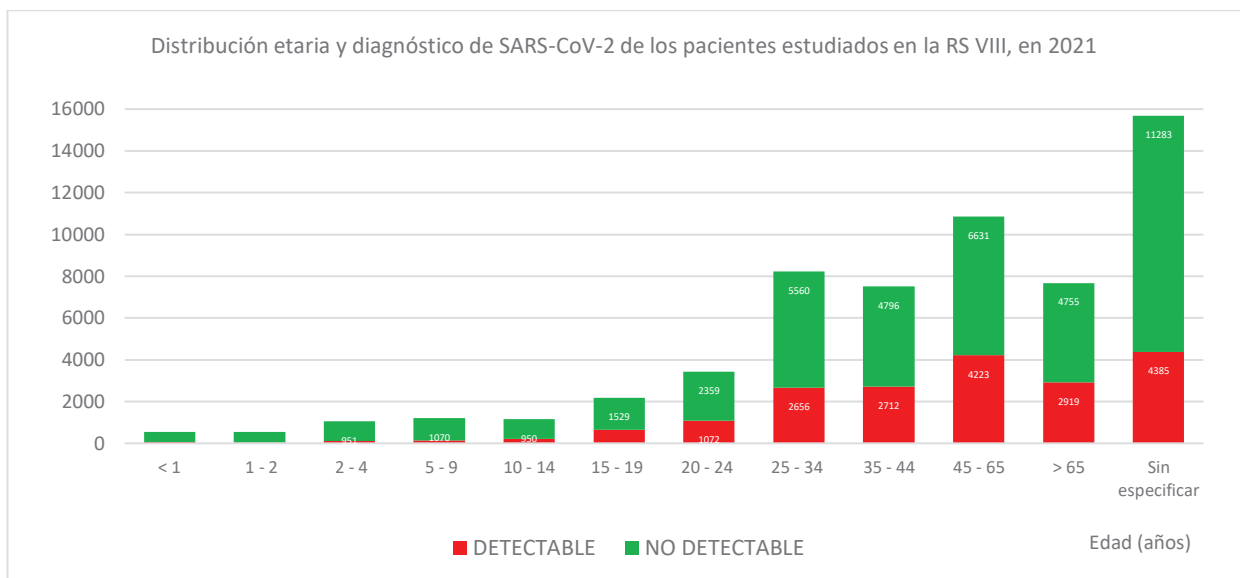
	Residentes Región Sanitaria VIII			Viajeros			p
	SARS-CoV-2			SARS-CoV-2			
	Total	Detectable n (%)	No detectable n (%)	Total	Detectable n (%)	No detectable n (%)	
2020 (n=60401)	48922	17816 (36,4%)	31106 (63,6%)	11479	4787 (41,7%)	6692 (58,3%)	<0,001
2021 (n=60020)	42898	14346 (33,4%)	28552 (66,6%)	17122	4802 (28,0%)	12320 (72,0%)	<0,001
Total (n=120421)	91820	32162 (35,0%)	59658 (65,0%)	28601	9589 (33,5%)	19012 (66,5%)	<0,001

Durante ambos años de estudio, la mayoría de las muestras estudiadas eran de residentes en nuestra región, y la mediana de positividad para SARS-CoV-2 fue 35%. Durante 2020 detectamos en los viajeros una mayor frecuencia de positividad para SARS-CoV-2 (42%), significativamente superior a la frecuencia observada tanto en los residentes como incluso en los viajeros durante 2021 (28%). Dentro del grupo de residentes, el mayor número de casos sospechosos estudiados en nuestro laboratorio fueron procedentes de la ciudad de Mar del Plata.

Posteriormente realizamos el análisis de frecuencia de SARS-CoV-2 de acuerdo con los grupos etarios (**Figuras R3 y R4**). El rango de edades de los casos sospechosos estudiados comprendió desde neonatos (menores de un mes) hasta mayores de 65 años, siendo la máxima edad un paciente de 106 años. La mayoría de las muestras estudiadas fueron de adultos mayores de 19 años. Durante ambos años, observamos que el rango etario con mayor número de muestras estudiadas y con resultado de SARS-CoV-2 detectable fue de 45 a 65 años. Lamentablemente, para un número importante de muestras fue imposible obtener el dato preciso de la edad del paciente, lo que se observa en los gráficos bajo la categoría de edad sin especificar.



**Figura R3.** Casos estudiados y confirmados por RT-qPCR para SARS-CoV-2 según rango etario, en la Región Sanitaria VIII durante 2020.

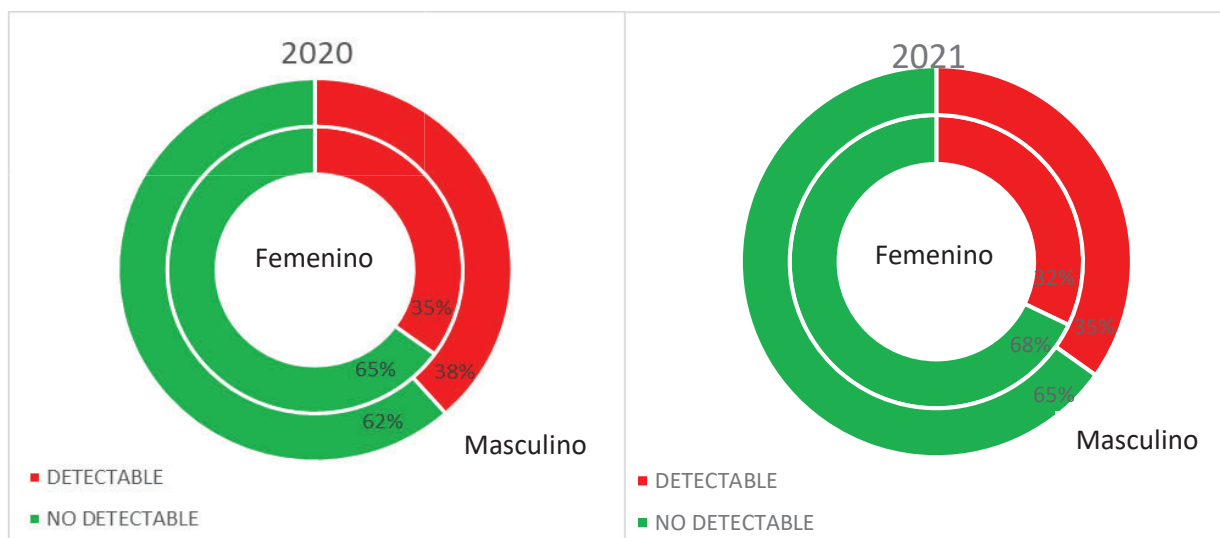


**Figura R4.** Casos estudiados y confirmados por RT-qPCR para SARS-CoV-2 según rango etario, en la Región Sanitaria VIII durante 2021.

Luego, realizamos el análisis de la frecuencia de SARS-CoV-2 de acuerdo con el sexo de los pacientes para los dos años estudiados. Durante 2020 y 2021, el 59% de las muestras estudiadas fueron de pacientes femeninas. Sin embargo, si bien se analizaron más muestras de personas de sexo femenino, la proporción de muestras detectables para SARS-CoV-2 fue mayor en los pacientes de sexo masculino que en las pacientes femeninas: en 2020 detectamos 38% (IC95%: 37,8-39,1%) de positividad en hombres versus 35% (IC95%: 34,4-



35,5%) en mujeres ( $p < 0,001$ ), mientras que en 2021 detectamos 35% (IC95%: 34,2-35,5%) de positividad en hombres versus 32% (IC95%: 31,5-32,7%) en mujeres ( $p < 0,001$ ) (**Figura R5**).



**Figura R5.** Frecuencia de positividad de SARS-CoV-2 por sexo, en la Región Sanitaria VIII, 2020 y 2021.

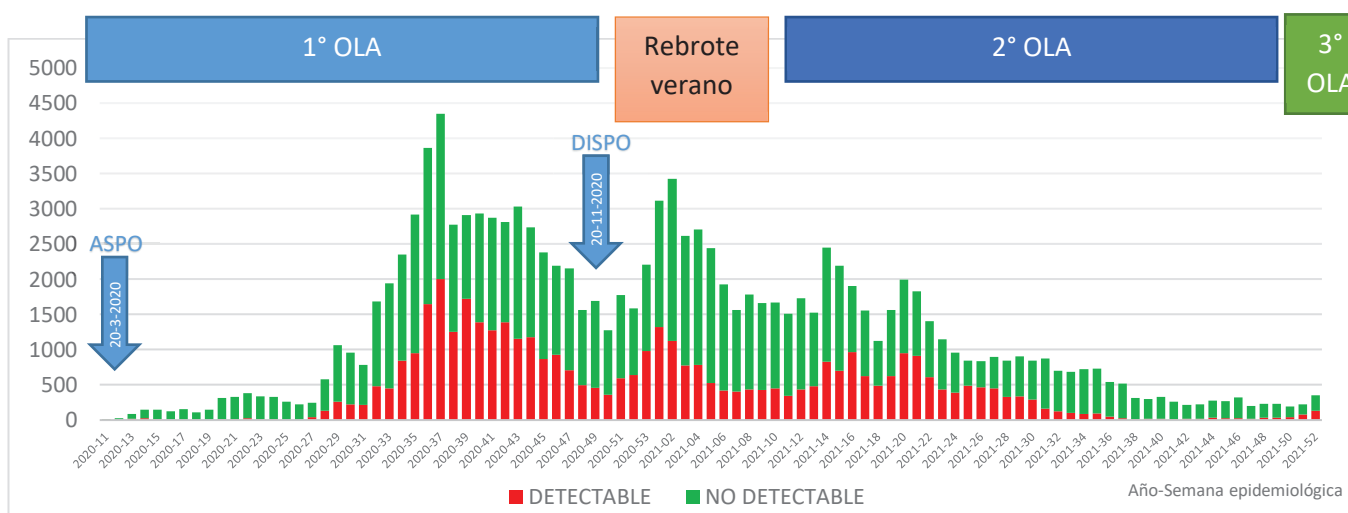
Finalmente, realizamos el análisis de la frecuencia de SARS-CoV-2 de acuerdo con las SE de ambos años (**Figura R6**). Durante el periodo comprendido entre marzo a diciembre 2020, en la Región Sanitaria VIII detectamos los primeros casos de SARS-CoV-2 en la SE 11 de 2020. Los casos sospechosos y positivos comenzaron a aumentar a partir de la SE 28 en forma exponencial. En la SE 37 observamos un pico de casos en nuestra región, y luego un amesetamiento y posterior disminución, tanto en el total de casos como en la frecuencia de positividad, hasta la SE 50. A partir de aquí, observamos un leve aumento hasta finalizar el año 2020.

Durante el periodo comprendido de enero a diciembre 2021 (**Figura R6**), en la Región Sanitaria VIII, se observó un pico de casos en la SE 2 y luego, tanto los casos sospechosos como los positivos descendieron, hasta la SE 13. En la SE 14 comenzó el aumento de casos sospechosos y positivos de SARS-CoV-2, que luego fue descendiendo hacia la SE 18. A partir de la SE 19 observamos un nuevo aumento, con pico en la SE 20 que luego fue descendiendo, también tanto en los casos sospechosos, no detectables y detectables. A partir de la SE 36 la mayoría de los casos estudiados fueron no detectables para SARS-CoV-2, a excepción de las

últimas semanas del año, SE 50 -SE 52, en donde comenzamos a ver un leve incremento en el número de casos sospechosos y detectables.

Al visualizar el período de estudio de dos años en conjunto en la **Figura R6**, se pueden ver las olas de SARS-CoV-2 en nuestra región. A partir del número de casos analizados en función de las SE, podemos determinar las dos olas y el rebrote de verano 2020-2021 que ocurrieron en la Región Sanitaria VIII: desde el inicio de la primera ola durante 2020, se ve el pico de casos confirmados en la SE 37. En el verano 2020-2021, se ve un rebrote de casos; y luego, la segunda ola durante 2021, de la SE 10 a 43.

Se incluyó en la **Figura R6** la fecha en la que se establecieron para Argentina los decretos de Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) y Distanciamiento Social Preventivo y Obligatorio (DISPO), en marzo y noviembre de 2020, respectivamente. También se pueden ver los distintos picos de casos registrados en la Región Sanitaria VIII durante las dos olas observadas y el rebrote de verano, y finalmente el inicio de la tercera ola durante las últimas SE de 2021.



**Figura R6.** Distribución de muestras estudiadas para SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, durante 2020-2021. Se indica con una flecha el momento del decreto de Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) el 20 de marzo, en la SE 12 del 2020 y el Distanciamiento Social Preventivo y Obligatorio a partir del 20 de noviembre del 2020, SE 49. Esta última medida permitió una mayor circulación en los lugares turísticos.

Se puede observar que las medidas de aislamiento implementadas por el ASPO, lograron retrasar el aumento exponencial de casos en nuestra Región Sanitaria VIII de marzo donde detectamos los primeros casos a julio. Luego del fin del ASPO y comienzo del DISPO, los casos

volvieron a aumentar en lo que resultó en el rebrote de verano, con un alto número de casos diarios, pero que duró solo hasta inicios de marzo. Luego el comienzo de la tercera ola en donde el número de casos estudiado y detectado fue menor que la primera ola e incluso que el rebrote de verano. Y finalmente el leve incremento en las últimas SE 50-52 que coincidieron con la tercera ola en nuestra Región y en todo el país.

Ante la falta de datos demográficos clínicos en SISA para todos los pacientes cuyas muestras respiratorias fueron estudiadas en este proyecto, que incluyeran los antecedentes, los signos y síntomas y la evolución del cuadro que nos permitiera conocer quienes se recuperaron de la infección o quienes fallecieron, no pudieron realizarse los análisis que permitieran completar la descripción de la epidemiología clínica de SARS-CoV-2 en la población estudiada de la Región Sanitaria VIII.

## 4.2 Epidemiología molecular de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII, 2020-2021

### 4.2.1 Secuencias genómicas estudiadas

A partir de las 41751 muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2 detectadas por RT-qPCR provenientes de la Región Sanitaria VIII durante el período estudiado (marzo 2020 a diciembre 2021), se secuenciaron 48/22603 (0,2%) del año 2020 y 402/19148 (2,1%) del año 2021, que cumplían con el requisito de tener un Ct menor a 30 y ser representativas de las distintas SE, para su envío a las plataformas de vigilancia genómica del Proyecto PAIS, en el Hospital Gutiérrez, y el Instituto Malbrán-ANLIS, ambos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

De las 48 muestras enviadas a secuenciar del año 2020, se secuenciaron satisfactoriamente un total de 22 genomas completos de SARS-CoV-2; de las 402 muestras del año 2021, se secuenciaron satisfactoriamente 349: un total 235 genomas completos y 114 secuencias parciales de la región S (correspondiente al fragmento 29 del par de *primers*/cebadores recomendados por el CDC utilizado para la vigilancia de variantes: codones S\_428 a S\_750, (Torres et al., 2021) , (CDCgov/SARS-CoV-2\_Genomic\_Surveillance).

Las secuencias obtenidas fueron denominadas de acuerdo con la nomenclatura internacional que consiste en indicar el virus, el país de aislamiento de la muestra, el número que identifica la muestra y el año:

\* Secuencias obtenidas en el marco del Proyecto PAIS: hCoV-19/Argentina/PAIS-IDmuestra/año. Ej: hCoV-19/Argentina/PAIS-A0728/2020

\* Secuencias obtenidas por el Instituto Malbrán-ANLIS: hCoV-19/Argentina/INEIIDmuestra/año. Ej: hCoV-19/Argentina/INEI110385/2021

Las secuencias de la Región Sanitaria VIII de este proyecto se encuentran depositadas en la base de datos de GISAID: EPI\_SET\_230118fd.

Como secuencias de referencia para los análisis de filogenia, se incorporaron a los alineamientos secuencias de diferentes linajes y locaciones geográficas, obtenidas a partir de la búsqueda en GISAID: EPI\_SET\_230118qp.

#### 4.2.2 Procesamiento informático

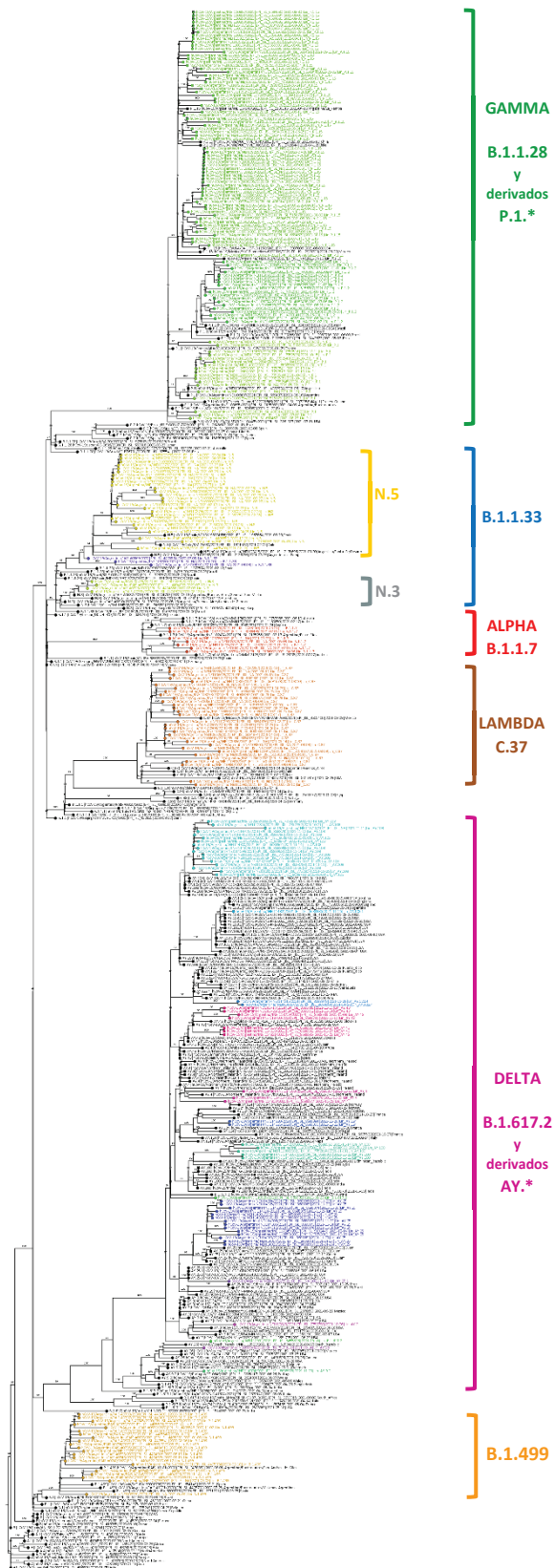
Las secuencias de los genomas completos virales fueron visualizadas con el programa BioEdit para identificar indeterminaciones y eliminar los extremos 5' (inicio: AGATCTG) y 3' (fin: TGCTATCC) para una longitud total en el rango de 29288-29786 nucleótidos. Luego, las secuencias se corrieron en el programa Pangolin versión *on-line* para tener una asignación rápida de linajes. Además, las secuencias de nuestra Región Sanitaria VIII se alinearon con el programa MAFFT *on-line*, junto a las secuencias de referencia, y se realizó el análisis de filogenia que nos permitió confirmar los linajes presentes en nuestra región. Esto se debe a que la herramienta Pangolin puede realizar alguna asignación errónea, y entonces podemos utilizar la filogenia para definir los linajes presentes, de acuerdo con el agrupamiento de nuestras secuencias de estudio con las referencias. Pangolin fue desarrollada originalmente en enero de 2020 por Rambaut et al., poco después de la aparición del SARS-CoV-2 (Lemey et al., 2020). La herramienta se ha actualizado regularmente para incorporar nuevas variantes del virus. Hay posibles errores en la asignación de variantes en la bibliografía de la herramienta Pangolin. En el artículo original que describe la herramienta, los autores identifican los posibles errores de secuenciación. Estos errores pueden afectar a la capacidad de Pangolin para identificar correctamente las variantes. Las mutaciones silenciosas son mutaciones que no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína del virus y pueden pasar desapercibidas por Pangolin y dar lugar a una clasificación errónea de la variante. También la recombinación puede dar lugar a variantes que no se ajustan a ninguna de las categorías definidas por Pangolin.

Para los análisis de filogenia, debido a la gran cantidad de linajes de SARS-CoV-2 circulantes, realizamos una selección de las secuencias de referencia teniendo en cuenta los linajes que asignó el programa Pangolin a nuestras secuencias de estudio, los linajes circulantes en Argentina durante los años de nuestro estudio que fueron reportados por el Proyecto PAIS y el Instituto Malbrán-ANLIS, y secuencias de linajes circulantes al inicio de la pandemia, incluyendo la primera secuencia de SARS-CoV-2, que utilizamos como grupo externo o *outgroup*. Consideramos que nuestras secuencias pertenecían a un linaje de SARS-CoV-2 determinado, si agrupaban junto a las secuencias de referencia de dicho linaje con un valor de *bootstrap* mayor al 70%. La composición del alineamiento utilizado para el análisis de filogenia incluyó los 257 genomas completos de SARS-CoV-2 obtenidos de nuestras muestras de estudio junto a 211 secuencias de referencia. El modelo evolutivo estimado de acuerdo con el criterio bayesiano BIC para este alineamiento fue: GTR+F+R2.

En la **Figura R7** se representa el árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido para determinar los linajes de SARS-COV-2 circulantes en la Región Sanitaria VIII en 2020 y 2021. La reconstrucción filogenética obtenida muestra 8 grupos mayoritarios, que incluyen a nuestras secuencias relacionadas con las secuencias de referencia descritas en varios lugares del mundo. Los linajes/variantes que determinamos en las muestras positivas para SARS-CoV-2 analizadas en la Región Sanitaria VIII durante los años 2020-2021 fueron: 1- Gamma (B.1.1.28 y derivados de P.1), 2- B.1.1.33, anidado en este grupo encontramos: 3- N.3 y 4- N.5, 5- Alpha (B.1.1.7), 6- Lambda (C.37), 7- Delta (B.1.617.2 y derivados AY. \*) y 8- B.1.499.

Para el análisis de las secuencias de la región parcial de S, las mismas se visualizaron en BioEdit. Se buscaron las posiciones marcadoras (mutaciones) de los distintos linajes, variantes VOC, variantes VOI, en cada una de las secuencias, para asignar los linajes y variantes (Ver Tabla en Anexo 2). Determinamos por secuenciación de la región parcial S los siguientes linajes/variantes: 1- Alpha (B.1.1.7), 2- Epsilon (B.1.427), 3- Lambda (C.37), 4- P.1, 5- NO VOC.

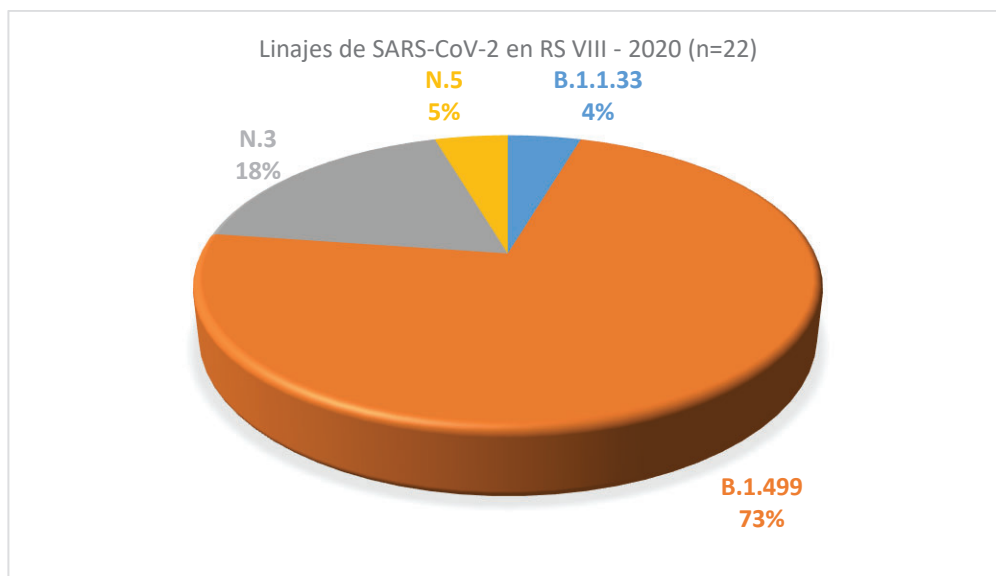
Una vez obtenidos todos los distintos linajes, ya sea por filogenia de los genomas completos o por determinación de las posiciones marcadoras de las secuencias parciales del gen S, se armó una tabla de Excel que permitió incorporar toda la información de cada secuencia con la información clínico-epidemiológica, para realizar los análisis epidemiológicos descriptivos.



**Figura R7.** Árbol de máxima verosimilitud de las secuencias de genoma completo de SARS-CoV-2 de la Región Sanitaria VIII, obtenidas durante los años 2020-2021. Las secuencias de estudio y los linajes detectados se indican en colores. Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos (1000 pseudorréplicas). Para detalles ver ANEXO 8.3.

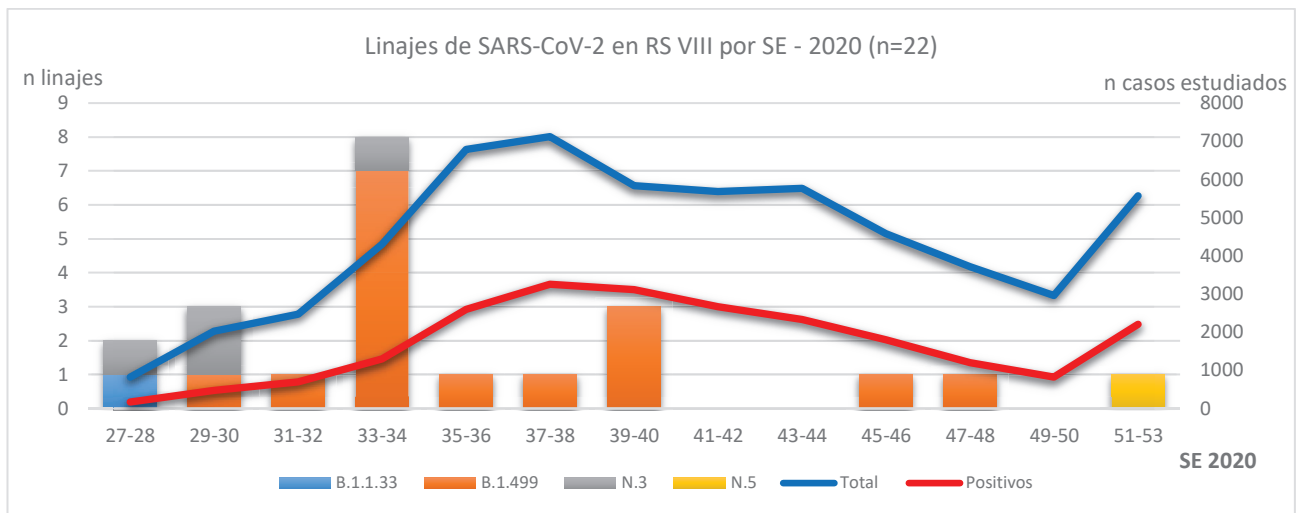
#### 4.2.3 Caracterización de linajes y variantes de SARS-CoV-2 durante 2020

Durante el año 2020 se detectaron en la Región Sanitaria VIII un total de 4 linajes diferentes de SARS-CoV-2: B.1.1.33, B.1.499, N.3 y N.5 (**Figuras R10 y R11**).



**Figura R8.** Distribución de linajes de SARS-CoV-2 circulantes en la Región Sanitaria VIII durante 2020.

Puede apreciarse en la **Figura R9** que durante el periodo comprendido entre marzo y diciembre de 2020, los primeros linajes en detectarse en la Región Sanitaria VIII fueron el B.1.1.33 y el N.3; sin embargo, luego de la introducción del linaje B.1.499 en nuestra región, este resultó ser el predominante durante el resto del año, presente en el 73% de las secuencias analizadas. Al finalizar el año 2020, realizamos la detección del linaje N.5 en circulación en nuestra región.



**Figura R9.** Distribución de linajes de SARS-CoV-2, por semanas epidemiológicas durante el año 2020. En línea azul se muestra el total de casos estudiados por RT-qPCR para SARS-CoV-2; en línea roja se muestra el total de casos confirmados positivos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

En la **Tabla R3** se pueden apreciar las frecuencias determinadas para cada linaje, con su respectivo intervalo de confianza 95%, durante las SE del año 2020. La frecuencia de positividad de B.1.499 fue la mayor, seguida por el linaje N.3, y luego por B.1.1.33 y N.5.

**Tabla R3.** Frecuencias de positividad, con sus respectivos intervalos de confianza, de los linajes de SARS-CoV-2 detectados en la Región Sanitaria VIII durante 2020.

SE	B.1.1.33		B.1.499		N.3		N.5		Total n
	Frec %	(IC95%)	Frec %	(IC95%)	Frec %	(IC95%)	Frec %	(IC95%)	
27-28	50,0%	( 9,5% - 90,5% )			50,0%	( 9,5% - 90,5% )			2
29-30			33,3%	( 6,1% - 79,2% )	66,7%	( 20,8% - 93,9% )			3
31-32			100,0%	( 20,7% - 100,0% )					1
33-34			87,5%	( 52,9% - 97,8% )	12,5%	( 2,2% - 47,1% )			8
35-36			100,0%	( 20,7% - 100,0% )					1
37-38			100,0%	( 20,7% - 100,0% )					1
39-40			100,0%	( 43,9% - 100,0% )					3
41-42									0
43-44									0
45-46			100,0%	( 20,7% - 100,0% )					1
47-48			100,0%	( 20,7% - 100,0% )					1
49-50									0
51-52							100,0%	( 20,7% - 100,0% )	1
Total	4,5%	( 0,8% - 21,8% )	72,7%	( 51,8% - 86,8% )	18,2%	( 7,3% - 38,5% )	4,5%	( 0,8% - 21,8% )	22

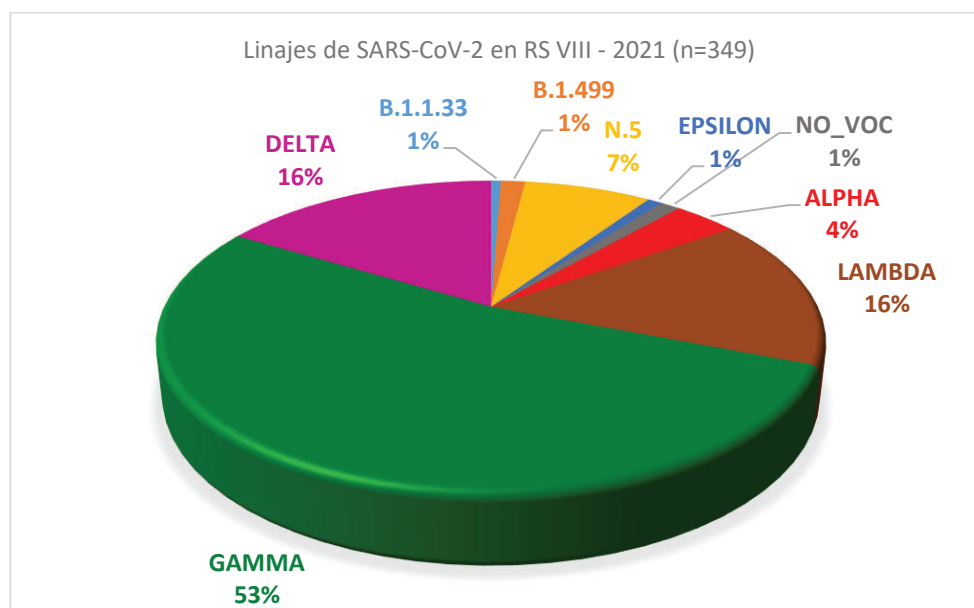
SE: Semana epidemiológica, Frec: frecuencia, IC95%: intervalo de confianza 95%. Los intervalos de confianza de las frecuencias se calcularon por el método de Wilson en el programa STATA 12 (StataCorp, TX, USA).



Si bien, los intervalos determinados por SE son amplios debido al bajo número que conforma cada categoría, cuando analizamos las frecuencias de cada linaje para todo el año 2020, estos valores de intervalo son más ajustados.

#### 4.2.4 Caracterización de linajes y variantes de SARS-CoV-2 durante 2021

Durante el año 2021 se obtuvieron satisfactoriamente por secuenciación 349 secuencias de SARS-CoV-2, y se detectaron en la Región Sanitaria VIII un total de 5 variantes de interés epidemiológico de SARS-CoV-2: las VOC Alpha, Gamma, Delta y Epsilon, y la VOI Lambda. Además, se detectaron otros linajes, como B.1.1.33, B.1.499 y N.5 que circularon en nuestra región durante 2020, y variantes que no eran de interés epidemiológico denominadas NO VOC (Figuras R12 y R13).

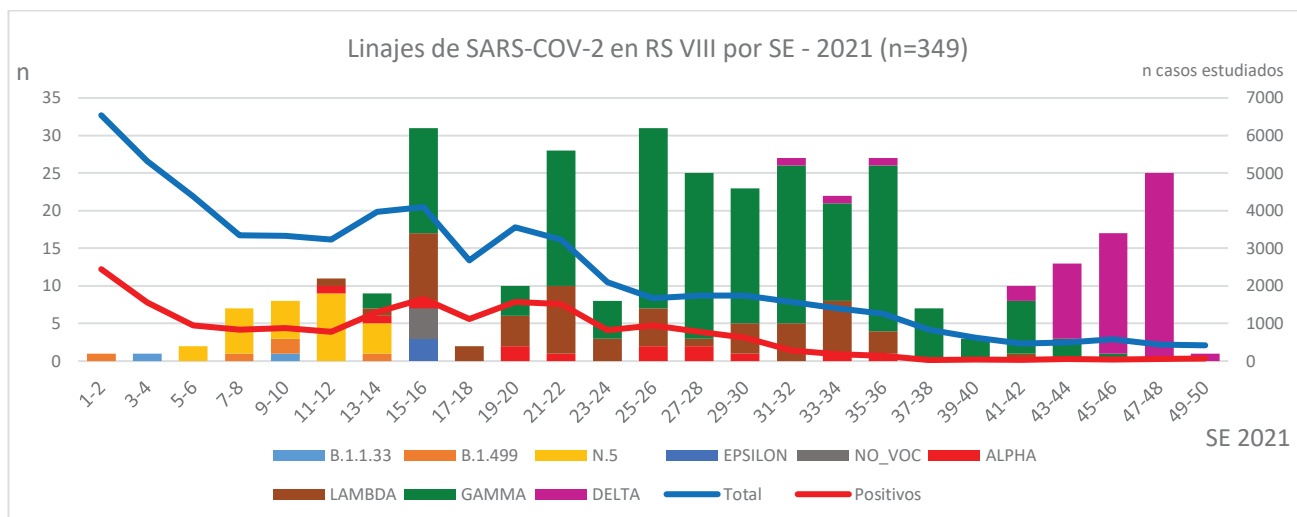


**Figura R10.** Distribución de linajes de SARS-CoV-2 circulantes en la Región Sanitaria VIII durante el año 2021.

En la **Figura R10** se aprecia la distribución de linajes de SARS-COV-2 circulantes en la Región Sanitaria VIII durante 2021. La variante de preocupación más prevalente en las muestras de la Región Sanitaria VIII fue la Gamma (53%), seguida por Delta y Lambda (ambas en un 16%), N.5 (7%), Alpha (4%), y luego en un bajo porcentaje los linajes B.1.1.33, B.1.499, Epsilon y las NO VOC, que corresponde a un grupo de linajes que ya habían estado presentes en el 2020 y que

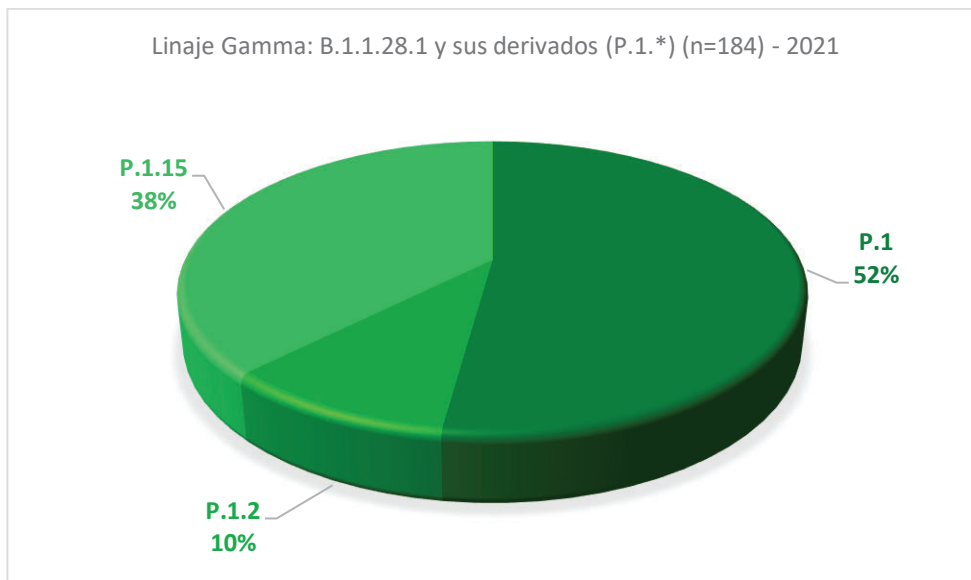
no manifestaron pertenecer a linajes de preocupación o de interés en la clasificación de la OMS, a comienzos de 2021.

Se observa en la **Figura R11** que los linajes B.1.1.33, B.1.499 y N.5 que predominaron en 2020 circularon durante las primeras semanas del 2021, durante el rebrote de verano. Luego, que las variantes Lambda y Gamma fueron predominantes en la región entre las SE 15 a 42 del año 2021, durante la segunda ola. Y que finalmente, la variante Delta, que comenzó a circular desde la SE 31, terminó desplazando a todas las otras variantes al finalizar el año.



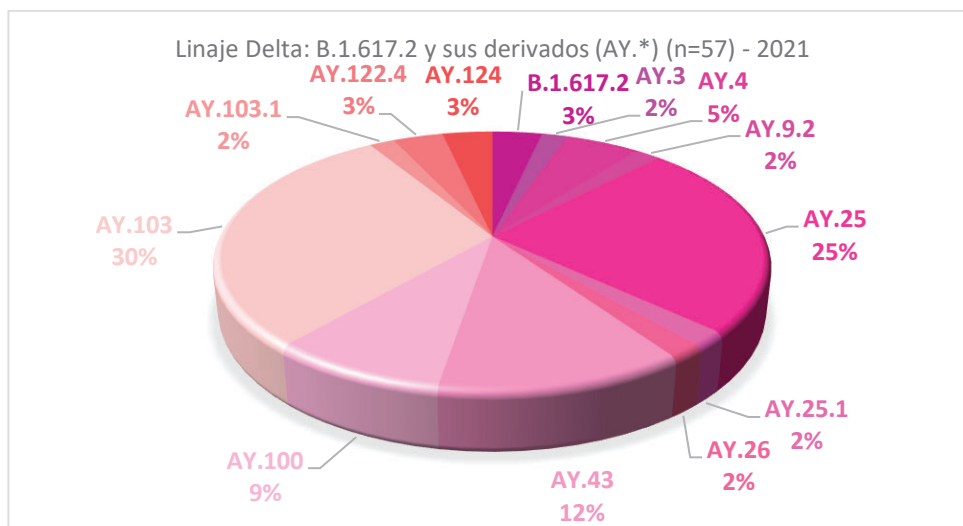
**Figura R11.** Distribución de linajes de SARS-CoV-2, por semanas epidemiológicas durante el año 2021. En línea azul se muestra el total de casos estudiados por RT-qPCR para SARS-CoV-2; en línea roja se muestra el total de casos confirmados positivos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

Para la variante VOC Gamma, la más frecuente en nuestra región durante la segunda ola, determinamos la presencia de diversos sublinajes incluyendo: P.1, el más frecuente, P.1.2 y P.1.15, este último también con alta presencia (**Figura R12**).



**Figura R12.** Distribución de la variante VOC Gamma y sus derivados en la Región Sanitaria VIII, 2021.

La variante Delta, que comenzó a circular en nuestra región a mediados de año para ser predominante al finalizar el mismo, fue la que presentó la mayor diversidad de todos los linajes y variantes detectados, detectando un total de 13 sublinajes diferentes en circulación en nuestra región (**Figura R13**).



**Figura R13.** Distribución de la variante VOC Delta y sus derivados en la Región Sanitaria VIII, 2021.

En la **Tabla R4** se pueden apreciar las frecuencias determinadas para cada linaje, con su respectivo intervalo de confianza, durante las SE del año 2021. En el periodo 2021, la frecuencia de positividad de la variante Gamma fue la mayor (52%), seguida por las variantes Delta (16%) y Lambda (15.8%), y luego por N.5 (7.4%), B.1.1.7 (3.7%), B.1.499 (1.4%), No VOC (1.1%), B.1.427(0.9%), y B.1.1.33(0.6%). Si bien, los intervalos determinados por SE son amplios debido al bajo n que conforma cada categoría, cuando analizamos las frecuencias de cada linaje para todo el año 2021, estos valores de intervalo son más ajustados.

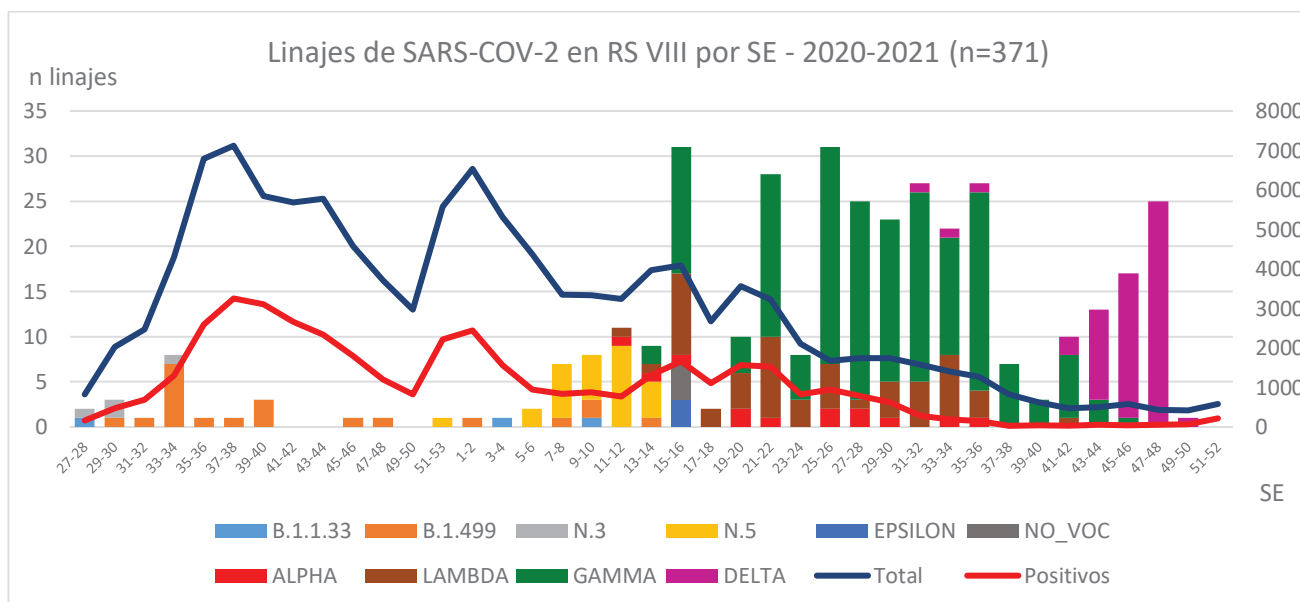
**Tabla R4.** Frecuencias de positividad, con sus respectivos intervalos de confianza, de los linajes de SARS-CoV-2 detectados en la Región Sanitaria VIII durante 2021.

SE	B.1.1.33	B.1.499	N.5	Epsilon - B.1.427	NO VOC	Alpha - B.1.1.7	Lambda - C.37	Gamma - P.1 y P.1*	Delta - B.1.617.2 y AY*	Total
2021	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	Frec % (IC95%)	n
1-2	100,0% ( 20,7% - 100,0% )									1
3-4	100,0% ( 20,7% - 100,0% )									1
5-6		100,0% ( 34,2% - 100,0% )								2
7-8		14,3% ( 2,6% - 51,3% )	100,0% ( 48,7% - 97,4% )							7
9-10	12,5% ( 2,2% - 47,1% )	25,0% ( 7,1% - 59,1% )	62,5% ( 30,6% - 86,3% )							8
11-12		11,1% ( 0,3% - 48,2% )	81,8% ( 52,3% - 94,9% )			9,1% ( 1,6% - 37,7% )	9,1% ( 1,6% - 37,7% )			11
13-14			44,4% ( 18,9% - 73,3% )			11,1% ( 2,0% - 43,5% )	11,1% ( 2,0% - 43,5% )	22,2% ( 6,3% - 54,7% )		9
15-16				9,7% ( 3,3% - 24,9% )	12,9% ( 5,1% - 28,9% )	3,2% ( 0,6% - 16,2% )	29,0% ( 16,1% - 46,6% )	45,2% ( 29,2% - 62,2% )		31
17-18						20,0% ( 5,7% - 51,0% )	100,0% ( 34,2% - 100,0% )			2
19-20						40,0% ( 16,8% - 68,7% )	40,0% ( 16,8% - 68,7% )			10
21-22						3,6% ( 0,6% - 17,7% )	32,1% ( 17,9% - 50,7% )	64,3% ( 45,8% - 79,3% )		28
23-24							37,5% ( 13,7% - 69,4% )	62,5% ( 30,6% - 86,3% )		8
25-26						6,5% ( 1,8% - 20,7% )	16,1% ( 7,1% - 32,6% )	77,4% ( 60,2% - 88,6% )		31
27-28						8,0% ( 2,2% - 25,0% )	4,0% ( 0,7% - 19,5% )	88,0% ( 70,0% - 95,8% )		25
29-30						4,3% ( 0,8% - 21,0% )	17,4% ( 7,0% - 37,1% )	78,3% ( 58,1% - 90,3% )		23
31-32						18,5% ( 8,2% - 36,7% )	77,8% ( 59,2% - 89,4% )		3,7% ( 0,7% - 18,3% )	27
33-34						4,5% ( 0,8% - 21,8% )	31,8% ( 16,4% - 52,7% )	59,1% ( 38,7% - 76,7% )	4,5% ( 0,8% - 21,8% )	22
35-36						3,7% ( 0,7% - 18,3% )	11,1% ( 3,9% - 28,1% )	81,5% ( 63,3% - 91,8% )	3,7% ( 0,7% - 18,3% )	27
37-38							100,0% ( 64,6% - 100,0% )			7
39-40							100,0% ( 43,9% - 100,0% )			3
41-42						10,0% ( 1,8% - 40,4% )		70,0% ( 39,7% - 89,2% )	20,0% ( 5,7% - 51,0% )	10
43-44								23,1% ( 8,2% - 50,3% )	76,9% ( 49,7% - 91,8% )	13
45-46								5,9% ( 1,0% - 27,0% )	94,1% ( 73,0% - 99,0% )	17
47-48								100,0% ( 86,7% - 100,0% )	100,0% ( 86,7% - 100,0% )	25
49-50								100,0% ( 20,7% - 100,0% )		1
51-52										349
Total	0,6% ( 0,2% - 2,1% )	1,4% ( 0,6% - 3,3% )	7,4% ( 5,1% - 10,7% )	0,9% ( 0,3% - 2,5% )	1,1% ( 0,4% - 2,9% )	3,7% ( 2,2% - 6,3% )	15,8% ( 12,3% - 20,0% )	52,7% ( 47,5% - 57,9% )	16,3% ( 12,8% - 20,6% )	349

SE: Semana epidemiológica, Frec: frecuencia, IC95%: intervalo de confianza 95%. Los intervalos de confianza de las frecuencias se calcularon por el método de Wilson en el programa STATA 12 (StataCorp, TX, USA).

En resumen, durante los dos años estudiados determinamos diferentes linajes y variantes de interés y preocupación en nuestra Región Sanitaria VIII (**Figura R14**).

Lo primero que podemos observar es la diferencia del número de casos estudiados entre ambos años, que se debe a la mayor realización de ensayos diagnósticos durante 2020 e inicios de 2021, dado que nuestro Laboratorio pertenece a la Red ANLIS y estuvo autorizada desde el inicio de la pandemia para realizar diagnóstico molecular por RT-qPCR. Luego, los Laboratorios de la región, incluyendo aquellos en Hospitales y otros centros privados, comenzaron a incorporar la tecnología y la técnica para realizar el diagnóstico viral. Por este motivo, se ve esa gran diferencia respecto al total de muestras testeadas en ambos años.

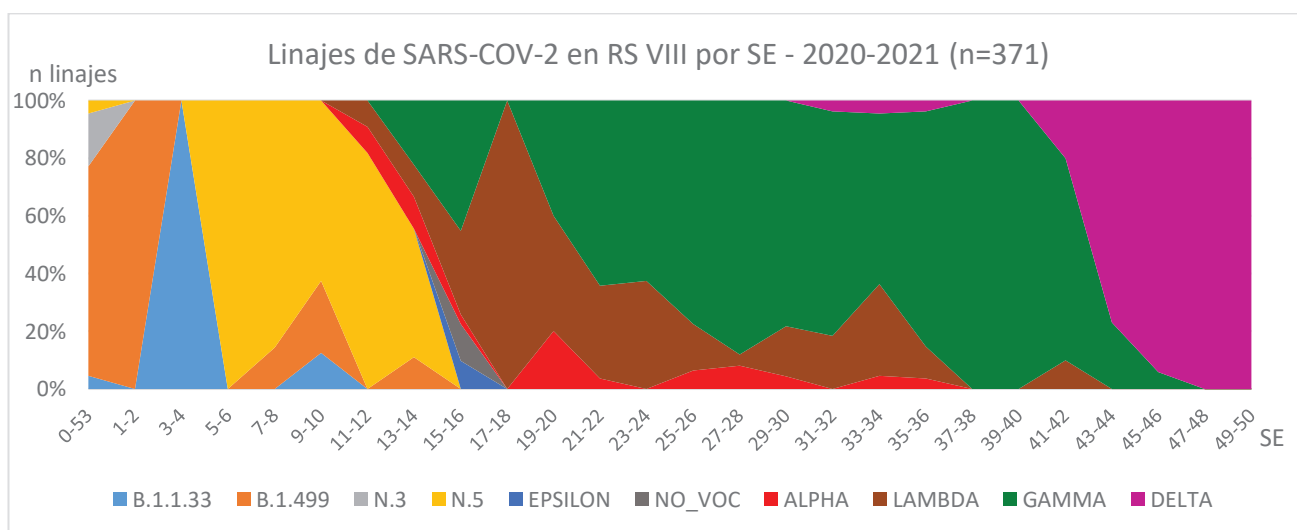


**Figura R14.** Distribución de linajes de SARS-CoV-2, por semanas epidemiológicas durante todo el período de estudio 2020- 2021. En línea azul se muestra el total de casos estudiados por RT-qPCR para SARS-CoV-2; en línea roja se muestra el total de casos confirmados positivos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

Otro aspecto que se observa en la figura es que si bien obtuvimos 371 secuencias de SARS-CoV-2, el número de muestras secuenciadas entre ambos años es muy diferente: tan solo 22 durante 2020 y 349 durante 2021. Por ello, se observan grandes diferencias en el tamaño de las barras de los linajes entre ambos años a pesar de que el número de muestras positivas detectadas en nuestro Laboratorio fue menor durante 2021. Como se describió anteriormente, la secuenciación de SARS-CoV-2 se realizó en el marco de los proyectos en el

Hospital Gutiérrez y en Malbrán-ANLIS, y a medida que ambos tuvieron disponibilidad de recursos económicos para los reactivos, el equipamiento y el personal, el número de muestras para secuenciar se fue incrementando sustancialmente para poder describir de una mejor manera la epidemiología en las diferentes regiones de nuestro país.

Para finalizar, se puede observar en la **Figura R15**, la dinámica de aparición, establecimiento y desaparición de los distintos linajes y variantes en nuestra región. Se ve durante todo el período de estudio, la sucesión de variantes en el tiempo, comenzando durante 2020 con predominio de B.1.499, para luego establecerse desde el inicio de 2021 la variante B.1.1.33 como la más frecuente, siendo predominante hasta la SE 5-6 y dejando de ser detectada en la SE 11. Desde la SE 5-6, el linaje N.5 se establece como el más prevalente, hasta la SE 15-16, donde se detectan las variantes Epsilon, Alpha, Lambda, Gamma y NO VOC. A partir de ese momento, Lambda y Gamma comienzan a predominar en la región, y esto se mantiene durante casi todo el año 2021, cuando a partir de la SE 43-44, es la variante Delta la que se impone en la región, desplazando al resto de las variantes al finalizar el año 2021.

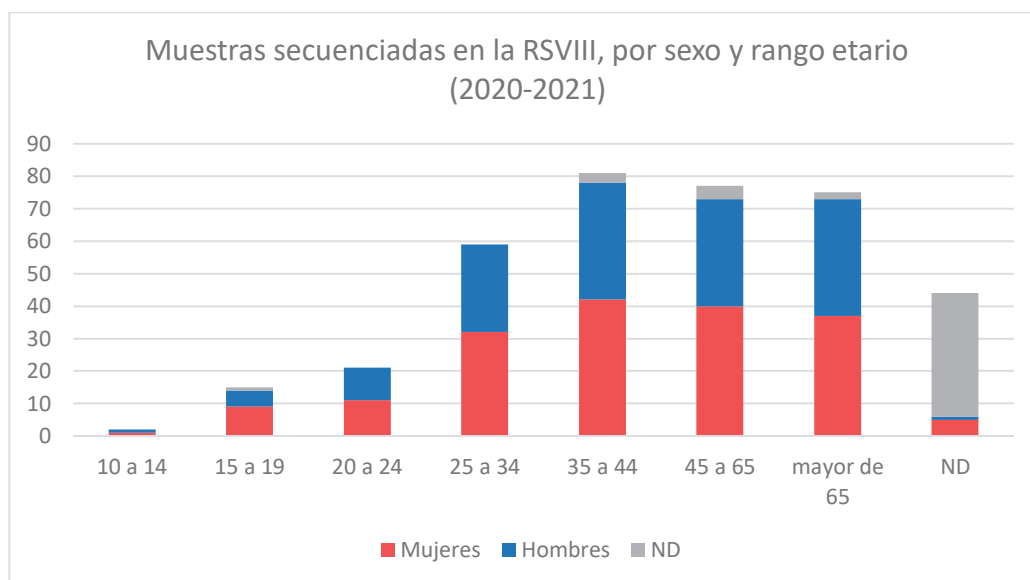


**Figura R15.** Distribución de las Variantes encontradas en las muestras analizadas en la Región Sanitaria VIII, desde marzo 2020 a diciembre 2021.

#### 4.2.5 Distribución de linajes y variantes de SARS-CoV-2 por rango etario y sexo

Realizamos un análisis de las características demográficas de los pacientes a partir de cuya muestra respiratoria pudimos obtener la secuenciación de SARS-CoV-2.

En la **Figura R16** se puede ver la distribución del número de muestras secuenciadas por el rango etario y sexo de los 371 pacientes.



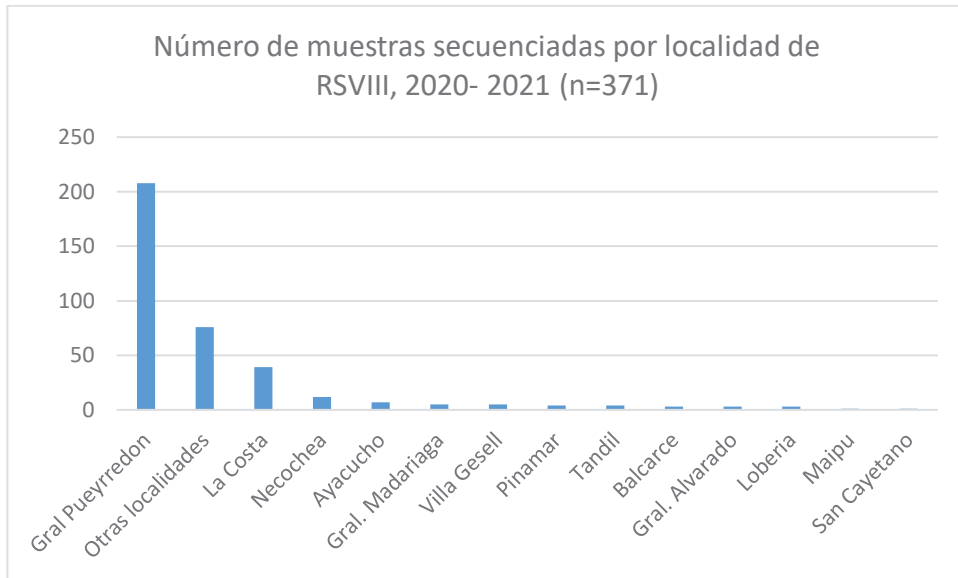
**Figura R16.** Distribución de muestras secuenciadas en la Región Sanitaria VIII, por rango etario y sexo, desde marzo 2020 a diciembre 2021.

La mayoría de las secuencias de SARS-CoV-2 obtenidas correspondían a adultos mayores de 25 años, tanto hombres como mujeres. Ninguna de las secuencias de SARS-CoV-2 analizadas era de menores de 10 años.

#### 4.2.6 Distribución regional de las muestras secuenciadas por localidad

A partir del análisis de las muestras secuenciadas de acuerdo con la localidad de origen del paciente, se puede observar en la **Figura R17**, que la mayor cantidad de las muestras analizadas (aproximadamente el 48 %) corresponde a pacientes oriundos de la ciudad de Mar del Plata, partido de General Pueyrredón. El resto de las muestras provienen de pacientes de otras localidades. Por este motivo, nuestra descripción epidemiológica representa mejor a la localidad Mar del Plata, de la Región Sanitaria VIII, que al resto de las localidades que conforman la región (General Lavalle, Maipú, Partido de La Costa, Pinamar, Villa Gesell, General Madariaga, General Guido, Ayacucho, Tandil, Balcarce, Mar Chiquita, General Alvarado, Lobería, Necochea y San Cayetano).





**Figura R17.** Número de muestras secuenciadas por localidad de origen de los pacientes cuyas muestras fueron secuenciadas, Región Sanitaria VIII, desde marzo 2020 a diciembre 2021.

## 5. Discusión

Las infecciones respiratorias agudas virales constituyen una de las mayores causas de morbi-mortalidad en todo el mundo, sobre todo durante los meses más fríos, en países como Argentina (Marcone et al., 2013c), (Carballal et al., 2001). Para el diagnóstico de certeza de los virus respiratorios se estudian muestras respiratorias, como un hisopado nasofaríngeo, y se pueden utilizar métodos directos como los moleculares (PCR o RT-PCR dependiendo del tipo de genoma viral ADN o ARN) o inmunofluorescencia directa o indirecta (para algunos virus como RSV, Flu, PIV, AdV, hMPV) ((Marcone et al., 2013c), FilmArray). Los resultados obtenidos se informan al SISA y de este modo se obtienen estadísticas regionales y nacionales que permiten conocer la incidencia y estacionalidad de estos virus. Sin embargo, la epidemiología viral respiratoria se vio afectada desde la aparición del virus pandémico SARS-CoV-2 en diciembre de 2019, que llevó al mundo a atravesar una de las mayores pandemias por un virus respiratorio, decretada por la OMS en marzo de 2020 (*WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19 - 11 March 2020*, n.d.), (*Archived*, n.d.), (Zhou et al., 2020b), (Wu et al., 2020), (N. Zhu et al., 2020b). El rápido desarrollo de ensayos de RT-PCR permitieron describir la epidemiología de este virus pandémico en todas las regiones del mundo, incluyendo nuestro país. Además, el uso de métodos de secuenciación de los genomas virales permitió conocer la evolución viral y establecer la dinámica de la aparición, diseminación y establecimiento de las diferentes variantes en los distintos países a través del tiempo.

En el presente trabajo describimos el estudio de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, durante los dos primeros años de pandemia: 2020 y 2021. La implementación de una RT-PCR altamente sensible y específica, recomendada por el CDC (V. M. Corman et al., 2020b), permitió detectar este virus en el 34.7% (41751 de 120421) de los pacientes sospechosos estudiados. Si bien la cantidad de muestras testeadas por RT-PCR durante ambos años fue similar, alrededor de 60 mil por año, la positividad determinada durante 2020 (37,4%) fue significativamente superior a la positividad detectada durante 2021 (31,9%). Estos resultados nos indican que la frecuencia de positividad de SARS-CoV-2 en nuestra región de estudio disminuyó de un año a otro, posiblemente debido a la inmunidad que se produjo en la población generada por una primoinfección o la administración de vacunas efectivas (Libera et al., 2021). Este fue uno de los resultados más importantes de nuestro trabajo, porque con la puesta a punto de la RT-PCR para la detección

de este virus desde el inicio de la pandemia, logramos aportar los primeros datos epidemiológicos de SARS-CoV-2 en la población de la Región Sanitaria VIII de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

A nivel país, durante el año 2020 la incidencia acumulada promedio fue de 26%, mientras que en 2021 ascendió a un promedio de 69%. El porcentaje de casos confirmados en el país durante 2020 fue del 33,5% sobre un total de 4811498 muestras estudiadas, y durante 2021, 21,8% sobre 16901559 casos sospechosos estudiados (Sala de situación MSAL [www.argentina.gob.ar](http://www.argentina.gob.ar), <https://covidstats.com.ar/panorama>). A pesar de aumentar durante 2021 el nivel de testeo en el país, nuestro laboratorio no recibió un significativo aumento de muestras para estudiar, dado que comenzaron otros laboratorios de la región a hacer el diagnóstico de SARS-CoV-2, tanto públicos como privados. Por este motivo no se refleja el aumento de testeo observado a nivel nacional con lo acontecido en nuestro laboratorio. Comparando nuestros resultados con la epidemiología viral en el resto del país, durante 2021 observamos una notable diferencia respecto el porcentaje de positividad: en nuestra región fue un 10% superior. Pensamos que podría deberse a un aumento en la cantidad de personas que visitó nuestra región costera durante el verano de 2021 a partir de las flexibilizaciones en las restricciones, que permitieron la visita de población proveniente de diversos puntos del país, y que presentaban la infección por SARS-CoV-2. O también, que al haber más circulación de personas por el retorno a los trabajos de forma presencial junto con el flujo turístico, se dieron las condiciones para que se den nuevas infecciones en la región, y esto haya promovido las consultas a los centros de salud donde fueron hisopados y cuyas muestras luego fueron estudiadas en nuestro laboratorio.

Otro aspecto importante fue que el número de muestras estudiadas durante ambos años superó al número que solemos estudiar en el Laboratorio para la vigilancia de virus respiratorios en nuestra región. Normalmente en la Región Sanitaria VIII se estudian entre 400 y 600 muestras respiratorias anuales, en el contexto de Vigilancia Epidemiológica de Virus Respiratorios, con el uso de metodologías moleculares como RT-PCR, recomendados por la OMS.

Debido a que los 16 municipios que conforman la Región Sanitaria VIII tienen distintas particularidades respecto a las actividades que se desarrollan en ella, como ser la actividad agroindustrial y el turismo, por este motivo y por la dinámica de transmisión del SARS-CoV-2 asociada a los viajeros, para nuestro análisis diferenciamos las muestras respiratorias que

provenían de habitantes residentes de la Región Sanitaria VIII de aquellas provenientes de personas en tránsito (viajeros), a partir de la información disponible en SISA. Determinamos que, en ambos años de estudio, la mayor cantidad de muestras provenían de residentes de nuestra región (81% en 2020 y 71% en 2021), y que, además, durante 2021 estudiamos un mayor número de viajeros sospechosos de tener COVID-19. Durante el año 2020, estudiamos solo un 19% de las muestras provenientes de viajeros, pero la positividad en este grupo fue muy elevada (mayor al 40%). Esto probablemente se debió a que desde el momento de la infección a la manifestación de síntomas hay en promedio 4.7 días y las personas emprendían el viaje y al arribar a lugares de turismo comenzaban con síntomas y consultaban en los centros de salud cercanos disponibles. Sin embargo, a pesar de estudiar más viajeros durante 2021 asociado a la flexibilización de las restricciones de circulación en el país, el porcentaje de positividad en los viajeros (28%) fue significativamente menor al de los residentes (33%). Respecto el grupo de residentes de nuestra región, el mayor número de casos sospechosos estudiados y confirmados fueron procedentes de la ciudad de Mar del Plata.

Cuando analizamos la distribución etaria de los casos sospechosos estudiados y los casos confirmados en nuestro Laboratorio, notamos que la mayoría de las muestras provenían individuos mayores de 25 años, con predominio de mayores de 45 años, tanto en 2020 como 2021. Sin embargo, no determinamos un rango etario en el cual el porcentaje de positividad de SARS-CoV-2 haya sido marcadamente superior. Debido a la falta de datos disponibles en SISA, existe un gran número de muestras con edad sin especificar, que decidimos separar visiblemente en los gráficos y que lamentablemente no permite que el análisis de los datos sea el más preciso. Nuestros resultados coinciden con otros trabajos y reportes de la mayoría de los países, donde la positividad fue superior en el grupo de edad entre 20 y 59 años mientras que la positividad en niños (de 0 a 9 años) fue baja (Salzberger et al., 2021). Existen trabajos publicados que describen que la distribución por edades del SARS-CoV-2 es diferente a muchos otros virus bien estudiados como los virus influenza, el sarampión y el dengue, debido a factores biológicos que reducen la susceptibilidad a la infección y atenúan la gravedad de la enfermedad en los niños (Cohen et al., 2022).

Durante el proyecto se estudiaron más muestras provenientes de pacientes femeninas; sin embargo, la proporción de muestras positivas para SARS-CoV-2 fue significativamente mayor en pacientes masculinos. Durante 2020, detectamos un 38% de positividad en pacientes de sexo masculino, significativamente superior al 35% detectado en pacientes femeninas,

mientras que, en 2021, la positividad en masculinos fue 35% en comparación con el 32% en pacientes femeninas. Estos resultados son interesantes ya que sugieren una posible diferencia en la susceptibilidad a la infección o en la respuesta inmune entre los sexos. Sin embargo, se necesita más investigación para confirmar este hallazgo y entender las posibles razones detrás de esta diferencia. Es conocido que, para infecciones por virus respiratorios, hay una mayor incidencia en hombres que en mujeres, tanto niños (Marcone et al., 2013b) como adultos, aunque no se han dilucidado aún cuáles pueden ser los mecanismos involucrados en tal diferencia (Ursin & Klein, 2021).

La pandemia de SARS-CoV-2 ha afectado a cada país en el mundo de manera diferente debido a diversos factores, como la afluencia de viajeros de las regiones con mayor número de casos, la densidad poblacional, el acceso y disponibilidad de recursos médicos, la respuesta gubernamental y las medidas de prevención y control impuestas junto con el cumplimiento efectivo de las mismas, entre otras. Durante 2020, la propagación del virus fue rápida y logró extenderse por todo el mundo. Desde fines de 2019, China fue el epicentro del brote, pero la situación pronto se extendió a países como Italia, España, Estados Unidos y Brasil. Muchos países implementaron medidas de distanciamiento social y cierre de fronteras para controlar la propagación del virus. En algunos países, como Nueva Zelanda, Australia y Corea del Sur, las medidas de control fueron efectivas y lograron contener la propagación del virus en gran medida. Otros países, como Estados Unidos, Brasil y México, experimentaron un alto número de casos y muertes debido a una respuesta gubernamental deficiente y a la falta de medidas de control efectivas. Un gran cambio en la dinámica de diseminación viral se observó a nivel mundial desde la aplicación de las vacunas desarrolladas en tiempo récord, aunque lamentablemente el acceso a las mismas fue bastante desigual en los países de los distintos continentes. Por este motivo, durante 2021, la situación epidemiológica del SARS-CoV-2 ha variado según los países y las regiones. Algunos países han logrado controlar el virus a través de la vacunación masiva y la implementación de medidas de control efectivas, mientras que otros han experimentado un aumento en los casos debido a la propagación de nuevas variantes del virus y a la falta de adherencia a las medidas de control. En los países limítrofes como Brasil, Bolivia y Chile, los casos sospechosos comenzaron a aparecer los primeros días de marzo de 2020, y luego, observamos que dependiendo de las diferentes medidas gubernamentales sucedieron diferentes progresos de la diseminación viral en cada uno de ellos. En comparación con Argentina, donde la aplicación de medidas más extremas con el

decreto del Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) permitieron demorar el inicio de la ola de contagios exponencial en junio de 2020, en Brasil se inició la primera ola exponencial de casos positivos a mediados de marzo, luego, Chile inició la primera ola a fines de abril, y Bolivia a inicios de mayo. Brasil presentó dos olas y mantuvo un alto número de casos (20-30 mil) durante todas las SE del 2020-2021, Bolivia presentó tres olas bien marcadas durante el mismo período, pero entre las olas mantuvo niveles de casos en el orden de los 200-500, y Chile, similar a Argentina, una primera ola, un rebrote de verano y luego una ola en 2021.

Los casos de SARS-CoV-2 en nuestra Región Sanitaria VIII se comenzaron a detectar en la SE 11 del 2020, con la aparición del primer caso importado al partido de General Pueyrredón, y alcanzamos el máximo número de casos analizados y confirmados de SARS-CoV-2, en la SE 37. Logramos definir un primer periodo de aumento exponencial en nuestra región comprendido entre las SE 28 a 37, a partir de la cual observamos que la misma se sostuvo en niveles estables con tendencia descendente hacia la SE 48, a partir de la cual luego comenzó a aumentar el número de casos estudiados y confirmados. Este aumento está directamente relacionado con la implementación de las medidas de Distanciamiento Social Preventivo y Obligatorio (DISPO) impuestas, que permitieron una apertura a la circulación de las personas, y con ello un aumento en la diseminación viral. Luego, a partir de la SE 14 de 2021 volvimos a tener un aumento en el número de muestras y casos positivos detectados que disminuyó paulatinamente hasta llegar a niveles muy bajos a partir de la SE 36 y se mantuvo hasta finalizar nuestro período de estudio. A partir de la SE 50 notamos nuevamente un incremento en la tendencia de los casos positivos.

Las medidas sociales y de protección personal, incluido el lavado de manos, el uso de máscaras y el distanciamiento físico, se asociaron con reducciones en la incidencia de SARS-CoV-2 (Rabinovich & Geffner, 2021), (COVID-19: WHO's Action in Countries, Argentina), (Sylvester et al., 2022). Y esto lo visualizamos desde un primer momento, ya que durante varias semanas (hasta la SE 27) el número de casos sospechosos y confirmados en nuestra región fue muy bajo por las medidas de Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) implementado en marzo de 2020, hasta observarse el aumento exponencial, posteriormente una disminución y un rebrote de casos ocurrido en el verano de 2021, luego de implementarse el DISPO en toda Argentina. Este fenómeno fue observado y reportado también en otros países, y coincide con el retraso en el aumento exponencial de casos positivos de SARS-CoV-2

en nuestra región estudiada (S et al., 2021). Las estrategias y las medidas que recomienda actualmente la OMS siguen funcionando contra las variantes del virus detectadas desde el comienzo de la pandemia. Se ha demostrado en muchos países con amplia transmisión de variantes preocupantes que las medidas sociales y de salud pública, como las de prevención y control de la infección, reducen eficazmente el número de casos, hospitalizaciones y muertes por COVID-19 (Medidas No Farmacéuticas).

Los reportes del Ministerio de Salud, informaron un total de 53222 muertes por COVID-19 durante 2020 ([Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación | Estadísticas Vitales - Información Básica - Argentina – Año 2020](#)) y 84698 durante 2021, para Argentina ([Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación | Estadísticas Vitales - Información Básica - Argentina – Año 2021](#)). Los casos fallecidos en la Provincia de Buenos Aires durante 2020, fueron de 23392, mientras que durante 2021, 35006 (*Reporte interactivo de estadísticas de salud*, 2021). En el Distrito de General Pueyrredón, durante 2020 se registraron 535 fallecidos y en 2021, 2175. (*Covid-19. Casos En Gral. Pueyrredon | Datos Mar Del Plata*, n.d.). Los datos muestran que la pandemia de COVID-19 ha tenido un impacto significativo en Argentina; destacamos que la tasa de mortalidad ha sido baja en comparación con otros países de Latinoamérica y del resto del mundo. No contamos con datos completos de mortalidad para la población de estudio de nuestro trabajo disponibles en SISA, por este motivo no pudimos calcular la mortalidad en nuestra población de estudio.

La disponibilidad del equipamiento y el conocimiento en epidemiología molecular viral permitió, desde los inicios de la pandemia por SARS-CoV-2, obtener secuencias del genoma completo casi en tiempo real por primera vez en la historia. Esto permitió desarrollar los métodos de detección mediante el diseño de cebadores y sondas específicas, desde un primer momento. Y lo más importante, que investigadores de todo el mundo compartían las secuencias virales a través de la plataforma web GISAID, y se podía establecer cuáles eran los linajes que circulaban, si aparecía alguna variante con mutaciones que podrían afectar la virulencia, la patogénesis, el escape inmunológico, así como la efectividad de los diagnósticos y la terapéutica. Este recurso genómico influyó en la toma de decisiones de salud pública durante la pandemia.

La Epidemiología Molecular permite analizar la relación entre los virus circulantes en una región, monitorear la estabilidad de los sistemas de diagnóstico, y relacionar las características

genéticas de los virus con su patogenicidad. Estos motivos descriptos motivaron a la OMS proponer y alentar a las autoridades sanitarias a reforzar la capacidad de vigilancia y de secuenciación, adoptar un enfoque sistemático para proporcionar una indicación representativa de la amplitud de la transmisión de las variantes del virus basada en los contextos locales y a detectar y notificar cualquier suceso epidemiológico inusual.

Los estudios para describir la epidemiología molecular de SARS-CoV-2 en Argentina comenzaron tempranamente en 2020, en el marco de los proyectos PAIS, liderado por la Dra. Mariana Viegas con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, y en el Instituto Malbrán-ANLIS con el apoyo del Ministerio de Salud, con la dirección de la Dra. Josefina Campos y Dra. Elsa Baumeister. La posibilidad de acceder a secuencias genómicas virales de nuestra región fue diferente durante ambos años y dependió de varios factores. En primer lugar, al inicio de la pandemia, lo principal fue tener conocimiento de los linajes de SARS-CoV-2 en una selección de casos confirmados, que permitiera confirmar la transmisión en la población y ayudara con la toma de medidas sanitarias para controlar la dispersión del virus. También se buscaba conocer si los virus tenían una alta tasa de mutación y si los linajes presentaban variaciones en la secuencia que pudieran afectar a los sistemas de diagnóstico y ello implicara el re-diseño de cebadores o sondas; esta era una gran preocupación, debido a que ante la presencia de “*missmatches*”, podrían producirse falsos negativos y esto llevaría a una falla en el diagnóstico y una posible mayor propagación viral. No se había implementado en este periodo inicial, aún, un sistema definido de vigilancia genómica, y por ello, durante 2020 se tomaron sólo algunas muestras positivas al azar representativas de residentes y también de viajeros, para estudiar sus características genómicas. La disponibilidad de reactivos de secuenciación fue limitada al principio debido a la alta demanda en todo el mundo y la disponibilidad limitada. Esto se vio agravado por los largos tiempos de envío. Además, en el inicio todo el procesamiento dependía solamente del nodo de secuenciación del Proyecto PAIS en el Hospital Gutiérrez y del servicio de virosis respiratorias y bioinformática del Instituto Malbrán ANLIS. El equipamiento y los reactivos fueron limitados, y para tener representatividad de todo el país, cada laboratorio de diagnóstico hacía envío de un limitado número de muestras que estos centros podían procesar, que en nuestro caso fue de 48 muestras enviadas en 2020. Con el avance del tiempo, ambos proyectos recibieron más financiamiento, lo que les permitió comprar más equipos y reactivos, capacitar a más personal y aumentar su capacidad de procesamiento de muestras. Esto resultó en un aumento



significativo en la cantidad de muestras positivas de SARS-CoV-2 que podrían enviarse desde el laboratorio, que en particular nos permitió hacer envío de 402 muestras para secuenciar en 2021. Esto, a su vez, permitió una mejor comprensión de las variantes que circulan en la región. Cabe aclarar que, durante 2021, el proyecto PAIS incorporó la secuenciación de una región parcial del gen S, en lugar de todo el genoma completo, para de este modo poder aumentar aún más la capacidad de obtener datos genómicos de un mayor número de muestras en un menor tiempo. Todas las secuencias de estudio obtenidas se han depositado en la base de datos de GISAID, por los equipos de los proyectos PAIS y Malbrán-ANLIS.

De las 48 muestras enviadas durante 2020, se secuenciaron satisfactoriamente un total de 22 (45.8%) genomas completos de SARS-CoV-2; y de las 402 muestras enviadas durante 2021, se secuenciaron satisfactoriamente 349 (86.8%): un total 235 genomas completos y 114 secuencias parciales de la región S. Como puede observarse, a pesar de enviar muestras positivas con valores de Ct menores de 30, que permitirían garantizar que la secuenciación fuera efectiva, no se obtuvieron los genomas completos o genomas parciales del gen S de todas las muestras enviadas, sólo del 82.4%. Esto pudo deberse a una degradación del ácido nucleico viral durante el envío, a problemas de conservación, o a fallas en el proceso de la secuenciación.

Sin embargo, comprendemos que el número de secuencias analizado durante ambos años es muy bajo para la región y la población que habita en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, por lo tanto, sabemos que no es completamente representativa de toda la región y que podría haber un sesgo del muestreo, considerando que la Región Sanitaria VIII cuenta con un total aproximado de 1200000 habitantes, y la provincia de Buenos Aires unos 16000000 de habitantes (CENSO 2010-provisorio 2022).

Las secuencias obtenidas se editaron manualmente para eliminar sus extremos, y se corrieron en programas bioinformáticos que permitieron asignar un linaje de SARS-CoV-2 a las mismas. Debido a que la precisión de la herramienta Pangolín es del 99,9% para asignar VOC, pero puede caer hasta el 92,9% para otras variantes, utilizamos la secuenciación seguida de filogenia para confirmar los linajes y variantes, usando genomas de referencia. A partir de un árbol de máxima verosimilitud, obtuvimos que las muestras de nuestra región se agruparon en 8 grupos mayoritarios: Gamma (B.1.1.28 y derivados de P.1), B.1.1.33, N.3 y N.5, Alpha (B.1.1.7), Lambda (C.37), Delta (B.1.617.2 y derivados AY. \*) y B.1.499. Utilizando las regiones parciales del gen S, analizando las posiciones marcadoras, determinamos los linajes/variantes:

Alpha (B.1.1.7), Epsilon (B.1.427), Lambda (C.37), P.1 y un grupo de variantes NO VOC. La distribución de estos linajes/variantes detectadas fue diferente durante las distintas olas que sucedieron en la región en ambos años. En 2020, detectamos al inicio B.1.1.33 y N.3, hasta la introducción del linaje B.1.499 que fue el mayoritario y más predominante en nuestra región durante la primera ola. En el rebrote de verano de 2021 observamos que el linaje mayoritario fue N.5. Y luego, en la segunda ola determinamos mayor variedad de variantes, que incluyeron a Gamma como la más prevalente, seguida por Lambda y en menor medida por Alpha. Y que el predominio de Delta fue predominante los últimos dos meses de 2021.

Cuando hay circulación activa de un virus, hay variantes que son más frecuentes y pueden aparecer variantes propias de la región. La información disponible sugiere que la variante Gamma llegó a la provincia de Buenos Aires a través de viajeros internacionales. En el informe de vigilancia de variantes de SARS-CoV-2 de la provincia de Buenos Aires, se identificaron 100 casos de la variante Gamma en viajeros provenientes de Brasil, Bolivia, Chile, Colombia, Paraguay e Italia. Sin embargo, es posible que la variante Gamma también se haya propagado por la circulación del virus en la provincia de Buenos Aires. La variante Gamma fue la variante dominante en la provincia durante varios meses, lo que le dio tiempo para propagarse de forma gradual a través de la población. Posteriormente, la provincia de Buenos Aires, Argentina, la variante Delta fue la variante dominante durante la segunda ola de la pandemia, que tuvo lugar en 2021.

La distribución de los linajes y las variantes de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII cambió significativamente entre 2020 y 2021. De todos modos, desde un inicio observamos que la dinámica de los linajes fue la circulación de uno o más linajes en simultáneo, que luego se desplaza por la introducción de un linaje nuevo a la región, generalmente con una ola de casos asociada. La aparición de nuevos linajes y variantes es posiblemente un motivo por el cual la pandemia se diseminó por tantos países y se sostuvo en el tiempo a pesar de los esfuerzos de mitigación, aislamiento, vacunación. Algunas de las variantes fueron más transmisibles o evadían la respuesta inmune en algún grado, y por ello se identificaban como variantes de interés o preocupación, y eran monitoreadas. Por lo tanto, esto destaca el trabajo realizado para el monitoreo de linajes y variantes, y justifica por qué es importante continuar vigilando la evolución de las variantes del virus y adaptar las estrategias de salud pública en consecuencia. Es importante mencionar que el análisis filogenético del virus SARS-CoV-2 es

una tarea compleja y en constante evolución, y que los resultados pueden variar dependiendo de los datos disponibles y los métodos de análisis utilizados.

Las comparaciones de los linajes/variantes detectadas en la Región Sanitaria VIII con las detectadas en el resto del país son complejas ya que no se secuenciaron muestras positivas para SARS-CoV-2 de la misma SE, en todas las provincias de la Argentina. Sin embargo, pudimos apreciar que la situación de la Región Sanitaria VIII fue similar a la del resto de la provincia de Buenos Aires y el país, en la dinámica de la frecuencia de casos confirmados por RT-qPCR y en la circulación de algunas de las variantes: durante 2020 la variante mayoritaria fue la B.1.499 y en el 2021 fue la Gamma. A partir de los estudios filogenéticos para analizar la evolución del virus en el país, se ha observado que la mayoría de las variantes identificadas en Argentina tienen una estrecha relación genética con las variantes identificadas en otros países de la región, como Brasil y Chile (Zhao et al., 2022).

A partir de la SE 19 a la SE 31 del año 2020, las variantes predominantes en las distintas zonas estudiadas de la Argentina fueron B.1, B.1.1 y B.1.499. También se encontraron las variantes N.3 y N. 5. En las SE 27 y 28, el 18% de las muestras analizadas fueron N.3, mientras que en las SE 51-53, el 5% de las muestras estudiadas fueron N.5. En el resto del país, no se reportó la aparición de N.3 hasta el periodo 2021, por ejemplo, en la SE 6 en Córdoba, indicando una posible importación directa desde el exterior de esta variante a la Región Sanitaria VIII. La variante N.5 no fue reportada en la vigilancia en otras regiones, aparición que también es una característica de la Región de la Región Sanitaria VIII.

El 15 de enero del año 2021 (SE 2), se reportó el ingreso al país de la variante Alpha. Unos días después, el 18 de enero, se reportó en AMBA la presencia de la variante P.2 (Rio de Janeiro). En el mes de abril, las variantes de preocupación llegaron al 32%, otras variantes de interés al 8% y la variante C.37 derivada de B1.1.1 al 9%. En la SE 18 del 2021, en la región central del país se encontró una distribución similar de Alpha (32%) y P.1 /Manaos (68%). Entre las SE 27 a 43, las variantes Gamma y Lambda se establecieron como mayoritarias en Argentina. Posteriormente, a partir de la SE 37, se reportaron casos de variante Delta, principalmente en el centro de país. De este modo, confirmamos que la distribución de variantes en nuestra Región Sanitaria fue similar a lo reportado en el resto de Argentina.

La provincia de Buenos Aires, Argentina, fue una de las primeras jurisdicciones del país en comenzar la vacunación contra el COVID-19. El 29 de diciembre de 2020, se aplicaron las

primeras dosis de la vacuna Sputnik V al personal de salud de la provincia. En los primeros meses de la campaña de vacunación, el ritmo de aplicación de dosis fue lento y se aceleró a partir del segundo semestre de 2021. Esto se debió a la llegada de más vacunas al país y a la implementación de un plan de vacunación más eficiente. A finales de 2021, el 70% de la población de la provincia de Buenos Aires había recibido al menos una dosis de la vacuna contra el COVID-19.

Las principales limitaciones de nuestro trabajo fueron:

- 1- Faltante de datos en SISA: no se pudieron recabar todos los datos demográficos, clínicos y de evolución (fallecidos) o resolución de la enfermedad completos para todas las muestras estudiadas. Esto llevó a que muchos análisis no pudieran realizarse de manera completa, y que algunos otros directamente no pudieran realizarse, como la descripción de casos graves internados o la estimación de los fallecidos en nuestra población de estudio. Por este motivo tampoco pudo analizarse si hubo algún linaje o variante de SARS-CoV-2 asociada a mayor gravedad o letalidad.
- 2- Diferencia en el número de muestras secuenciadas durante 2020 y 2021: durante el año 2020 sólo se seleccionaron 48 muestras como posibles candidatas para secuenciación, muy inferior a las 402 enviadas durante 2021. Si bien consideramos que el número de secuencias obtenidas no fue completamente representativo de la población de la región, creemos que durante 2021 tuvimos una mejor representatividad y esto haya sido en beneficio de una mejor descripción epidemiológica en 2021.
- 3- Tanto en la recepción de muestras para la detección de genoma de SARS-CoV-2, como en el envío de muestras a las plataformas de secuenciación desde nuestro laboratorio a CABA, la logística de transporte y movilización de muestras pudo haber afectado la calidad de las muestras respiratorias y del genoma viral. Esto podría haber sido la causa para que algunas de las muestras enviadas a secuenciar no pudieran obtenerse satisfactoriamente.

A pesar de las limitaciones descritas anteriormente, los datos obtenidos del sistema SISA junto con los resultados virológicos de detección de SARS-CoV-2 y de secuencias, nos permitieron realizar una descripción epidemiológica general y molecular de este virus pandémico en la Región Sanitaria VIII durante los años 2020 y 2021.



## 6. Conclusiones

Con respecto a la Hipótesis de trabajo establecida en esta Tesis: *“La vigilancia epidemiológica activa de muestras respiratorias obtenidas en la Región Sanitaria VIII permitirá establecer los modelos de circulación viral, describir los linajes virales circulantes, y evaluar la presencia de variantes de interés (VOI) y de variantes de preocupación (VOC), o la aparición de nuevos linajes o variantes en la zona del Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.”*

Pudimos comprobar que la introducción de diferentes linajes y variantes de SARS-CoV-2 en la Región Sanitaria VIII se correlacionó con el aumento de casos durante las dos olas y el rebrote de verano, detectado durante 2020 y 2021. Las variaciones que se produjeron en el genoma viral no afectaron a la eficacia de los métodos diagnósticos recomendados por OMS y aprobados por ANMAT disponibles en Argentina y utilizados durante el proyecto, y continuaron siendo efectivos para detectar a todas las variantes de SARS-CoV-2.

A partir del desarrollo de este trabajo podemos concluir que:

- Este estudio contribuyó al conocimiento de la **epidemiología de SARS-CoV-2** durante los dos primeros años de pandemia, incluyendo la descripción de su frecuencia y las variantes de interés y preocupación en la **región sanitaria VIII** de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- **Un tercio de las 120421** muestras respiratorias analizadas fueron **positivas para SARS-CoV-2**.
- Se determinaron cinco variantes de interés epidemiológico: las variantes de preocupación “VOC”: **ALPHA, GAMMA, DELTA, EPSILON** y la variante de interés “VOI”: **LAMBDA**, sobre un total de **371 muestras**, con una dinámica de circulación de linajes similar a la reportada en el resto del país.

Con el fin de dar una rápida respuesta a la necesidad de información sobre la epidemiología viral del virus emergente SARS-CoV-2, fue imprescindible la **interacción de grupos multidisciplinarios del Ministerio de Salud y del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación**, para la toma de **medidas sanitarias** eficaces que contribuyeron al control de la transmisión, demostrando las fortalezas y oportunidades del sistema científico de nuestro país y la formación de recursos humanos para interpretar los resultados y establecer hipótesis en el contexto de la Epidemiología Molecular.

## 7. Referencias bibliográficas

- Amicone, M., Borges, V., Alves, M. J., Isidro, J., Zé-Zé, L., Duarte, S., Vieira, L., Guiomar, R., Gomes, J. P., & Gordo, I. (2022). Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 10(1), 142–155. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>
- Amoutzias, G. D., Nikolaidis, M., Tryfonopoulou, E., Chlichlia, K., Markoulatos, P., & Oliver, S. G. (2022). The Remarkable Evolutionary Plasticity of Coronaviruses by Mutation and Recombination: Insights for the COVID-19 Pandemic and the Future Evolutionary Paths of SARS-CoV-2. *Viruses*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/v14010078>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anderson, R. M., & May, R. M. (1992). *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*. OUP Oxford.
- Archived: WHO Timeline - COVID-19. (n.d.). Retrieved March 29, 2023, from <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
- Attwood, S. W., Hill, S. C., Aanensen, D. M., Connor, T. R., & Pybus, O. G. (2022). Phylogenetic and phylodynamic approaches to understanding and combating the early SARS-CoV-2 pandemic. *Nature Reviews Genetics*, 23(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00483-8>
- Bar-On, Y. M., Goldberg, Y., Mandel, M., Bodenheimer, O., Freedman, L., Kalkstein, N., Mizrahi, B., Alroy-Preis, S., Ash, N., Milo, R., & Huppert, A. (2021). Protection of BNT162b2 Vaccine Booster against Covid-19 in Israel. *New England Journal of Medicine*, 385(15), 1393–1400. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114255>
- Becker, R. C. (2020). COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 50(1), 54–67. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02134-3>
- Botosso, V. F., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., de Sá Guimarães, A. M., Mathor, M. B., de Carneiro, P. dos S., Durigon, E. L., Covas, D., de Oliveira, D. B. L., das Neves Oliveira, R., Maria, D. A., Eto, S. F.,

- Gallina, N. M. F., Pidde, G., Squaiella-Baptistão, C. C., Silva, D. T., Villas-Boas, I. M., Fernandes, D. C., Auada, A. V. V., ... Chudzinski-Tavassi, A. M. (2022). Anti-SARS-CoV-2 equine F (Ab')<sub>2</sub> immunoglobulin as a possible therapy for COVID-19. *Scientific Reports*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07793-1>
- Bratanich, A. (2015). MERS-CoV: Transmisión y el papel de nuevas especies hospederas. *Revista Argentina de Microbiología*, *47*(4), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.001>
- Brown, T. D. K., & Brierley, I. (1995). The Coronavirus Nonstructural Proteins. In S. G. Siddell (Ed.), *The Coronaviridae* (pp. 191–217). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1531-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1531-3_10)
- Brun, J., Vasiljevic, S., Gangadharan, B., Hensen, M., V. Chandran, A., Hill, M. L., Kiappes, J. L., Dwek, R. A., Alonzi, D. S., Struwe, W. B., & Zitzmann, N. (2021). Assessing Antigen Structural Integrity through Glycosylation Analysis of the SARS-CoV-2 Viral Spike. *ACS Central Science*, *7*(4), 586–593. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00058>
- Callaway, E. (2022). Why does the Omicron sub-variant spread faster than the original? *Nature*, *602*(7898), 556–557. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00471-2>
- Cancel-Tirado, S. M., Evans, R. B., & Yoon, K.-J. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *102*(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.017>
- Carballal, G. (2015). *Virología médica*. Corpus.
- Caul, E. O., & Egglestone, S. I. (1977). Further studies on human enteric coronaviruses. *Archives of Virology*, *54*(1), 107–117. <https://doi.org/10.1007/BF01314383>
- CDC. (2020, February 11). *Labs*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- Chen, R. E., Zhang, X., Case, J. B., Winkler, E. S., Liu, Y., VanBlargan, L. A., Liu, J., Errico, J. M., Xie, X., Suryadevara, N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Tahan, S., Droit, L., Turner, J. S., Kim, W., Schmitz, A. J., Thapa, M., Wang, D., ... Diamond, M. S. (2021). Resistance of SARS-CoV-2 variants to



- neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nature Medicine*, 27(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01294-w>
- Chen, Z., Rowland, R. R., Anderson, G. W., Palmer, G. A., & Plagemann, P. G. (1997). Coexistence in lactate dehydrogenase-elevating virus pools of variants that differ in neuropathogenicity and ability to establish a persistent infection. *Journal of Virology*, 71(4), 2913–2920. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.4.2913-2920.1997>
- Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. (2004). Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5664), 1666–1669. <https://doi.org/10.1126/science.1092002>
- Chu, K.-B., & Quan, F.-S. (2023). Respiratory Viruses and Virus-like Particle Vaccine Development: How Far Have We Advanced? *Viruses*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/v15020392>
- Cohen, L. E., Spiro, D. J., & Viboud, C. (2022). Projecting the SARS-CoV-2 transition from pandemicity to endemicity: Epidemiological and immunological considerations. *PLOS Pathogens*, 18(6), e1010591. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010591>
- Commissioner, O. of the. (2022, January 25). *Actualización sobre el coronavirus (COVID-19): La FDA limita el uso de ciertos anticuerpos monoclonales para tratar el COVID-19 debido a la variante ómicron*. FDA; FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/actualizacion-sobre-el-coronavirus-covid-19-la-fda-limita-el-uso-de-ciertos-anticuerpos-monoclonales>
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., Mc, E., & Zambon, M. (n.d.). *Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR*. 12.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020a). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020b). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, *25*(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Coronavirus en Italia: Casos, muertes y recuperados*. (n.d.). Statista. Retrieved March 20, 2023, from <https://es.statista.com/estadisticas/1107849/covid-19-casos-confirmados-muertes-y-recuperados-por-dia-italia/>
- Corti, D., & Kearns, J. D. (2016). Promises and pitfalls for recombinant oligoclonal antibodies-based therapeutics in cancer and infectious disease. *Current Opinion in Immunology*, *40*, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.03.001>
- Covid-19. Casos en Gral. Pueyrredon | Datos Mar del Plata*. (n.d.). Retrieved May 17, 2023, from <https://datos.mardelplata.gob.ar/?q=dataset/covid-19-casos-en-gral-pueyrredon>
- Cuidados principales*. (2021, April 27). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus/poblacion>
- Dabanch, J. (2021). EMERGENCIA DE SARS-COV-2. ASPECTOS BÁSICOS SOBRE SU ORIGEN, EPIDEMIOLOGÍA, ESTRUCTURA Y PATOGENIA PARA CLÍNICOS. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *32*(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.12.003>
- Daines, L., Zheng, B., Pfeffer, P., Hurst, J. R., & Sheikh, A. (2022). A clinical review of long-COVID with a focus on the respiratory system. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, *28*(3), 174–179. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000863>
- Dal-Ré, R., Becker, S. L., Bottieau, E., & Holm, S. (2022). Availability of oral antivirals against SARS-CoV-2 infection and the requirement for an ethical prescribing approach. *The Lancet Infectious Diseases*, *22*(8), e231–e238. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00119-0)
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

- de Klerk, A., Swanepoel, P., Lourens, R., Zondo, M., Abodunran, I., Lytras, S., MacLean, O. A., Robertson, D., Kosakovsky Pond, S. L., Zehr, J. D., Kumar, V., Stanhope, M. J., Harkins, G., Murrell, B., & Martin, D. P. (2022). Conserved recombination patterns across coronavirus subgenera. *Virus Evolution*, 8(2), veac054. <https://doi.org/10.1093/ve/veac054>
- de Vries, A. A. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M., & de Groot, R. J. (1997). The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Seminars in Virology*, 8(1), 33–47. <https://doi.org/10.1006/smv.1997.0104>
- Dea, S., & Tijssen, P. (1988). Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Archives of Virology*, 99(3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/BF01311068>
- Deng, J., Heybati, K., Ramaraju, H. B., Zhou, F., Rayner, D., & Heybati, S. (2022). Differential efficacy and safety of anti-SARS-CoV-2 antibody therapies for the management of COVID-19: A systematic review and network meta-analysis. *Infection*. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01825-8>
- Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y. S., Singh, K. P., Chaicumpa, W., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>
- Dhar, B. C. (2022). Diagnostic assay and technology advancement for detecting SARS-CoV-2 infections causing the COVID-19 pandemic. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(9), 2903–2934. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03918-7>
- Di Simone, S. K., Rudloff, I., Nold-Petry, C. A., Forster, S. C., & Nold, M. F. (2023). Understanding respiratory microbiome–immune system interactions in health and disease. *Science Translational Medicine*, 15(678), eabq5126. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq5126>
- Doddapaneni, H., Cregeen, S., Sugang, R., Meng, Q., Qing, X., Avadhanula, V., Chao, H., Menon, V., Nicholson, E., Henke, D., Piedra, F.-A., Rajan, A., Momin, Z., Kottapalli, K., Hoffman, K., Sedlazeck, F., Metcalf, G., Piedra, P., Muzny, D., & Gibbs, R. (2020). Oligonucleotide capture sequencing of the SARS-CoV-2 genome and subgenomic fragments from COVID-19 individuals. In *bioRxiv: The preprint server for biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.27.223495>

- Enjuanes, L., Sola, I., Almazan, F., Ortego, J., Izeta, A., Gonzalez, J. M., Alonso, S., Sanchez, J. M., Escors, D., Calvo, E., Riquelme, C., & Sanchez, C. (2001). Coronavirus derived expression systems. *Journal of Biotechnology*, *88*(3), 183–204. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00281-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00281-4)
- Enserink, M. (2003). Clues to the Animal Origins of SARS. *Science*, *300*(5624), 1351–1351. <https://doi.org/10.1126/science.300.5624.1351a>
- Feikin, D. R., Higdon, M. M., Abu-Raddad, L. J., Andrews, N., Araos, R., Goldberg, Y., Groome, M. J., Huppert, A., O'Brien, K. L., Smith, P. G., Wilder-Smith, A., Zeger, S., Deloria Knoll, M., & Patel, M. K. (2022). Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: Results of a systematic review and meta-regression. *The Lancet*, *399*(10328), 924–944. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00152-0)
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, *17*(6), 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Ferkol, T., & Schraufnagel, D. (2014). The Global Burden of Respiratory Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, *11*(3), 404–406. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201311-405PS>
- Firth, A. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Wills, N. M., Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., Atkins, J. F., Snijder, E. J., & Posthuma, C. C. (2011). Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 5), 1097–1106. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029264-0>
- Fisman, D. (2012). Seasonality of viral infections: Mechanisms and unknowns. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(10), 946–954. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03968.x>
- Focosi, D., McConnell, S., Casadevall, A., Cappello, E., Valdiserra, G., & Tuccori, M. (2022). Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. *The Lancet Infectious Diseases*, *22*(11), e311–e326. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00311-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00311-5)
- Fraser, C., Riley, S., Anderson, R. M., & Ferguson, N. M. (2004). Factors that make an infectious disease outbreak controllable. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(16), 6146–6151. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307506101>

- Frérot, M., Lefebvre, A., Aho, S., Callier, P., Astruc, K., & Glélé, L. S. A. (2018). What is epidemiology? Changing definitions of epidemiology 1978-2017. *PLOS ONE*, *13*(12), e0208442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208442>
- García-Salido, A. (2020). Narrative review of the immune response against coronavirus: An overview, applicability for SARS-COV-2, and therapeutic implications. *Anales De Pediatría*, *93*(1), 60.e1-60.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2020.04.006>
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., ... Cox, N. J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(5937), 197–201. <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
- Ghazy, R. M., Ashmawy, R., Hamdy, N. A., Elhadi, Y. A. M., Reyad, O. A., Elmalawany, D., Almaghraby, A., Shaaban, R., & Taha, S. H. N. (2022). Efficacy and Effectiveness of SARS-CoV-2 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines*, *10*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030350>
- Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., & Ciccozzi, M. (2021). Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *538*, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>
- Girard, M. P., Cherian, T., Pervikov, Y., & Kieny, M. P. (2005). A review of vaccine research and development: Human acute respiratory infections. *Vaccine*, *23*(50), 5708–5724. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.046>
- GISAID - Initiative. (n.d.). Retrieved June 9, 2021, from <https://www.gisaid.org/>
- Glezen, W. P. (1996). Emerging infections: Pandemic influenza. *Epidemiologic Reviews*, *18*(1), 64–76. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017917>
- Grandien, M. (1996). Viral diagnosis by antigen detection techniques. *Clinical and Diagnostic Virology*, *5*(2–3), 81–90. [https://doi.org/10.1016/0928-0197\(96\)00209-7](https://doi.org/10.1016/0928-0197(96)00209-7)

- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Gwaltney, J. M. (2002). Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections. *The American Journal of Medicine*, 112(6, Supplement 1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)01059-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)01059-2)
- Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P., Bedford, T., & Neher, R. A. (2018). Nextstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, 34(23), 4121–4123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
- Hadj Hassine, I. (2022). Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Reviews in Medical Virology*, 32(4), e2313. <https://doi.org/10.1002/rmv.2313>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- He, J., Tao, H., Yan, Y., Huang, S.-Y., & Xiao, Y. (2020). Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(4), 428. <https://doi.org/10.3390/v12040428>
- Heikkinen, T., & Järvinen, A. (2003). The common cold. *Lancet (London, England)*, 361(9351), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12162-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12162-9)
- Heikkinen, T., Marttila, J., Salmi, A. A., & Ruuskanen, O. (2002). Nasal Swab versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4337–4339. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4337-4339.2002>
- Hennon, T. R., Penque, M. D., Abdul-Aziz, R., Alibrahim, O. S., McGreevy, M. B., Prout, A. J., Schaefer, B. A., Ambrusko, S. J., Pastore, J. V., Turkovich, S. J., Gomez-Duarte, O. G., & Hicar, M. D. (2020). COVID-19 associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) guidelines; a Western New York approach. *Progress in Pediatric Cardiology*, 57, 101232. <https://doi.org/10.1016/j.ppedcard.2020.101232>

- Horita, N., & Fukumoto, T. (2023). Global case fatality rate from COVID-19 has decreased by 96.8% during 2.5 years of the pandemic. *Journal of Medical Virology*, 95(1), e28231. <https://doi.org/10.1002/jmv.28231>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, B., Zeng, L.-P., Yang, X.-L., Ge, X.-Y., Zhang, W., Li, B., Xie, J.-Z., Shen, X.-R., Zhang, Y.-Z., Wang, N., Luo, D.-S., Zheng, X.-S., Wang, M.-N., Daszak, P., Wang, L.-F., Cui, J., & Shi, Z.-L. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathogens*, 13(11), e1006698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Informes vigilancia genómica.* (2021, May 11). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/informes-diarios/vigilancia-genomica>
- Interferon Alfacon-1 Plus Corticosteroids in Severe Acute Respiratory Syndrome: A Preliminary Study | Critical Care Medicine | JAMA | JAMA Network.* (n.d.). Retrieved March 1, 2023, from <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/197895>
- Irassar, J. I., Bartel, E., Obando, D., & Teresa, V. (2022). Comparación epidemiológica de las olas por COVID-19 en la provincia de Buenos Aires, Argentina, 2020-2021. *Revista Argentina de Salud Pública*, 14. <https://rasp.msal.gov.ar/index.php/rasp/article/view/755>
- Izda, V., Jeffries, M. A., & Sawalha, A. H. (2021). COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. *Clinical Immunology*, 222, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108634>
- Jackson, S., Mathews, K. H., Pulanić, D., Falconer, R., Rudan, I., Campbell, H., & Nair, H. (2013). Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children – a systematic review and

- meta-analysis. *Croatian Medical Journal*, 54(2), 110–121.  
<https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.110>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166.  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal, C., Perez, L. G., ... Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182(4), 812-827.e19.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
- Körper, S., Grüner, B., Zickler, D., Wiesmann, T., Wuchter, P., Blasczyk, R., Zacharowski, K., Spieth, P., Tonn, T., Rosenberger, P., Paul, G., Pilch, J., Schwäble, J., Bakchoul, T., Thiele, T., Knoerlein, J., Dollinger, M. M., Krebs, J., Bentz, M., ... Schrezenmeier, H. (2022). One-year follow-up of the CAPSID randomized trial for high-dose convalescent plasma in severe COVID-19 patients. *The Journal of Clinical Investigation*, e163657. <https://doi.org/10.1172/JCI163657>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kumar, R., Nagpal, S., Kaushik, S., & Mendiratta, S. (2020). COVID-19 diagnostic approaches: Different roads to the same destination. *VirusDisease*, 31(2), 97–105. <https://doi.org/10.1007/s13337-020-00599-7>
- Kuszewski, K., & Brydak, L. (2000). The epidemiology and history of influenza. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 54(4), 188–195. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(00\)89025-3](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(00)89025-3)
- Lai, M. M. C., & Cavanagh, D. (1997). The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48, 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)



- Lambisia, A. W., Mohammed, K. S., Makori, T. O., Ndwiga, L., Mburu, M. W., Morobe, J. M., Moraa, E. O., Musyoki, J., Murunga, N., Mwangi, J. N., Nokes, D. J., Agoti, C. N., Ochola-Oyier, L. I., & Githinji, G. (2022). Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC Network V4 Primers and Whole Genome Sequencing Protocol. *Frontiers in Medicine*, 9, 836728. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.836728>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Larrosa, J. M. C. (2021). SARS-CoV-2 in Argentina: Lockdown, mobility, and contagion. *Journal of Medical Virology*, 93(4), 2252–2261. <https://doi.org/10.1002/jmv.26659>
- Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of Internal Medicine*, M20-0504. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
- Lemey, P., Hong, S. L., Hill, V., Baele, G., Poletto, C., Colizza, V., O'Toole, Á., McCrone, J. T., Andersen, K. G., Worobey, M., Nelson, M. I., Rambaut, A., & Suchard, M. A. (2020). Accommodating individual travel history and unsampled diversity in Bayesian phylogeographic inference of SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18877-9>
- Li, A., & Kasai, T. (2011). The Asia Pacific Strategy for Emerging Diseases – a strategy for regional health security. *Western Pacific Surveillance and Response Journal: WPSAR*, 2(1), 6–9. <https://doi.org/10.5365/WPSAR.2011.2.1.001>
- Li, J., Huang, D. Q., Zou, B., Yang, H., Hui, W. Z., Rui, F., Yee, N. T. S., Liu, C., Nerurkar, S. N., Kai, J. C. Y., Teng, M. L. P., Li, X., Zeng, H., Borghi, J. A., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2020). Epidemiology of COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis of Clinical Characteristics, Risk factors and Outcomes. *Journal of Medical Virology*, 10.1002/jmv.26424. <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>

- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., ... Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, *382*(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Cramer, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., & Wang, L.-F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science (New York, N.Y.)*, *310*(5748), 676–679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Li, Y.-D., Chi, W.-Y., Su, J.-H., Ferrall, L., Hung, C.-F., & Wu, T.-C. (2020). Coronavirus vaccine development: From SARS and MERS to COVID-19. *Journal of Biomedical Science*, *27*(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00695-2>
- Lin, L., Wang, Y., Li, Q., Hu, M., & Shi, Y. (2022). Novel SARS-CoV-2 therapeutic targets: RNA proofreading complex and virus-induced senescence. *Cell Death & Differentiation*, *29*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00909-6>
- Lin, T., & Sundby, L. (2023). Proofreading Function and Mutations in SARS-CoV-2 and their Impact on Viral Infectivity. *Journal of Student Research*, *12*(1). <https://doi.org/10.47611/jsrhs.v12i1.3906>
- Lorenzo-Redondo, R., Nam, H. H., Roberts, S. C., Simons, L. M., Jennings, L. J., Qi, C., Achenbach, C. J., Hauser, A. R., Ison, M. G., Hultquist, J. F., & Ozer, E. A. (2020). A clade of SARS-CoV-2 viruses associated with lower viral loads in patient upper airways. *eBioMedicine*, *62*, 103112. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103112>
- Lorenzo-Redondo, R., Ozer, E. A., Achenbach, C. J., D'Aquila, R. T., & Hultquist, J. F. (2021). Molecular epidemiology in the HIV and SARS-CoV-2 pandemics. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *16*(1), 11–24. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000660>
- Loutfy, M. R., Blatt, L. M., Siminovitch, K. A., Ward, S., Wolff, B., Lho, H., Pham, D. H., Deif, H., LaMere, E. A., Chang, M., Kain, K. C., Farcas, G. A., Ferguson, P., Latchford, M., Levy, G., Dennis, J. W., Lai, E. K. Y., & Fish, E. N. (2003). Interferon Alfacon-1 Plus Corticosteroids in Severe Acute

- Respiratory SyndromeA Preliminary Study. *JAMA*, 290(24), 3222–3228.  
<https://doi.org/10.1001/jama.290.24.3222>
- Mackay, I. M., & Arden, K. E. (2015). MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, 12, 222. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5>
- Macpherson, K., Cooper, K., Harbour, J., Mahal, D., Miller, C., & Nairn, M. (2022). Experiences of living with long COVID and of accessing healthcare services: A qualitative systematic review. *BMJ Open*, 12(1), e050979. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-050979>
- Mahony, J. B., Petrich, A., & Smieja, M. (2011). Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(5–6), 217–249.  
<https://doi.org/10.3109/10408363.2011.640976>
- Marcone, D. N., Ellis, A., Videla, C., Ekstrom, J., Ricarte, C., Carballal, G., Vidaurreta, S. M., & Echavarría, M. (2013a). Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(3), e105-110.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31827cd06f>
- Marcone, D. N., Ellis, A., Videla, C., Ekstrom, J., Ricarte, C., Carballal, G., Vidaurreta, S. M., & Echavarría, M. (2013b). Viral Etiology of Acute Respiratory Infections in Hospitalized and Outpatient Children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(3), e105.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31827cd06f>
- Marcone, D. N., Ellis, A., Videla, C. M., Ekstrom, J., Ricarte, C., Carballal, G., Vidaurreta, S. M., & Echavarría, M. S. (2013c). *Viral etiology of acute respiratory infection in hospitalized and outpatient children from Buenos Aires, Argentina.*  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31827cd06f>
- Mardian, Y., Kosasih, H., Karyana, M., Neal, A., & Lau, C.-Y. (2021). Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Frontiers in Medicine*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.615099>

- Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I., & Katzourakis, A. (2023). The evolution of SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>
- Martín-Sánchez, V., Barquilla-García, A., Vitelli-Storelli, F., Segura-Fragoso, A., Ruiz-García, A., Serrano-Cumplido, A., Olmo-Quintana, V., & Calderón-Montero, A. (2020). Análisis de las tasas de letalidad de la infección por SARS-CoV-2 en las comunidades autónomas de España. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 46, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2020.06.013>
- Mechanisms of Host Defense following Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) Pulmonary Infection of Mice | The Journal of Immunology*. (n.d.). Retrieved February 21, 2022, from <https://www.jimmunol.org/content/173/6/4030>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (n.d.). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Moriyama, M., Hugentobler, W. J., & Iwasaki, A. (2020). Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annual Review of Virology*, 7(1), 83–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012420-022445>
- Nei, M., & Takezaki, N. (n.d.). *ESTIMATION OF GENETIC DISTANCES AND PHYLOGENETIC TREES FROM DNA ANALYSIS*.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nguyen, N. N., Hoang, V. T., Dao, T. L., Dudouet, P., Eldin, C., & Gautret, P. (2022). Clinical patterns of somatic symptoms in patients suffering from post-acute long COVID: A systematic review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(4), 515–545. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04417-4>
- Niederman, M. S., & Torres, A. (2022). Respiratory infections. *European Respiratory Review*, 31(166). <https://doi.org/10.1183/16000617.0150-2022>

- PACES, J., STRIZOVA, Z., SMRZ, D., & CERNY, J. (2020). COVID-19 and the Immune System. *Physiological Research*, 69(3), 379–388. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934492>
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R. C., Zella, D., & Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
- Pagani, I., Ghezzi, S., Alberti, S., Poli, G., & Vicenzi, E. (2023). Origin and evolution of SARS-CoV-2. *European Physical Journal Plus*, 138(2), 157. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>
- Park, S. B., Khan, M., Chiliveri, S. C., Hu, X., Irvin, P., Leek, M., Grieshaber, A., Hu, Z., Jang, E. S., Bax, A., & Liang, T. J. (2023). SARS-CoV-2 omicron variants harbor spike protein mutations responsible for their attenuated fusogenic phenotype. *Communications Biology*, 6, 556. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04923-x>
- Peiris, J. S. M., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. M. E., & Stöhr, K. (2003). The severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 349(25), 2431–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032498>
- Phillips, B. L., Brown, G. P., Webb, J. K., & Shine, R. (2006). Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439(7078), Article 7078. <https://doi.org/10.1038/439803a>
- Posada, D. (2009). Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 537, 93–112. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_5)
- Pugliese, A., Beltramo, T., & Torre, D. (2007). Emerging and re-emerging viral infections in Europe. *Cell Biochemistry and Function*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cbf.1342>
- Pyrk, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M. F., Ross, H. A., Berkhout, B., & van der Hoek, L. (2006). Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *Journal of Molecular Biology*, 364(5), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.074>
- Rabinovich, G. A., & Geffner, J. (2021). Facing up to the COVID-19 pandemic in Argentina. *Nature Immunology*, 22(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00873-w>

- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Levy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, 5(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Recursos relacionados a la problemática | Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación.* (n.d.). Retrieved February 24, 2022, from <https://bancos.salud.gob.ar/bancos/materiales-para-equipos-de-salud/soporte/boletines-epidemiologicos/>
- Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.* (2021, September 5). <https://www.paho.org/es/temas/influenza/red-regional-vigilancia-genomica-covid-19>
- Rehm, H. L., Bale, S. J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J. S., Brown, K. K., Deignan, J. L., Friez, M. J., Funke, B. H., Hegde, M. R., Lyon, E., & Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. (2013). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15(9), 733–747. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
- Reporte interactivo de estadísticas de salud.* (2021, March 9). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/salud/deis/reportes-interactivos>
- S, T., S, S., H, W., D, G., A, M., Z, A., X, L., W, X., I, M.-E., J, R., E, T., X, Z., A, M., D, L., & D, I. (2021). Effectiveness of public health measures in reducing the incidence of covid-19, SARS-CoV-2 transmission, and covid-19 mortality: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 375. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068302>

- Salzberger, B., Buder, F., Lampl, B., Ehrenstein, B., Hitzentbichler, F., Holzmann, T., Schmidt, B., & Hanses, F. (2021). Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection*, 49(2), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01531-3>
- Sato, S., & Kiyono, H. (2012). The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current Opinion in Virology*, 2(3), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.009>
- Se acaba la emergencia por la pandemia, pero el COVID continua | Noticias ONU.* (2023, May 5). <https://news.un.org/es/story/2023/05/1520732>
- Shieh, W.-J., Blau, D. M., Denison, A. M., Deleon-Carnes, M., Adem, P., Bhatnagar, J., Sumner, J., Liu, L., Patel, M., Batten, B., Greer, P., Jones, T., Smith, C., Bartlett, J., Montague, J., White, E., Rollin, D., Gao, R., Seales, C., ... Zaki, S. R. (2010). 2009 pandemic influenza A (H1N1): Pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *The American Journal of Pathology*, 177(1), 166–175. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100115>
- Siddiqi, H. K., & Mehra, M. R. (2020). COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 39(5), 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>
- Slingenbergh, J. (2013). World Livestock 2013: Changing disease landscapes. *World Livestock 2013: Changing Disease Landscapes*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143033843>
- Snapshot.* (n.d.). Retrieved February 21, 2022, from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- Sofi, M. S., Hamid, A., & Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and Health*, 2(4), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.11.002>
- SRAS | Información básica sobre el SRAS | CDC.* (n.d.). Retrieved October 26, 2022, from <https://www.cdc.gov/sars/about/fs-sars-sp.html>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

- Sun, Y., Xue, F., Guo, Y., Ma, M., Hao, N., Zhang, X. C., Lou, Z., Li, X., & Rao, Z. (2009). Crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus leader protease Nsp1alpha. *Journal of Virology*, *83*(21), 10931–10940. <https://doi.org/10.1128/JVI.02579-08>
- Sylvester, S. V., Rusu, R., Chan, B., Bellows, M., O’Keefe, C., & Nicholson, S. (2022). Sex differences in sequelae from COVID-19 infection and in long COVID syndrome: A review. *Current Medical Research and Opinion*, *38*(8), 1391–1399. <https://doi.org/10.1080/03007995.2022.2081454>
- Thompson, A., & Kutz, S. (2019). Introduction to the Special Issue on ‘Emerging Zoonoses and Wildlife.’ *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *9*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.07.002>
- Torres, C., Mojsiejczuk, L., Acuña, D., Alexay, S., Amadio, A., Aulicino, P., Debat, H., Fay, F., Fernández, F., Giri, A. A., Goya, S., König, G., Lucero, H., Nabaes Jodar, M., Pianciola, L., Sfalcin, J. A., Acevedo, R. M., Bengoa Luoni, S., Bolatti, E. M., ... Viegas, M. (2021). Cost-Effective Method to Perform SARS-CoV-2 Variant Surveillance: Detection of Alpha, Gamma, Lambda, Delta, Epsilon, and Zeta in Argentina. *Frontiers in Medicine*, *8*, 755463. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.755463>
- Torres Carolina, Laura, M., Dolores, A., Sofía, A., Ariel, A., Paula, A., Humberto, D., Franco, F., Stephanie, G., Guido, K., Mercedes, N. J., Luis, P., Sofía, B., Marco, C., Cecilia, C., José, D. S. M., Florencia, E. M., Ailen, F., Inés, G. M., ... Mariana, V. (2021). *Surveillance of SARS-CoV-2 variants in Argentina: Detection of Alpha, Gamma, Lambda, Epsilon and Zeta in locally transmitted and imported cases* (p. 2021.07.19.21260779). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.07.19.21260779>
- Tracking SARS-CoV-2 variants*. (2021, September 5). <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- Tregoning, J. S., & Schwarze, J. (2010). Respiratory viral infections in infants: Causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(1), 74–98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-09>



- Tyrrell, D. a. J., Alexander, D. J., Almeida, J. D., Cunningham, C. H., Easterday, B. C., Garwes, D. J., Hierholzer, J. C., Kapikian, A., Macnaughton, M. R., & McIntosh, K. (1978). Coronaviridae: Second Report. *Intervirology*, *10*(6), 321–328. <https://doi.org/10.1159/000148996>
- Updated Nextstrain SARS-CoV-2 clade naming strategy. (2021, September 5). <https://nextstrain.org//blog/2021-01-06-updated-SARS-CoV-2-clade-naming>
- Ursin, R. L., & Klein, S. L. (2021). Sex Differences in Respiratory Viral Pathogenesis and Treatments. *Annual Review of Virology*, *8*(1), 393–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-092720>
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J. M., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M. E., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, *10*(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- van der Hoek, L., Sure, K., Ihorst, G., Stang, A., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Petersen, G., Forster, J., Berkhout, B., & Uberla, K. (2005). Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Medicine*, *2*(8), e240. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020240>
- Vaqué Rafart, J. (2005). Síndrome respiratorio agudo grave (SARS). *Anales de Pediatría*, *62*, 6–11.
- Viboud, C., Grais, R. F., Lafont, B. A. P., Miller, M. A., Simonsen, L., & Multinational Influenza Seasonal Mortality Study Group. (2005). Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: Evidence for a smoldering pandemic. *The Journal of Infectious Diseases*, *192*(2), 233–248. <https://doi.org/10.1086/431150>
- Vita, S., Rosati, S., Ascoli Bartoli, T., Beccacece, A., D’Abramo, A., Mariano, A., Scorzolini, L., Goletti, D., & Nicastri, E. (2022). Monoclonal Antibodies for Pre- and Postexposure Prophylaxis of COVID-19: Review of the Literature. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *11*(8), 882. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080882>
- Vogels, C. B. F., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., Petrone, M. E., Casanovas-Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A. J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D. J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J. E., ... Grubaugh, N. D. (2020). Analytical sensitivity

- and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature Microbiology*, 5(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)
- Wang, J., Chen, X., Guo, Z., Zhao, S., Huang, Z., Zhuang, Z., Wong, E. L., Zee, B. C.-Y., Chong, M. K. C., Wang, M. H., & Yeoh, E. K. (2021). Superspreading and heterogeneity in transmission of SARS, MERS, and COVID-19: A systematic review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5039–5046. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.045>
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19—11 March 2020. (n.d.). Retrieved March 29, 2023, from <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B. H. L., Poon, R. W. S., Cai, J. J., Luk, W., Poon, L. L. M., Wong, S. S. Y., Guan, Y., Peiris, J. S. M., & Yuen, K. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology*, 79(2), 884–895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
- Woolhouse, M. E. J., Dye, C., Taylor, L. H., Latham, S. M., & woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
- Wróbel, B. (2008). Statistical measures of uncertainty for branches in phylogenetic trees inferred from molecular sequences by using model-based methods. *Journal of Applied Genetics*, 49(1), 49–67. <https://doi.org/10.1007/BF03195249>

- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), Article 7798. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Yan, W., Zheng, Y., Zeng, X., He, B., & Cheng, W. (2022). Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>
- Ye, Z.-W., Yuan, S., Yuen, K.-S., Fung, S.-Y., Chan, C.-P., & Jin, D.-Y. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(10), 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *141*(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>
- Zambrana Montaña, R., Culasso, A. C. A., Fernández, F., Marquez, N., Debat, H., Salmerón, M., Zamora, A. M., Ruíz de Huidobro, G., Costas, D., Alabarse, G., Charre, M. A., Fridman, A. D., Mamani, C., Vaca, F., Maza Diaz, C., Raskovsky, V., Lavaque, E., Lesser, V., Cajal, P., ... Viegas, M. (2022). Evolution of SARS-CoV-2 during the first year of the COVID-19 pandemic in Northwestern Argentina. *Virus Research*, 198936. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198936>
- Zeng, B., Gao, L., Zhou, Q., Yu, K., & Sun, F. (2022). Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, *20*(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02397-y>
- Zhao, N., Zhou, N., Fan, H., Ding, J., Xu, X., Dong, X., Dong, X., Xu, D., Min, X., Yu, Y., Gong, H., Mao, L., & He, M. (2022). Mutations and Phylogenetic Analyses of SARS-CoV-2 Among Imported COVID-19 From Abroad in Nanjing, China. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.851323>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ...

- Shi, Z.-L. (2020a). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020b). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), Article 7798. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
- Zhu, J., Zhong, Z., Ji, P., Li, H., Li, B., Pang, J., Zhang, J., & Zhao, C. (2020). Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: A meta-analysis. *Family Medicine and Community Health*, 8(2), e000406. <https://doi.org/10.1136/fmch-2020-000406>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020a). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020b). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zumla, A., Hui, D. S., & Perlman, S. (2015). Middle East respiratory syndrome. *Lancet (London, England)*, 386(9997), 995–1007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454-8)

## 8. Anexo

### 8.1 Anexo 1. Aprobación del proyecto por el Comité de Ética Institucional



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
2021 – Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein.

Mar del Plata, 30 de septiembre de 2021

De acuerdo con lo establecido en la normativa vigente y las guías internacionales en ética de la investigación epidemiológica (Resolución Ministerial 1.480/2011 – pautas CIOMS 2016 - Disposición ANMAT 6677/10 -Ley 26994/14-CODIGO CIVIL Y COMERCIAL DE LA NACION), este Comité ha evaluado el proyecto de investigación que a continuación se detalla.

Título del proyecto: Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas.

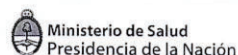
Investigador principal: Lic. Carlos CIMMINO  
Código del protocolo: (CIMMINO 05/2021)

Institución donde se desarrollará:

- a. Servicio de Virología y Centro Nacional de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica del Virus Influenza y Centro Nacional de Influenza de OMS, Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud ANLIS. Ituzaingo 3520, Mar del Plata (7600), Buenos Aires, Argentina
- b. Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 954, CABA (1113), Argentina
- c. Centro de Investigaciones Bionanociencias (CIBION CONICET). Godoy Cruz 2390, C1425FQD CABA.

Luego de evaluar los aspectos éticos y metodológicos de la versión 05/2021 del protocolo mencionado (Código:Cimmino-05/2021), el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Epidemiología "Juan H. Jara" con sede en la calle Ituzaingo 3520 de Mar del Plata, que cumple con el reglamento de Registro y Acreditación de Comités Institucionales de Ética en la Investigación, Registro N° 059/2016, FOLIO 107 DEL Libro de Actas N°2, con fecha 02/09/2016 (Código:Cimmino-05/2021), considera que:

Luego de haber evaluado el CV y la carta compromiso del investigador/ra, éste/a reúne las capacidades estipuladas en R.M 1480, P3 para llevar a cabo el proyecto: Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas.





## República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional

2021 – Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein.

En cuanto al protocolo, reúne la información necesaria, clara y suficiente y desde el punto de vista social y científico la investigación reúne los requisitos establecidos en la R.M 1480; P1 y P2. No vulnera ninguno de los principios básicos éticos contenidos en dicha Resolución ni de los derechos humanos contenidos en la Declaración Internacional sobre Datos Genéticos Humanos, Art. 1 inciso A, ni lo establecido en La Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013) en los puntos 6 y 22.

La elección de la/los participantes y la metodología propuesta por el investigador en su protocolo, resulta adecuada, ya que la misma encuadra la temática propia de la ciencia de la salud y los objetivos propuestos, tal como resulta propuesto en la R.M 1480, P12.

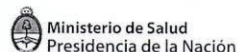
### Respecto del Consentimiento Informado:

El procedimiento para la obtención del CI, cumple con lo referido a la R.M 1480, puesto que su obtención es la apropiada y garantiza lo establecido en A3; P6, P7 y P8, de la mencionada Resolución Ministerial. Como así también el cumplimiento de los puntos A, B, C, y D referidas a la obtención de muestras biológicas contenidas en la misma Resolución Ministerial, y lo establecido en La Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013) puntos 25 y 26, observándose el cumplimiento con la Ley 25326, Artículos 6 y 7, y el Dictamen 046/2011, Inciso 1, a, d,

La confidencialidad y la privacidad de los datos de los/las sujetos participantes están garantizadas por el/la investigador/a de manera explícita, conforme a lo establecido por R.M 1480, en A6, Confidencialidad de la Información, P13 como así también el inciso 1 punto h del Dictamen 046/2011 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013) punto 24.

El/La investigador/a asume el compromiso de enviar a este Comité los informes de avance y el informe final del protocolo conforme se establece en; La Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013) punto 23,

Por ello, se DICTAMINA:





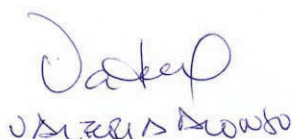
República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
2021 – Año de Homenaje al Premio Nobel de Medicina Dr. César Milstein.

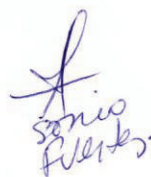
Que efectuadas las consideraciones que anteceden y en cumplimiento con lo establecido en la R. M 1480, A2, P4, P5 se califica como aceptable desde el punto de vista bioético referido al proyecto de investigación: Epidemiología molecular de coronavirus SARS-CoV-2 en Mar del Plata y zonas aledañas, en su versión 05 traído a consideración de este Comité.

Nota: Para cada instancia de evaluación, es requisito que se envíe a este comité el protocolo completo con las modificaciones sugeridas (protocolo, instrumentos de recolección de datos, consentimiento y asentimiento informado según corresponda). También se requiere que se agregue a continuación del título del trabajo el número correlativo siguiente a la versión anterior.

Investigador principal: Carlos Cimmino (Código: Cimmino 05/2021)

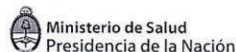
  
Guillermo Valentini

  
Juan Carlos Acosta

  
Sergio Filiberto

  
Guillermo Cepa

  
Mabelo Colera



8.2 Anexo 2. Listado de secuencias de la región parcial del gen S con los linajes asignados según las posiciones marcadoras (mutaciones), Región Sanitaria VIII.

Nombre sec	Fecha mtra	Linaje	Mutaciones			
PAIS-S-A01419	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01418	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01416	2021-04-11	NO_VOC	T478K	P681H	T732A	
PAIS-S-A01415	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01413	2021-04-11	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A01412	2021-04-11	B.1.427	L452R			
PAIS-S-A01411	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01410	2021-04-11	B.1.427	L452R			
PAIS-S-A01409	2021-04-11	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A01408	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01407	2021-04-11	B.1.427	L452R			
PAIS-S-A01406	2021-04-11	NO_VOC	c.1629 silente			
PAIS-S-A01404	2021-04-11	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A01403	2021-04-11	NO_VOC				
PAIS-S-A1555	2021-04-19	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A1540	2021-04-19	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1547	2021-04-20	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1543	2021-04-20	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1544	2021-04-20	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1553	2021-04-20	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A1541	2021-04-20	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A1550	2021-04-20	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A1549	2021-04-20	NO_VOC				
PAIS-S-A1556	2021-04-21	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A1551	2021-04-21	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1542	2021-04-21	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A1552	2021-04-21	C.37	L452Q	F490S	c,2169 silente	
PAIS-S-A1548	2021-04-22	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2046	2021-05-29	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2061	2021-05-29	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2045	2021-05-30	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2060	2021-05-30	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2064	2021-05-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2052	2021-05-30	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2062	2021-05-31	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A2050	2021-05-31	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2051	2021-06-01	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2048	2021-05-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2057	2021-05-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2063	2021-05-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2059	2021-05-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2053	2021-06-01	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2044	2021-06-01	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2043	2021-06-01	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2054	2021-06-01	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	



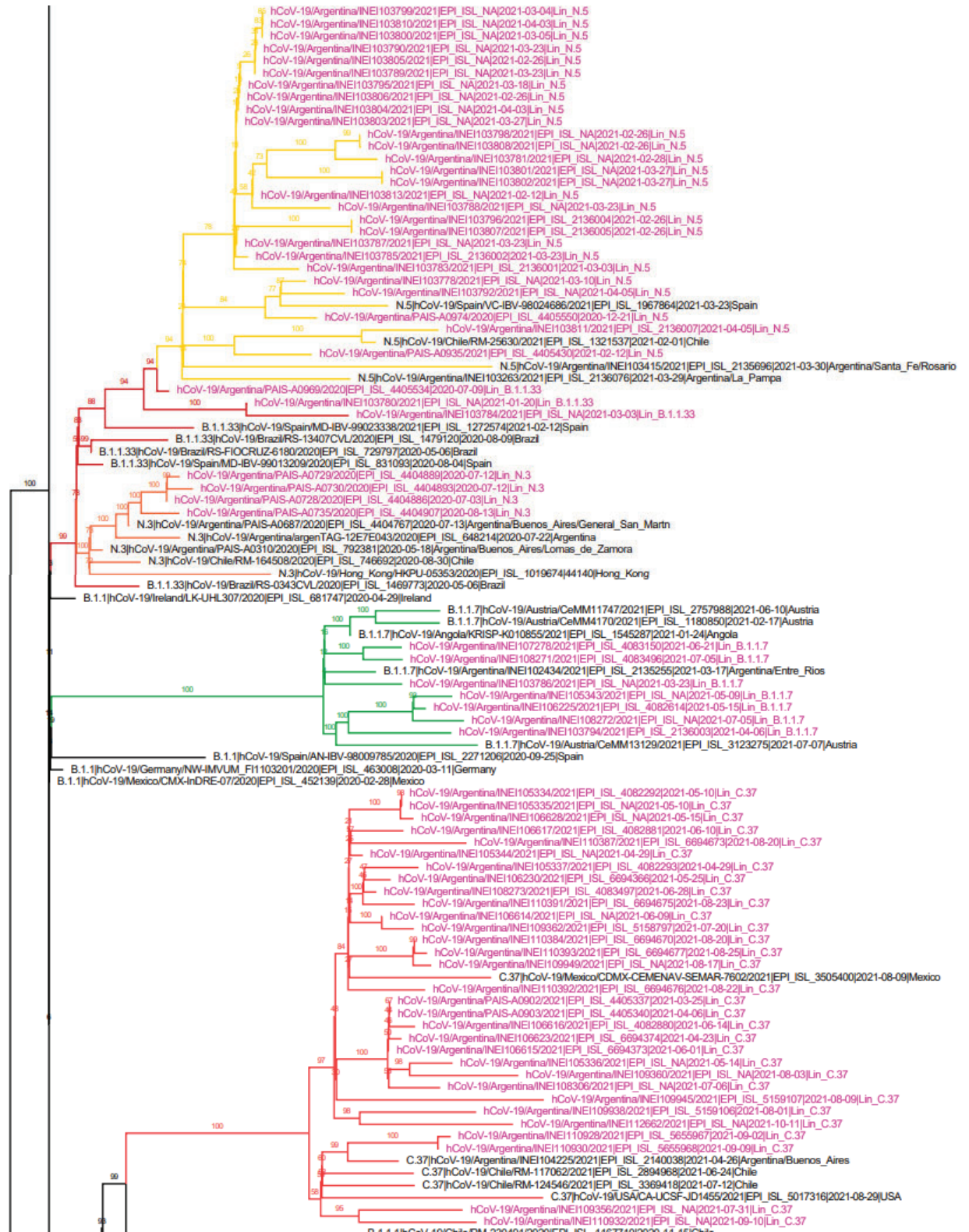
Nombre sec	Fecha mtra	Linaje	Mutaciones			
PAIS-S-A2056	2021-06-01	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2047	2021-06-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2049	2021-06-02	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	A706P
PAIS-S-A2055	2021-06-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2058	2021-06-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2234	2021-07-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2238	2021-07-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	2025g>A
PAIS-S-A2231	2021-07-02	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2233	2021-07-02	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2235	2021-07-02	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	1629c>T
PAIS-S-A2242	2021-07-03	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2240	2021-07-03	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2241	2021-07-03	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2239	2021-07-03	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2243	2021-07-03	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2237	2021-07-02	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A2236	2021-07-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2232	2021-07-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2230	2021-07-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2245	2021-07-04	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2244	2021-07-04	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2520	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2503	2021-07-31	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A2507	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2504	2021-07-31	C.37	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2521	2021-07-31	P.1	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2514	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2515	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2508	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2505	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2519	2021-07-31	C.37	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2501	2021-07-31	P.1	L452Q	F490S	2169c>T	T678I
PAIS-S-A2512	2021-07-31	P.1	L452Q	F490S	2169c>T	c.1461 silente
PAIS-S-A2506	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2511	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2513	2021-07-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2502	2021-08-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	L552F
PAIS-S-A2518	2021-08-02	C.37	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2509	2021-08-01	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2516	2021-08-01	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2517	2021-08-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2510	2021-08-02	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2668	2021-08-14	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	c,1468t>g y c,1469t>c
PAIS-S-A2669	2021-08-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2670	2021-08-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2671	2021-08-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2667	2021-08-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2672	2021-08-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675

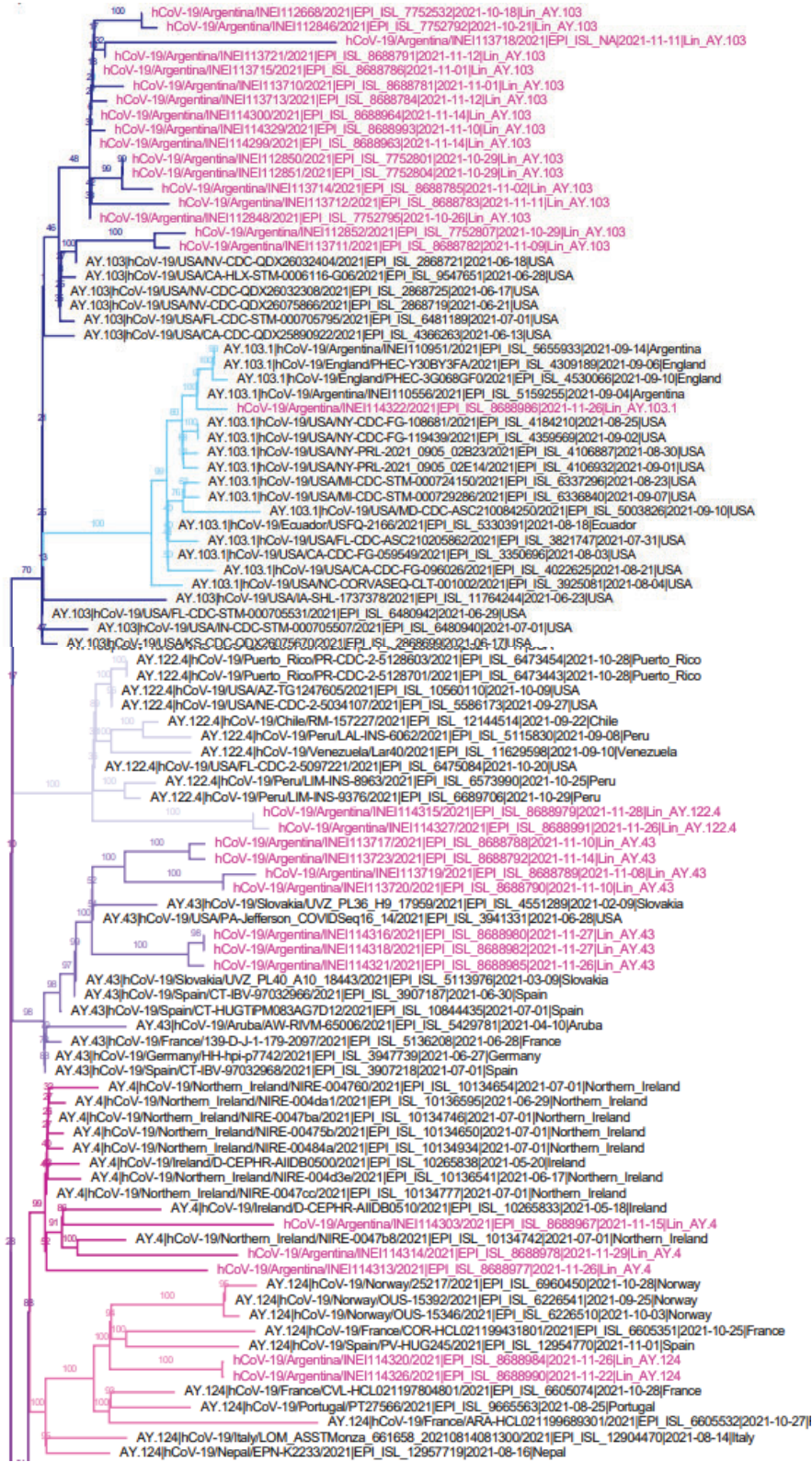
Nombre sec	Fecha mtra	Linaje	Mutaciones			
PAIS-S-A2673	2021-08-18	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2674	2021-08-18	C.37	L452Q	F490S	2169c>T	
PAIS-S-A2763	2021-08-28	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A2775	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	A623V
PAIS-S-A2772	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	A623V
PAIS-S-A2764	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	1869 t>C silente
PAIS-S-A2768	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2766	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2774	2021-08-28	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2776	2021-08-29	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2773	2021-08-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2769	2021-08-30	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2767	2021-08-30	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2777	2021-08-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	1869 t>C silente
PAIS-S-A2765	2021-08-31	B.1.1.7	N501Y	A570D	P681H	T716I
PAIS-S-A2771	2021-08-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2770	2021-08-31	P.1	E484K	N501Y	H655Y	
PAIS-S-A2916	2021-09-14	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2917	2021-09-15	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2918	2021-09-15	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H
PAIS-S-A2919	2021-09-15	P.1	E484K	N501Y	H655Y	Q675H

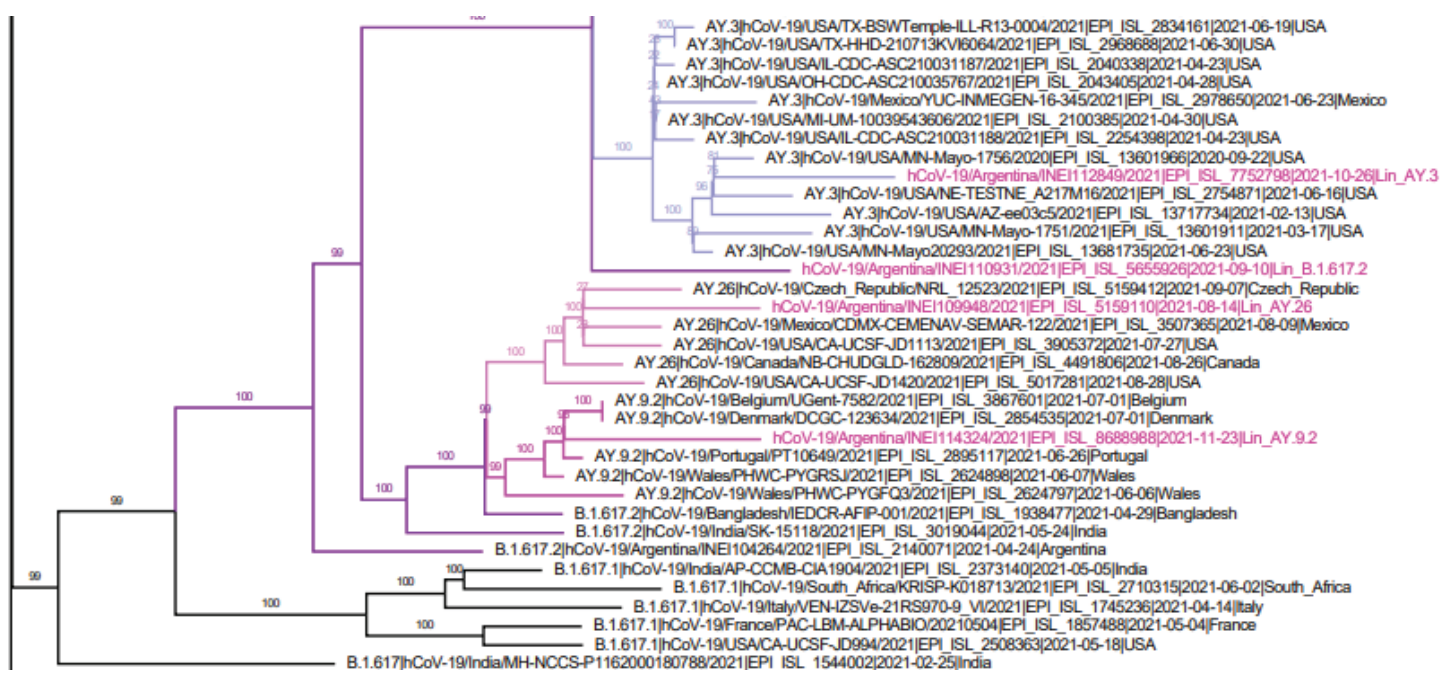
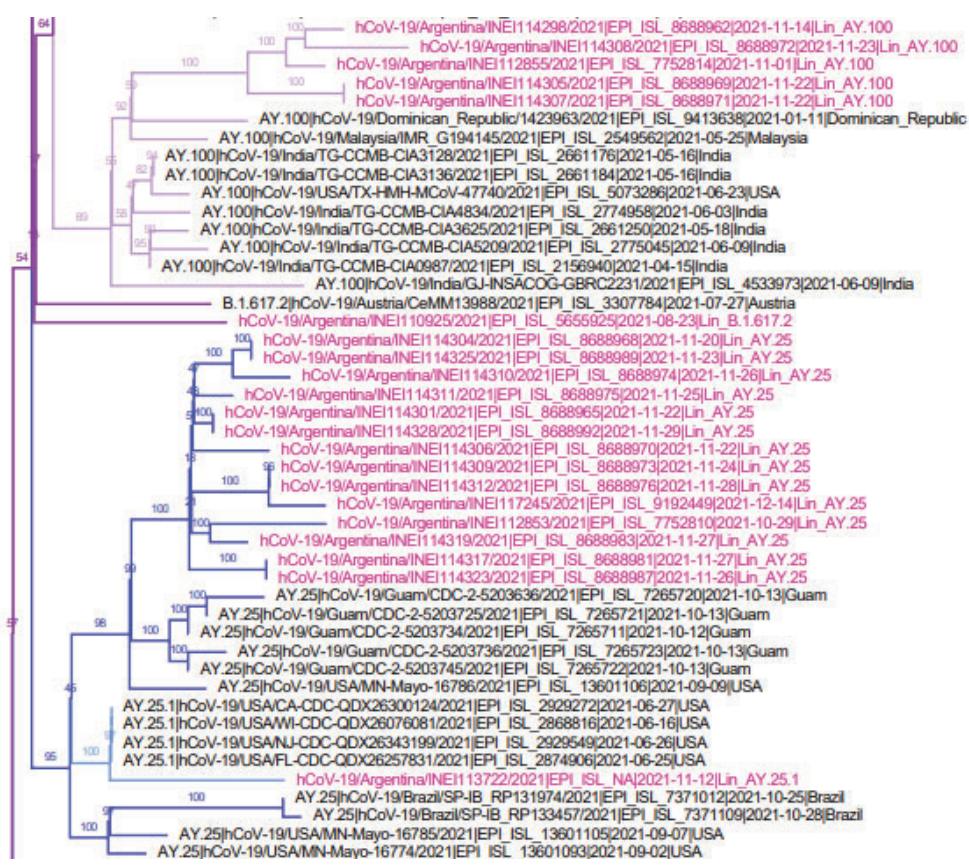
### 8.3 Anexo 3. Detalle del árbol filogenético con las secuencias de SARS-CoV-2 de muestras de la Región Sanitaria VIII, comparado con secuencias de genoma completo de referencia de cada linaje.

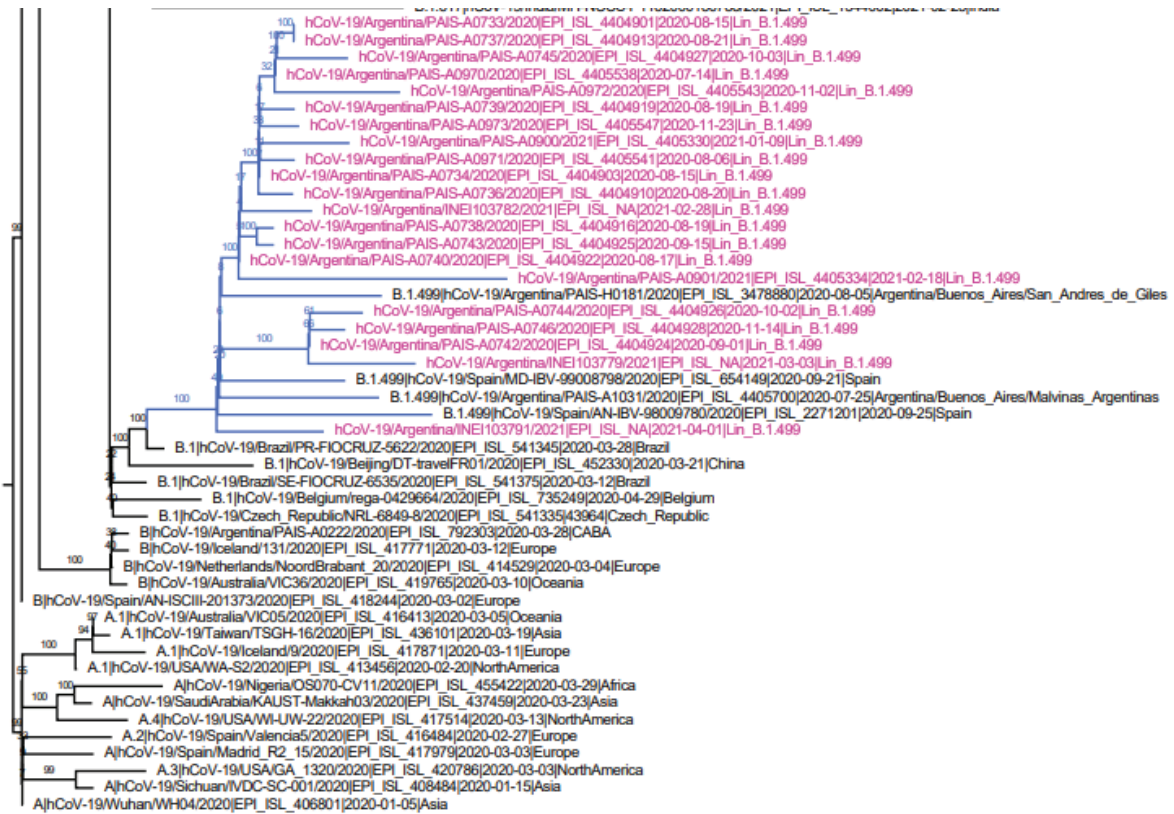
Se indican las secuencias obtenidas en este trabajo en color magenta. Las secuencias de referencia utilizadas se indican en negro. En los nodos se muestran los valores de Bootstrap.











Árbol de máxima verosimilitud de las secuencias de genoma completo de SARS-CoV-2 de la Región Sanitaria VIII, obtenidas durante los años 2020-2021. Las secuencias de estudio y los linajes detectados se indican en colores. Los valores de *bootstrap* se indican en los nodos (1000 pseudorréplicas).