

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



PROYECTO DE TESIS

“EPIDEMIOLOGÍA GENÓMICA DEL SARS-COV-2 EN NUEVO LEÓN”

POR:

L.B.G. MARÍA FERNANDA HERRERA SALDÍVAR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA.**

JUNIO, 2021

Epidemiología genómica del SARS-CoV-2 en Nuevo León.

Aprobación de la tesis:



Dr. C. Carlos Córdoba Fletes
Director de tesis



Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta
Co-Director de tesis



Dra. C. Aurora de Jesús Garza Juárez
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Infectología Molecular y en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica, ambos del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios, por siempre indicarme el camino correcto para mí y por ser el guía de mis decisiones. Gracias por permitir cada experiencia que he vivido, y por tenerme hoy aquí, concluyendo una etapa más en mi vida.

Gracias mamá y papá, por todo su amor, por siempre apoyarme y principalmente, por regalarme la educación que tengo. No tienen idea de cuánto valoro y admiro cada uno de los sacrificios que todos los días hacen por nuestra familia. Todos los logros que se me permitan alcanzar en esta vida serán siempre por y para ustedes.

Gracias Juan Manuel, por el núcleo que hemos construido en este par de años. Por ser mi inspiración, mi confidente y el mejor amigo que he tenido en la vida. Gracias por creer en mí y por siempre hacerme recordar que soy mejor de lo que yo creo.

Gracias Pau y Sofi, por ser mis compañeras y amigas desde siempre, por ser ejemplo para mí en tantas ocasiones, y por enseñarme a ver la vida desde perspectivas tan distintas. Gracias hermanitas porque muchas veces ustedes han sido mi estabilidad, mis risas y mi escape.

Gracias Pili y Conchita por siempre estar conmigo a pesar de la distancia y por siempre tenerme presente en sus oraciones. Las dos son mi principal ejemplo de que siempre se puede salir adelante y ser fuerte a pesar de las circunstancias.

Gracias Dr. Kame, por haber sido mi mentor durante esta etapa. Siempre voy a tener como ejemplo su paciencia, amabilidad y buen carácter. Gracias por todos los aprendizajes y por el buen trato de siempre.

Gracias a la Doctora Ana María Rivas Estilla por integrarme en su equipo y por siempre impulsar mi desarrollo como profesionista.

Gracias Diana, Rocío, Kass, Vale, Toño y Antonio. Son la mejor generación de maestría con la que pude haberme encontrado. A cada uno de ustedes les tengo mucho cariño y les deseo lo mejor en todos los aspectos de sus vidas.

Gracias a los doctores Carlos Córdova Fletes, Aurora Garza Juárez, Sonia Lozano Sepúlveda, Daniel Arellanos Soto y Natalia Martínez Acuña por siempre indicar sus observaciones hacia mi trabajo de forma pertinente y respetuosa, y por siempre buscar mi éxito en esta etapa.

Gracias al resto del personal que conforma el departamento de Bioquímica, por siempre tener la disposición de apoyarme cuando lo necesité, por todas las enseñanzas y por siempre ayudarme a buscar que las cosas salieran de la mejor manera posible.

COLABORACIONES

Dr. Med. Adrián Camacho Ortiz

Dr. Eduardo Pérez Alba

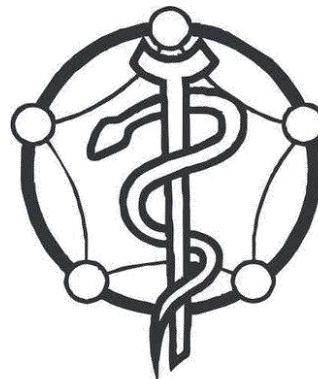
Dra. Laura Nuzzolo Shihadeh

Dra. C. Paola Bocanegra Ibarias

Dra. C. Samantha Mabel Flores

Treviño

Servicio de Infectología del Hospital
Universitario "Dr. José Eleuterio
González".



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas

Estilla

Dra. C. Elvira Garza González

Departamento de Bioquímica y
Medicina Molecular de la Facultad de
Medicina de la Universidad Autónoma
de Nuevo León.

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y MEDICINA MOLECULAR**



Dr. Manuel de la O Cavazos

Dra. Consuelo Treviño Garza

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Q.C.B. Gloria Jasso de la Peña

M.D. Else García García

Laboratorio Estatal de Salud Pública
de Nuevo León.



TABLA DE CONTENIDOS

A) LISTA DE FIGURAS	
B) LISTA DE TABLAS	
C) ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1.INTRODUCCIÓN	2
1.1. Coronavirus.....	2
1.1.1. Generalidades.....	2
1.1.2. Taxonomía.....	3
1.1.3. Características genómicas.....	4
1.1.4. Ciclo de replicación.....	7
1.2. SARS- CoV- 2.....	9
1.2.1. Generalidades y características genómicas.....	12
1.2.2. Origen del virus.....	14
1.2.3. Linajes y distribución de SARS-CoV-2.....	14
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	16
2.1. Linajes circulantes de SARS-CoV-2 en el mundo.....	16
2.2. Linajes circulantes de SARS-CoV-2 en México.....	21
CAPÍTULO 3.JUSTIFICACIÓN	22
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
CAPÍTULO 5.OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24

CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1. Estrategia experimental	25
6.2. Diseño	26
6.2.1. Criterios de inclusión.....	26
6.2.2. Criterios de exclusión.....	26
6.2.3. Criterios de eliminación.....	26
6.2.4. Caracterización epidemiológica de casos positivos.....	26
6.3. Obtención del número de casos de COVID-19 del estado de Nuevo León	27
6.4. Obtención de muestra de hisopado faríngeo.....	27
6.5. Extracción de ARN con columna QIAGEN	27
6.6. Detección de ARN viral por medio de RT-qPCR	28
6.7. Secuenciación del genoma completo.....	30
6.7.1. Síntesis del ADN complementario.....	31
6.7.2. PCR múltiple.....	31
6.7.3. Dilución de los productos de PCR.....	43
6.7.4. Adición de códigos de barras y purificación con perlas magnéticas	43
6.7.5. Cuantificación en el Qubit	45
6.7.6. Adición de adaptadores	45
6.7.7. Secuenciación y ensamblaje.....	46
6.8. Análisis filogenético de máxima verosimilitud.....	48
6.9. Análisis evolutivo bayesiano	48
6.10. Tamaño de la muestra	49
CAPÍTULO 7.RESULTADOS	50
7.1. Datos epidemiológicos del estado de Nuevo León	50
7.2. Secuenciación.....	1
7.3. Asignación de linajes.....	55
7.4. Análisis filogenético de máxima verosimilitud	79
7.5. Análisis evolutivo bayesiano.....	81
7.5.1. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado	81
7.5.2. Eventos de transmisión del virus SARS-CoV-2 en Nuevo León	85
7.6. Linajes de interés y de preocupación circulando en México	86

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN	87
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES	92
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA	93

A) LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Virión típico de coronavirus.	2
2	Taxonomía de los coronavirus.	
3	Organización de los genomas de diferentes coronavirus.	6
4	Ciclo de replicación de los coronavirus.	7
5	Transcripción de subconjunto de ARNm subgenómicos.	9
6	Casos acumulados de COVID-19 en el mundo.	11
7	Casos acumulados de COVID-19 por entidad federativa en México.	11
8	Organización del genoma de SARS-CoV-2.	12
9	Gráfico de similitud basado en la secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2.	13
10	Árbol filogenético de máxima verosimilitud, realizado a partir de secuencias globales de SARS-CoV-2.	15
11	(A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud. (B) Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado.	16
12	Filogenia de los linajes del SARS-CoV-2 en California.	18
13	Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado obtenido a partir de secuencias brasileñas y extranjeras.	20

14	Reconstrucción espacio-temporal de la propagación de los clústeres brasileños de SARS-CoV-2 durante la primera y segunda fase epidémica.	20
15	Posicionamiento filogenómico de las variantes del SARS-CoV-2 en México.	21
16	Estrategia general del proyecto.	25
17	Curva epidemiológica del estado de Nuevo León.	50
18	Linajes del virus SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León, al 29 de enero de 2021.	77
19	Número de secuencias provenientes del estado de Nuevo León, que corresponden a cada linaje del virus SARS-CoV-2.	78
20	Linajes del SARS-CoV-2 que circulan en Nuevo León a lo largo del tiempo.	79
21	Árbol filogenético de máxima verosimilitud con 416 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (UANL: rojo, InDRE: azul). Los clústeres mencionados en el texto se encuentran resaltados en rectángulos negros.	82
22	Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 416 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (UANL: rojo, InDRE: azul). Los clados de Nuevo León más grandes están resaltados por rectángulos negros.	83
23	Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 416 secuencias internacionales. Los	84

linajes a los que corresponden cada una de las secuencias, se destacan con distintos colores.

- | | | |
|-----------|--|----|
| 24 | Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 414 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (Introducciones: anaranjado, transmisión comunitaria: amarillo). | 85 |
| 25 | Linajes de interés y de preocupación que se encontraron circulando en México al 28 de febrero de 2021. | 86 |

B) LISTA DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Datos epidemiológicos de los países con mayor número de casos acumulados hasta el 28 de febrero de 2021 (OMS, 2021).	10
2	Iniciadores y sondas empleadas en la RT-PCR en tiempo real (Corman et al., 2020), para el SARS-CoV-2.	29
3	Condiciones de reacción de RT-qPCR de Berlín (Genes E, RdRp y ensayo discriminatorio, respectivamente), (Corman et al., 2020).	30
4	Programas de temperatura RT-qPCR	30
5	Reacción de retrotranscripción para preparar ADNc.	31
6	Incubación de la reacción de retrotranscripción.	31
7	Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR múltiple.	32
8	Reacciones de PCR múltiple.	42
9	Programa del termociclador para PCR múltiple.	42
10	Diluciones de los productos de PCR.	43
11	Reacción para la reparación de los extremos de ADN.	43
12	Tiempos y temperaturas de incubación para la preparación de los extremos.	43

13	Reacción para la ligación de los códigos de barras.	44
14	Tiempos y temperaturas de incubación para la ligación de los códigos de barras	44
15	Reacción para ligación de adaptadores	45
16	Dilución de la biblioteca para secuenciación	46
17	Parámetros para secuenciar utilizando MinKNOW	47
18	Secuencias obtenidas utilizando el protocolo de ARTIC	52
19	Linajes a los que corresponden cada una de las secuencias obtenidas en la UANL y sustituciones aminoacídicas presentadas en cada caso.	56

C) ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α-CoV	Alfacoronavirus
β-CoV	Betacoronavirus
γ-CoV	Gammacoronavirus
δ-CoV	Deltacoronavirus
2019-nCoV	Nuevo coronavirus 2019
3CL^{pro}	Proteasa similar a 3C, proteasa principal viral
aa	Aminoácidos
ACE-2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AEMA	Alta Especialidad y Medicina Avanzada
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
E	Proteína de envoltura
ERGIC	Compartimento intermedio ER-Golgi
E.U.A.	Estados Unidos de América
FLT	<i>Flush Tether</i>
GISAID	Iniciativa internacional para compartir datos genómicos del virus de la gripe y del SARS-CoV-2
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
Kb	Kilobases
M	Proteína de membrana

MERS	Síndrome respiratorio del Medio Oriente
MERS-CoV	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio del Medio Oriente
min	Minutos
N	Proteína de nucleocápside
NSP	Proteína no estructural
nm	Nanómetros
nsp	Proteínas no estructurales
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PL^{pro}	Proteasa similar a papaína
pp1a	Poliproteína 1a
RBD	Dominio de unión al receptor
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
S	Proteína de espícula
s	Segundos
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo
SARS- CoV- 2	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo 2
SFB	Buffer de fragmentos cortos
TRS	Secuencias reguladoras de la transcripción
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFBoot	<i>Ultrafast bootstrap approximation</i>

RESUMEN

L.B.G. María Fernanda Herrera Saldivar Fecha de graduación: agosto de 2021

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Título del estudio: “**EPIDEMIOLOGÍA GENÓMICA DEL SARS-COV-2 EN NUEVO LEÓN**”.

Número de páginas:

Introducción: El coronavirus 2 asociado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es un coronavirus infectante de humanos. Los linajes A y B del SARS-CoV-2 se encuentran circulando en México. **Objetivo:** Identificar los linajes del SARS-CoV-2 que circulan en el estado de Nuevo León. **Métodos:** Se empleó el protocolo de secuenciación establecido por la red de ARTIC en muestras de ARN de pacientes con diagnóstico confirmado de COVID-19. Las secuencias obtenidas se utilizaron para identificar los diferentes linajes de SARS-CoV-2 que circulan en el estado. La reconstrucción de la filogenia se infirió utilizando los enfoques de máxima verosimilitud y de máxima credibilidad de clado. **Resultados:** Se obtuvieron 116 secuencias del virus de SARS-CoV-2, 92 de las cuales correspondieron a genomas de longitud completa. Al 28 de febrero de 2021, se reportaron en la base de datos *GISAID*, 27 linajes circulando en la región entre el 16 de marzo de 2020 y el 29 de enero de 2021. La mayoría de las muestras correspondieron a los linajes B.1, B.1.243 y B.1.1.344. Solo uno de los genomas era parte del linaje A y se encontró circulando al comienzo de la epidemia. Los linajes B.1, B.1.1, B.1.2, B.1.243, B.1.396, B.1.558, B.1.1.28, B.1.1.222, B.1.1.344, B.1.1.432, B.1.1.519 se encontraron circulando durante meses consecutivos por lo que podrían asociarse con la transmisión comunitaria. Las 92 secuencias de genoma completo se encontraron tanto en los mismos clados como dispersas en los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud y de máxima credibilidad del clado, lo que sugirió que la evolución de los linajes virales en el estado se debió a introducciones de viajes internacionales o interestatales y eventos de transmisión comunitaria. **Conclusión:** Se reporta que existen diferentes linajes de SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Coronavirus

1.1.1. Generalidades

Los coronavirus son virus de ARN cuyas partículas virales constan de una envoltura lipídica que contiene de tres a cuatro glucoproteínas ancladas y un núcleo helicoidal de ribonucleoproteína (Figura 1). Los viriones presentan un diámetro que va de 120 a 160 nm y se distribuyen ampliamente en humanos, otros mamíferos y aves, afectando principalmente los sistemas respiratorio, gastrointestinal, hepático y nervioso central (Wevers, & van der Hoek, 2009), (Yu, et al., 2006), (Zhu et al., 2020), (Chen et al., 2020). El empleo del término "coronavirus" surge a partir de su observación por microscopía electrónica ya que presentan proyecciones de superficie que forman una estructura en forma de corona, responsable del reconocimiento del receptor y de la fusión de la membrana (Su, et al., 2016) (Yu, et al., 2006).

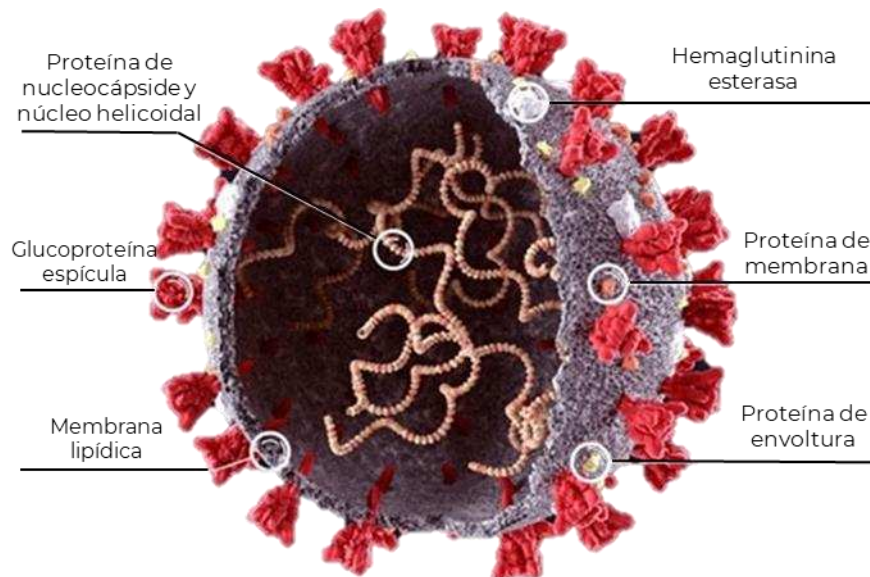


Figura 1. Virión típico de coronavirus (Eckert & Higgins, 2020).

1.1.2. Taxonomía

Estos virus pertenecen al orden *Nidovirales*, a la familia *Coronaviridae* y a la subfamilia *Coronavirinae* que, de acuerdo con relaciones filogenéticas y estructuras genómicas se subdivide en cuatro géneros: α -CoV, β -CoV, γ -CoV y δ -CoV (Figura 2), (Chen et al., 2020), (Cui, et al., 2018). Los α -CoV y los β -CoV, son capaces de infectar solo a los mamíferos (suelen causar enfermedades en vías respiratorias superiores en humanos y gastroenteritis en animales), mientras que los γ -CoV y los δ -CoV afectan principalmente a aves (Cui, et al., 2018). Particularmente los β -CoV, comenzaron a considerarse de interés a partir del año 2002, durante el cual surgió un brote causado por el SARS-CoV (Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo) en la provincia de Guangdong, China. Diez años después, apareció en Arabia Saudita el MERS-CoV (Coronavirus asociado al síndrome respiratorio del Medio Oriente), también perteneciente al género β -CoV (Cui, et al. 2018) (Lu et. al, 2020). Por otro lado, los α -CoV (HCoV-NL63, HCoV-229E) y los β -CoV (HCoV-OC43 y HCoV-HKU1) previamente conocidos producen solo enfermedades de vías respiratorias superiores leves en personas inmunocompetentes. Sin embargo, algunos de ellos pueden causar infecciones graves en bebés, niños pequeños y personas mayores (Cui, et al., 2018) (Chu, et al., 2020).

Se cree que los α -CoV y los β -CoV (incluidos SARS-CoV y MERS-CoV) se originaron en murciélagos, mientras que los γ -CoV y los δ -CoV tienen una procedencia aviar (Jaimes et al., 2020). Las infecciones humanas que se originan en murciélagos generalmente ocurren a través de huéspedes intermedios. Para el SARS-CoV, estos huéspedes son las civetas de palma (*Paguma larvata*) y los perros mapache (*Nyctereutes procyonoides*), mientras que, para el MERS-CoV, el huésped conocido es el dromedario (*Camelus dromedarius*) (Jaimes et al., 2020).

Los β -CoV se dividen en cuatro linajes (A, B, C y D). El linaje B, que incluye al SARS-CoV, tiene aproximadamente 200 secuencias de virus publicadas, mientras que el linaje C, que incluye al coronavirus relacionado con el MERS-CoV, incluye más de 500 secuencias virales (Letko et al., 2020).

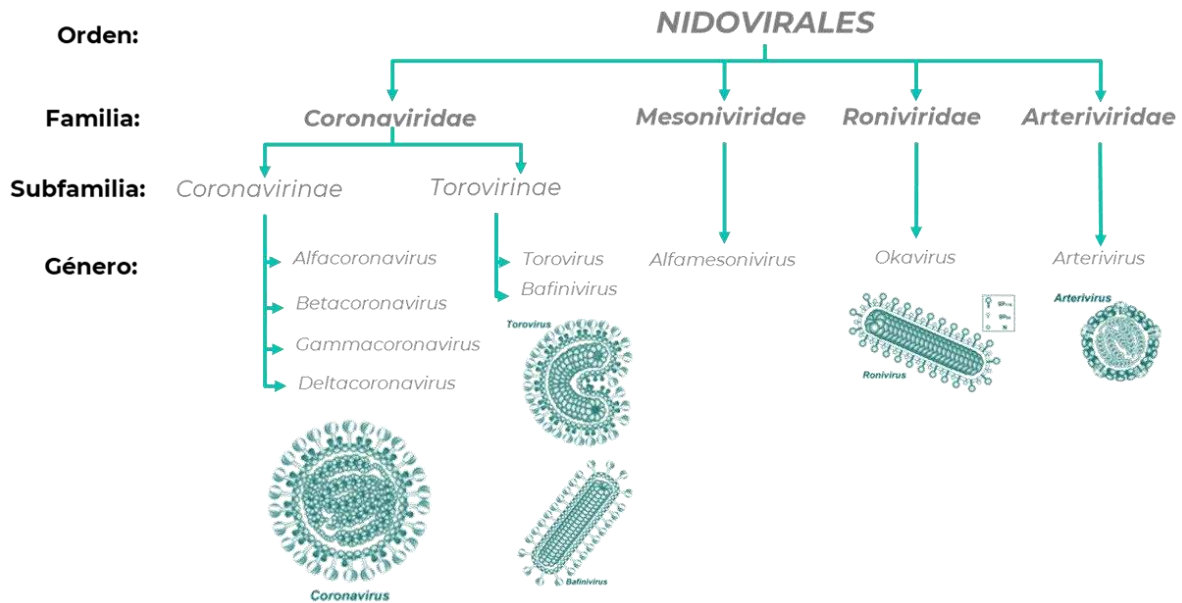


Figura 2. Taxonomía de los coronavirus (Comité internacional de taxonomía de virus, 2019).

1.1.3. Características genómicas

El genoma típico de los miembros de la subfamilia *Coronavirinae*, consta de un ARN de sentido positivo monocatenario cuyo tamaño varía entre 26 y 32 Kb, situación que lo hace el genoma más grande conocido para un virus de ARN (Su, et al., 2016). El ARN monocatenario, se encuentra flanqueado por las estructuras 5'-cap metilguanosa y cola de 3'-poli-A, además de presentar contenidos de G + C de entre 32% y 43% (Chen et al., 2020) (Woo et al., 2010). La gran longitud del genoma se encuentra asociada con una mayor fidelidad de replicación, una vez que se adquieren los genes que codifican enzimas de procesamiento de ARN (Fan et al., 2019). Lo anterior ha permitido el mantenimiento de nuevos genes que codifican diversas proteínas accesorias que, a su vez pueden promover la adaptación de los coronavirus a huéspedes específicos y contribuir tanto a la supresión de las

respuestas inmunitarias del huésped, como a la virulencia de la partícula (Forni et al., 2017).

Los coronavirus poseen un genoma que contiene al menos seis marcos de lectura abierto (ORF). Los primeros (ORF1a y ORF1b), abarcan aproximadamente dos tercios de la longitud total (~20 Kb) del genoma, se localizan en el extremo 5' terminal y codifican al complejo de replicación, que se traduce en dos poliproteínas grandes superpuestas que se procesan para dar lugar a 16 proteínas no estructurales (nsp) (1-16) (Chen et al., 2020). Las proteínas del complejo de replicación tienen una variedad de funciones enzimáticas que se requieren para la síntesis y la protección del ARN viral (Wilde et al., 2017). Entre ellas se incluyen enzimas que participan en la replicación (nsp12-RdRp y nsp13-helicasa), subunidades que contienen funciones accesorias para la síntesis de ARN viral (nsp14-exoribonucleasa, nsp8-primasa y la nsp15-endoribonucleasa) y varias proteínas de membrana que presumiblemente modifican el sistema endomenbranoso celular (nsp3, nsp4 y nsp6) (Van Hemert, et al., 2008). Una característica única de los coronavirus es la función de exoribonucleasa de nsp14, que proporciona la capacidad de corrección requerida para mantener al genoma de ARN sin la acumulación de mutaciones perjudiciales (De Wit et al., 2016).

Otros ORF corresponden a un tercio del genoma, y se encuentran situados cerca del extremo 3'. Éstos codifican al menos cuatro proteínas estructurales principales: las proteínas de espícula (S), de membrana (M), de envoltura (E) y de nucleocápside (N), que se traducen a partir de ARN subgenómicos (Sola et al., 2015), (Chen et al., 2020), (Chan et al., 2020), (Fan et al., 2019), (Tu et al., 2020). El orden de estos genes suele ser altamente conservado (Figura 3), (Cui et al., 2019), (Tu et al., 2020). Cada una de las cuatro proteínas estructurales juega un papel importante en la morfogénesis del virión: N se une al ARN viral para formar la nucleocápside, mientras M y E dan lugar a la formación de partículas similares a virus. Tras la interacción con M, S se incorpora en la envoltura viral y los viriones maduros pasan a través de la membrana celular, situación que sugiere que M juega

un papel crucial en el ensamblaje de las partículas virales de los coronavirus (Hsieh, et al., 2008).

Desde un punto de vista evolutivo, las proteínas no estructurales han atraído menos atención que sus contrapartes estructurales. Esto podría deberse al hecho de que las proteínas presentes en la superficie del virus representan los blancos de la respuesta inmune del huésped, por lo que, analizar y describir su variabilidad tiene relevancia para el desarrollo de opciones de tratamiento (Forni et al., 2017). El alineamiento de diferentes secuencias genómicas pertenecientes a los cuatro géneros de coronavirus muestra un 58% de identidad en la región que codifica proteínas no estructurales y un 43% de identidad en la región que corresponde a los genes que dan lugar a proteínas estructurales, con un 54% de identidad a nivel de genoma completo. Esto sugiere que las regiones que codifican proteínas no estructurales están más conservadas que aquellas que dan lugar a las proteínas estructurales, por lo que estas últimas son más diversas y pueden adaptarse a nuevos huéspedes (Chen et al., 2020).

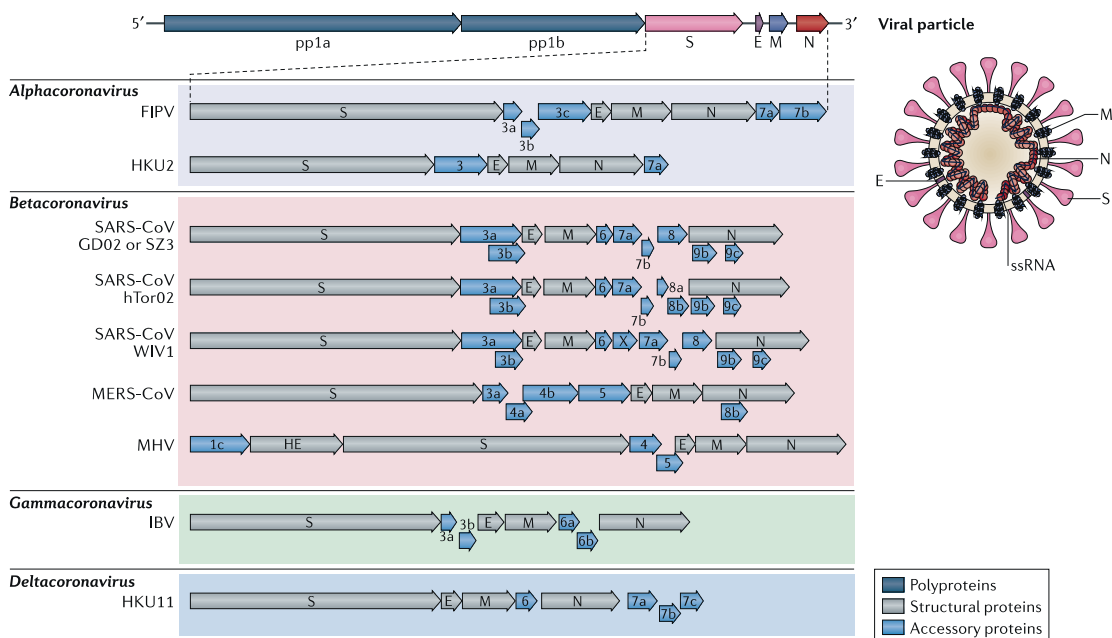


Figura 3. Organización de los genomas de diferentes coronavirus (Cui et al., 2019)

1.1.4. Ciclo de replicación

Después de la entrada del virus en la célula y la posterior eliminación de la cubierta en el citoplasma, el ciclo replicativo comienza con la traducción de los ORF proximales al extremo 5' del genoma viral (ORF1a y ORF1b), lo que resulta en la síntesis de dos grandes poliproteínas del complejo de replicación. La traducción de ORF1a produce pp1a, mientras que el desplazamiento del marco ribosómico -1 dirige un cambio controlado en el marco de lectura, río arriba del codón de paro (-1), lo que permite la traducción de ORF1ab para producir pp1ab (Enjuanes et al., 2008), (Wilde et al., 2017). Estas poliproteínas son procesadas proteolíticamente por acción de dos proteasas codificadas por ORF1a, PL^{pro} (nsp3) y 3CL^{pro} (nsp5). Lo anterior da lugar a 16 proteínas no estructurales cuya función en conjunto, consiste en la reorganización de las membranas derivadas del retículo endoplásmico rugoso en vesículas de doble membrana. Esto permite la formación del complejo replicación en la región perinuclear de la célula (Figura 4), (Wilde et al., 2017), (Sola et al., 2015), (De Wit et al., 2016).

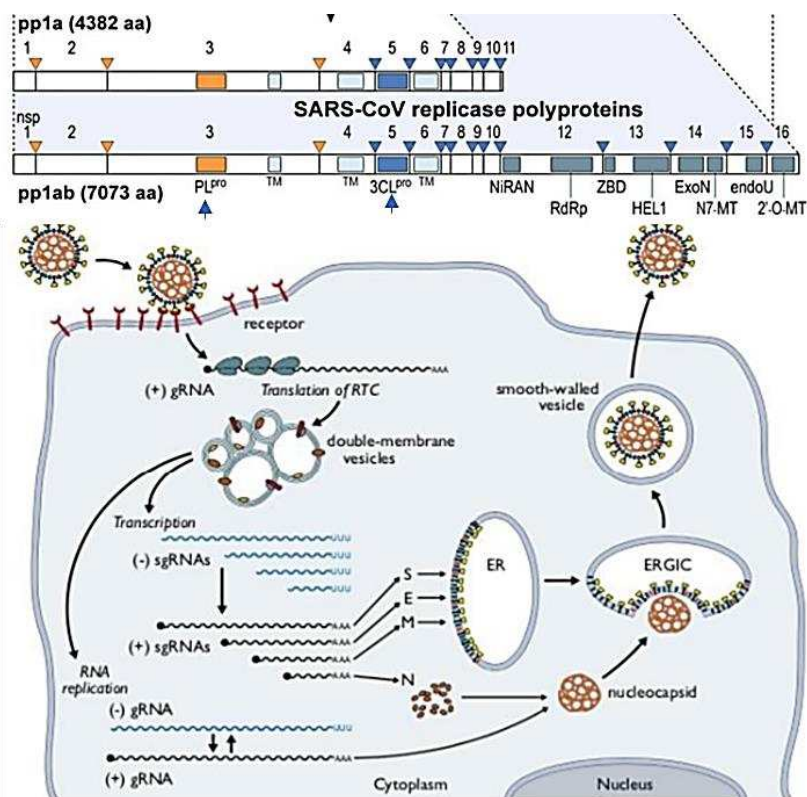


Figura 4. Ciclo de replicación de los coronavirus (Masters & Perlman, 2013).

Durante la replicación, el complejo mencionado se encarga de impulsar la producción de copias de ARN de sentido negativo de longitud completa que se utilizan como plantillas para la síntesis de genomas de ARN monocatenarios de sentido positivo (De Wit et al., 2016). El inicio de la síntesis de cadenas negativas implica el acceso de la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN) al extremo 3' del genoma viral (Sola et al., 2015).

Durante la transcripción se generan las plantillas de cadena negativa que dan lugar a un subconjunto ARNm subgenómicos que codifican a las proteínas estructurales a través de transcripción discontinua (De Wit et al., 2016). Las copias de ARN subgenómicos de los coronavirus contienen una secuencia líder común de 55 a 92 nucleótidos, que se deriva del extremo 5' del ARN genómico. La síntesis de cada ARNm subgenómico implica un paso discontinuo mediante el cual diferentes secuencias (“cuerpo”) derivadas del extremo 3' se fusionan con la secuencia líder genómica 5'. Esta fusión se determina por la acción de elementos en *cis* denominados TRS, que están presentes tanto en el extremo 3' de la secuencia líder como en el extremo 5' de las regiones del cuerpo de ARN subgenómico en el ARN genómico. Los TRS se copian en el ARNm y permiten la conexión de la secuencia líder y las secuencias cuerpo (Hussain et al., 2005), (Pasternak et al., 2001). El mecanismo propuesto indica que la síntesis de la cadena negativa de ARN se aminora después de copiar un TRS de una secuencia cuerpo presente en la plantilla de cadena positiva. La cadena negativa naciente, con el complemento de TRS en su extremo 3', se transfiere al TRS líder y se une mediante un emparejamiento de bases TRS–TRS. La síntesis de ARN se reinicia para completar la transcripción de la cadena negativa de ARN subgenómico agregando el complemento de la secuencia líder genómica. Posteriormente, las copias de ARN subgenómicos se emplean como plantillas para la síntesis de copias de ARNm subgenómicos (Figura 5), (Pasternak et al., 2001).

Aunque los diferentes ARNm subgenómicos pueden contener varios ORF, solo el más cercano al extremo 5' es traducido. Las proteínas estructurales resultantes se ensamblan en la nucleocápside y la envoltura viral en ERGIC (Compartimento

intermedio ER-Golgi). El proceso termina con la liberación del virión naciente de la célula infectada (Figura 4) (De Wit et al., 2016).

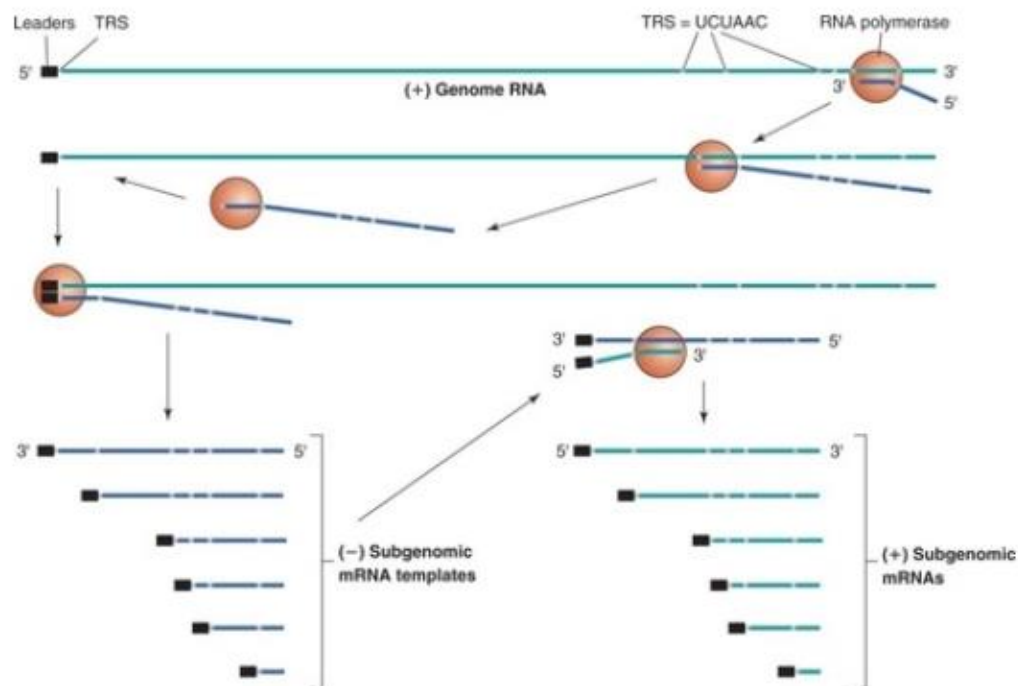


Figura 5. Transcripción de subconjunto de ARNm subgenómicos (Pasternak et al., 2001).

1.2. SARS- CoV- 2

A finales de diciembre de 2019, varios centros de salud reportaron grupos de pacientes con neumonía de causa desconocida, que estaban asociados epidemiológicamente con un mercado mayorista de mariscos en la ciudad de Wuhan, localizada en la provincia china de Hubei. De acuerdo con los síntomas clínicos y la secuenciación de ARN extraído de lavados broncoalveolares de pacientes, se determinó que la etiología de la enfermedad era un virus que se identificó como un coronavirus infectante de humanos al que provisionalmente se le llamó 2019-nCoV (Zhu et al., 2020), (Zhou et al., 2020), (Lu, et al., 2020).

El 11 de febrero de 2020, esta nueva neumonía causada por coronavirus fue nombrada por la OMS como COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), mismo día en

que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus anunció que el nuevo coronavirus se llamaría SARS-CoV-2 (Li et al., 2020).

De acuerdo con los datos epidemiológicos reportados por la OMS, hasta el día 28 de febrero de 2021, se habían identificado un total de 113,472,187 casos confirmados de COVID-19 a nivel mundial, con 2,520,653 muertes (Tabla 1), (Figura 6), (OMS, 2021). Por otro lado, la Dirección General de Epidemiología del gobierno mexicano, indica que, al 28 de febrero de 2021, en el país existían un total de 2,086,938 casos confirmados, incluyendo 185,715 defunciones (Figura 7), (Dirección General de Epidemiología, 2021). En el estado de Nuevo León, al 28 de febrero de 2021, se reportaban un total de 166,260 casos acumulados, dentro de los que se incluían 9,616 defunciones (Gobierno del estado de Nuevo León, 2020).

Tabla 1. Datos epidemiológicos de los países con mayor número de casos de COVID-19, acumulados hasta el 28 de febrero de 2021 (OMS, 2020).

Región	Casos acumulados	Muertes acumuladas
América	50,426,060	1,205,254
Europa	38,679,334	861,906
Sureste de Asia	13,517,009	208,013
Mediterráneo oriental	6,388,249	144,479
África	2,840,208	71,991
Pacífico oeste	1,620,582	29,006
<u>Global</u>	<u>113,472,187</u>	<u>2,520,653</u>

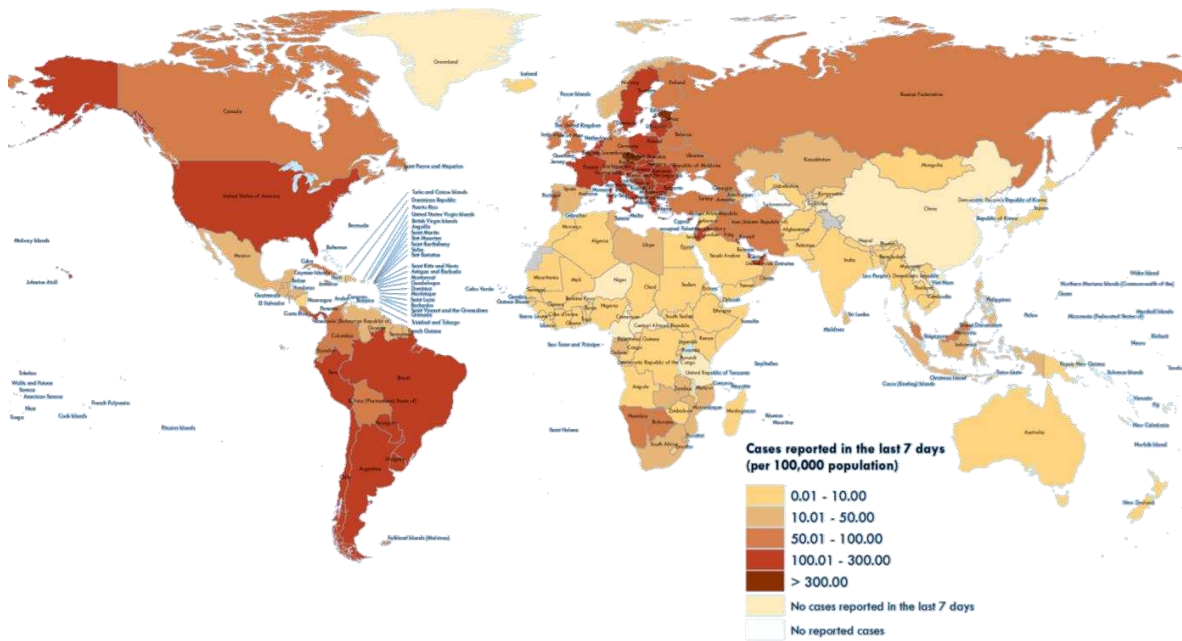


Figura 6. Casos acumulados de COVID-19 en el mundo (OMS, 2021).

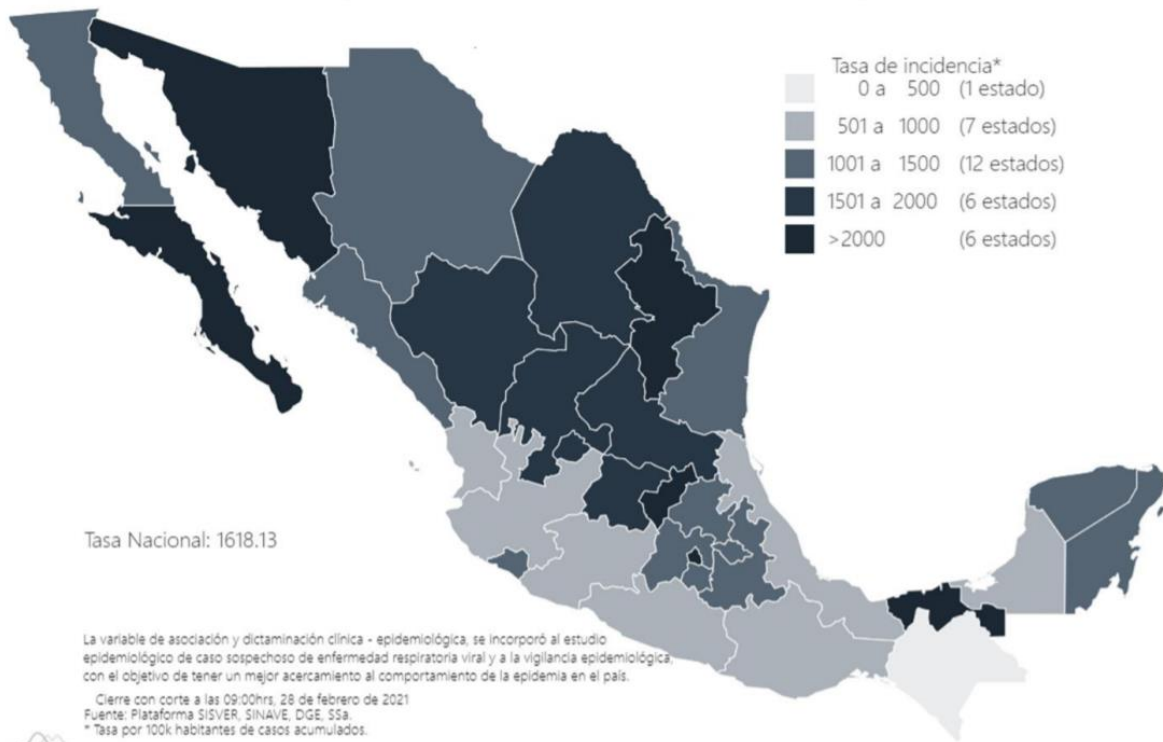


Figura 7. Tasa de incidencia de casos acumulados de COVID-19 por entidad de residencia en México (Dirección General de Epidemiología, 2021).

1.2.1. Generalidades y características genómicas

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, no segmentado y envuelto, perteneciente al género β -CoV. Las secuencias de genoma completo obtenidas a partir de muestras de los primeros pacientes infectados presentan longitudes que van desde 29,844 hasta 29,891 nucleótidos que codifican aproximadamente 9860 aa. El genoma del SARS-CoV-2 cuenta con un contenido de G + C de 38% e incluye 14 ORF que dan lugar a 27 proteínas. Al igual que otros β -CoV, el genoma se organiza en el orden de: 5' - replicasa (ORF1a y ORF1ab) - proteínas estructurales - 3'. El gen replicasa da lugar a 15 nsps (nsp1-nsp10 y nsp12-nsp16) mientras que el extremo 3' contiene cuatro proteínas estructurales (S, E, M y N) y ocho proteínas accesorias (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b y orf14) (Figura 8), (Abduljali & Abduljali, 2020), (Chan et al., 2020).

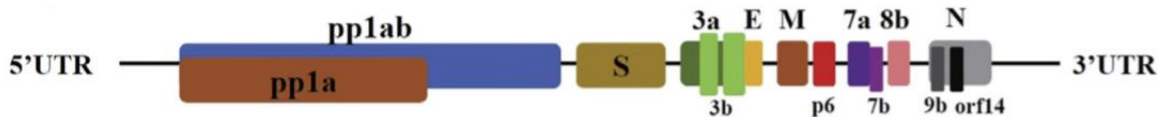


Figura 8. Organización del genoma de SARS-CoV-2 (Abduljali & Abduljali, 2020).

Informes iniciales han identificado que el SARS-CoV-2 es similar al Bat-CoV-RaTG13 (también llamado Bat-SL-RaTG13) con más del 96% de identidad de secuencia genómica completa, y a otros dos virus Bat-SL-CoV-ZC45 y Bat-SL-CoV-ZXC21, ambos con una identidad de secuencia de alrededor del 88% (Figura 9), (Zhou et al., 2020), (Jaimes et al., 2020). Cuando se compara el SARS-CoV-2 con los coronavirus humanos clínicamente relevantes SARS-CoV y MERS-CoV, los porcentajes de identidad caen a alrededor del 79,6% y 50% a nivel genómico, respectivamente (Jaimes et al., 2020).

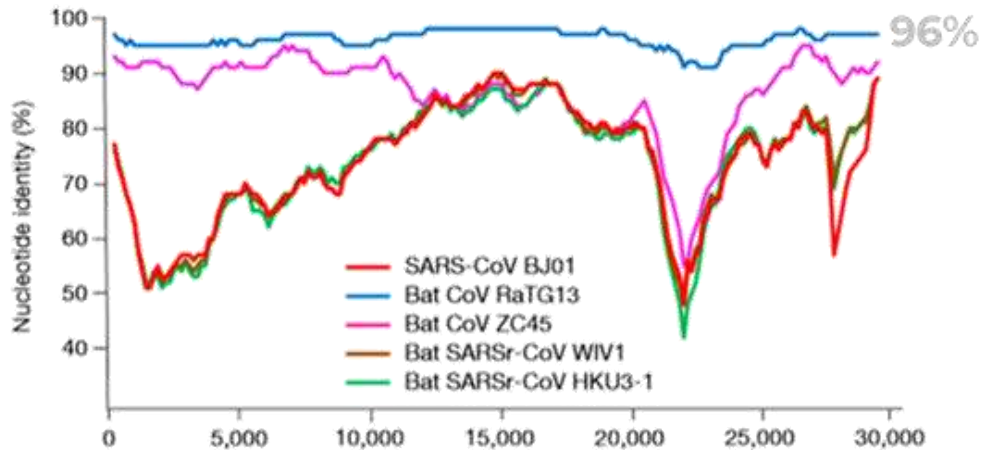


Figura 9. Gráfico de similitud basado en la secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2 (Zhou et al., 2020).

A nivel aminoacídico, las diferencias entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 se encuentran en orf3b, el gen que codifica la proteína estructural S y Orf8, pero las secuencias del dominio S1 de la proteína S y de orf8, son especialmente variables (Chan et al., 2020).

La proteína S, está compuesta por dos subunidades, el dominio S1 que contiene el dominio de unión al receptor (RBD) y el dominio S2, compuesto por polipéptidos altamente conservados asociados con la envoltura. El subdominio externo de la cabeza globular de la proteína S, S1 de SARS-CoV-2 tiene solo un 40% de similitud con sus contrapartes en el virión de SARS-CoV de murciélago y humano. La porción externa del subdominio externo responsable del contacto directo con el receptor humano ACE-2, tiene la mayor diversidad en aminoácidos (Abduljali & Abduljali, 2020). Orf3b es una proteína nueva que parece jugar un papel fundamental en la patogénesis del SARS-CoV-2, mientras que Orf8 es una proteína accesoria con función desconocida más corta que sus contrapartes encontradas en otros β -CoV (Chan et al., 2020).

1.2.2. Origen del virus

A pesar de que el origen del SARS-CoV-2 a partir de murciélagos ha sido fuertemente apoyado, un supuesto huésped intermedio aún no ha sido identificado. Informes recientes han sugerido al pangolín malayo (*Manis javanica*), ya que se han encontrado señales de recombinación putativas entre las secuencias de los coronavirus infectantes de pangolín, de murciélago y de humano. Sin embargo, también parece probable que los sitios funcionales idénticos en el SARS-CoV-2 y en los coronavirus infectantes de pangolín puedan ser el resultado de una evolución convergente coincidente (Jaimes et al., 2020), (Tang et al., 2020).

1.2.3. Linajes y distribución de SARS-CoV-2

A partir de la raíz de la filogenia del SARS-CoV-2 surgen dos linajes que han sido identificados como A y B. Los primeros virus de linaje A comparten dos nucleótidos (posiciones 8782 en ORF1ab y 28144 en ORF8) con Bat-CoV-RaTG13, mientras que los virus asignados al linaje B, muestran diferentes nucleótidos en esos sitios. Por lo anterior, se cree que, aunque los virus del linaje B fueron secuenciados y publicados primero, es probable que los virus del linaje A formen la raíz filogenética de la pandemia provocada por el SARS-CoV-2 (Figura 10), (Rambaut et al., 2020).

Hasta junio de 2021 se reportan 29 derivaciones del linaje A (A.1 - A.29) y múltiples sublinajes descendientes de cada derivación. Además, se han descrito 52 linajes derivados directamente del linaje B. Hasta finales de junio de 2021, la derivación B.1 es la predominante en el mundo y ha sido subdividida en más de 1,500 sublinajes (Rambaut et al., 2020), (O'Toole et al., 2021).

Los virus de ambos linajes circulan a través del mundo, lo que refleja la exportación del virus de Hubei a otras regiones de China y otros lugares antes de que se impusieran restricciones de viaje y medidas de cuarentena (Rambaut et al., 2020).

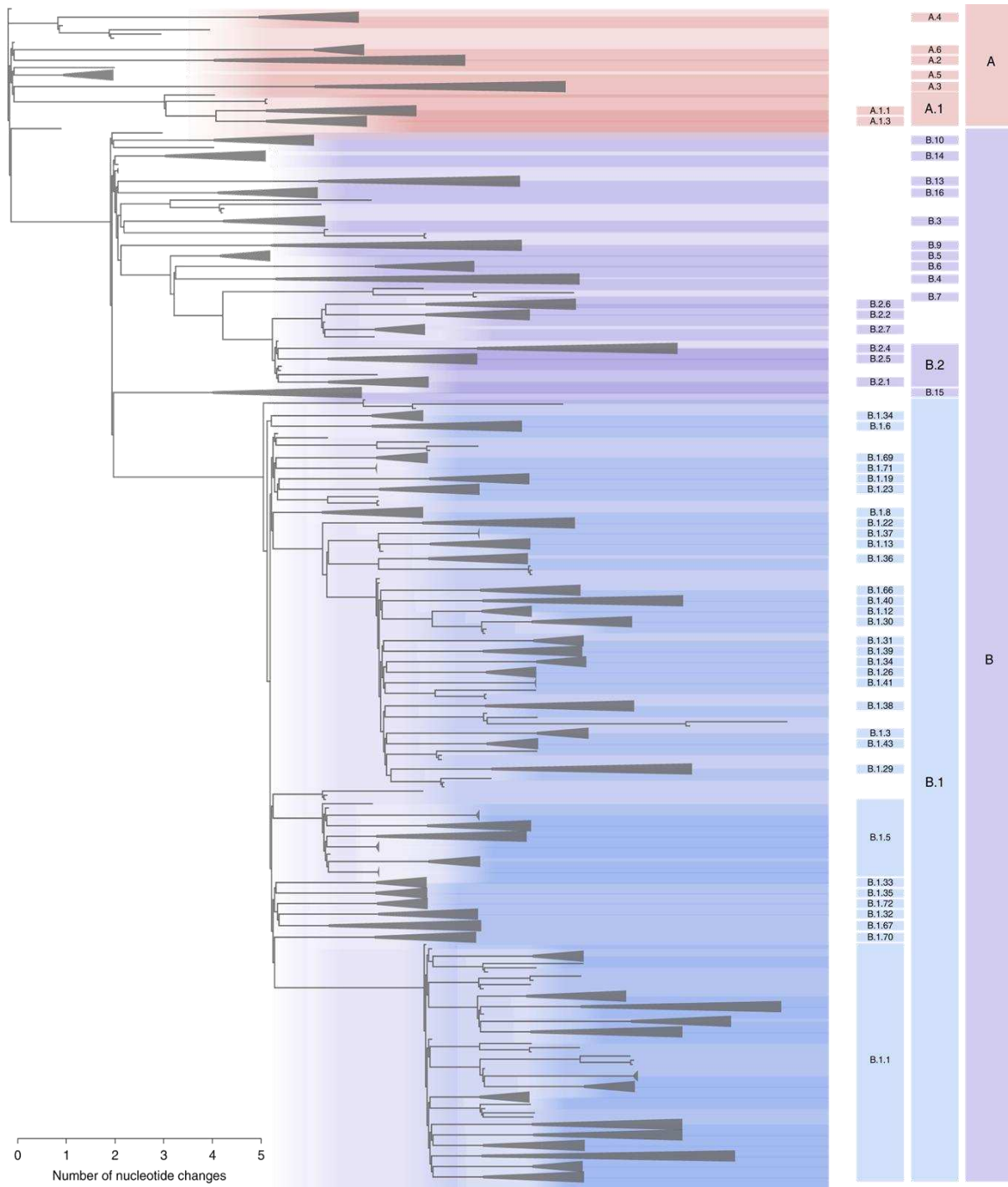


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud, realizado a partir de secuencias globales de SARS-CoV-2 (Rambaut et al., 2020).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Linajes circulantes de SARS-CoV-2 en el mundo

En mayo de 2020, Lu y colaboradores publicaron el artículo *Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China*. El estudio, tuvo como objetivo comprender la diversidad genética de la epidemia del SARS-CoV-2 en la región geográfica señalada, para lo cual se realizaron análisis filogenéticos utilizando los enfoques de máxima verosimilitud y reloj molecular bayesiano. Se utilizaron genomas obtenidos a partir de 53 pacientes con COVID-19 en la provincia de Guangdong para llevar a cabo un alineamiento múltiple en el que además se incluyeron 250 secuencias provenientes de otras provincias chinas y del resto del mundo. A partir de los datos obtenidos se generaron los árboles filogenéticos indicados en las figuras 11A (árbol filogenético de máxima verosimilitud) y 11B (árbol filogenético de máxima credibilidad de clado).

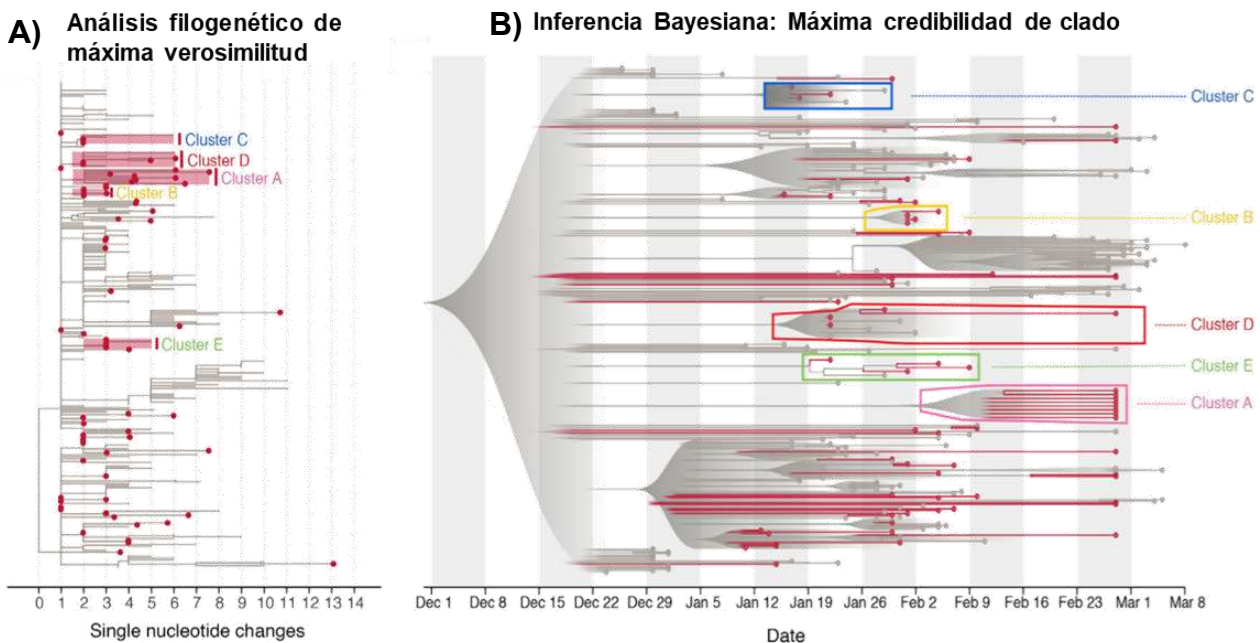


Figura 11. (A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud. (B) Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado (Lu et al., 2020).

En los dos árboles obtenidos, las secuencias del SARS-CoV-2 de Guangdong (señalados con rojo), se encontraron tanto intercaladas con genomas virales muestreados en otras provincias chinas y en otros países (señalados con gris). En ambos árboles se pueden observar cinco grupos (denominados A – E) que contienen secuencias provenientes de Guangdong con un soporte de probabilidad posterior de >80% (es decir, sus secuencias se agruparon monofiléticamente en >80% de los árboles en la muestra posterior). En los clústeres A y B, se agruparon solo secuencias muestreadas en Guangdong, mientras que, en los C, D y E, se agruparon también secuencias muestreadas en otros países y provincias. Por lo anterior, se habla de que los árboles filogenéticos obtenidos a partir de distintos análisis fueron congruentes entre sí (Figuras 11A y 11B). Los autores mencionan que el bajo muestreo de casos de COVID-19 entre diferentes regiones, dificulta la evaluación de clústeres filogenéticos que comprenden casos de una sola región; aunque dichos grupos podrían representar una transmisión local, los resultados del estudio muestran que también pueden incluir múltiples introducciones desde una ubicación genómicamente submuestreada. De acuerdo con lo anterior, los resultados deben interpretarse en el contexto de toda la información epidemiológica disponible (Lu et al., 2020).

Por otro lado, el análisis filogenético realizado a partir del estudio *Genomic surveillance reveals multiple introductions of SARS-CoV-2 into Northern California*, reveló que 36 genomas del SARS-CoV-2 secuenciados en California se encontraron dispersos en el árbol filogenético del SARS-CoV-2 que se construyó a partir de 789 genomas mundiales depositados en *GISAID* hasta el 20 de marzo de 2020. De los 36 genomas, 14 correspondían con el linaje circulando en el estado de Washington (WA1), 10 con un linaje asociado con el grupo de brotes del condado de Santa Clara, tres de un grupo de tres individuos del condado de Solano, cinco relacionados con linajes que circulaban en Europa y Nueva York, y cuatro relacionados con linajes tempranos de Wuhan u otras regiones de China (incluidos dos pacientes del condado de San Benito con genoma idéntico) (Figura 12). La agrupación

filogenética de virus originalmente provenientes de diferentes lugares, como el estado de Washington y California en el mismo linaje WA1, no prueba la direccionalidad de la propagación. Sin embargo, el estudio muestra que se pueden obtener conocimientos sólidos sobre la transmisión de COVID-19 si la diversidad genómica del virus se interpreta con datos epidemiológicos detallados, por lo que los hallazgos del estudio estarían respaldando las restricciones de viaje para contener la propagación del SARS-CoV-2 en California y otros estados (Deng, et al.,2020).

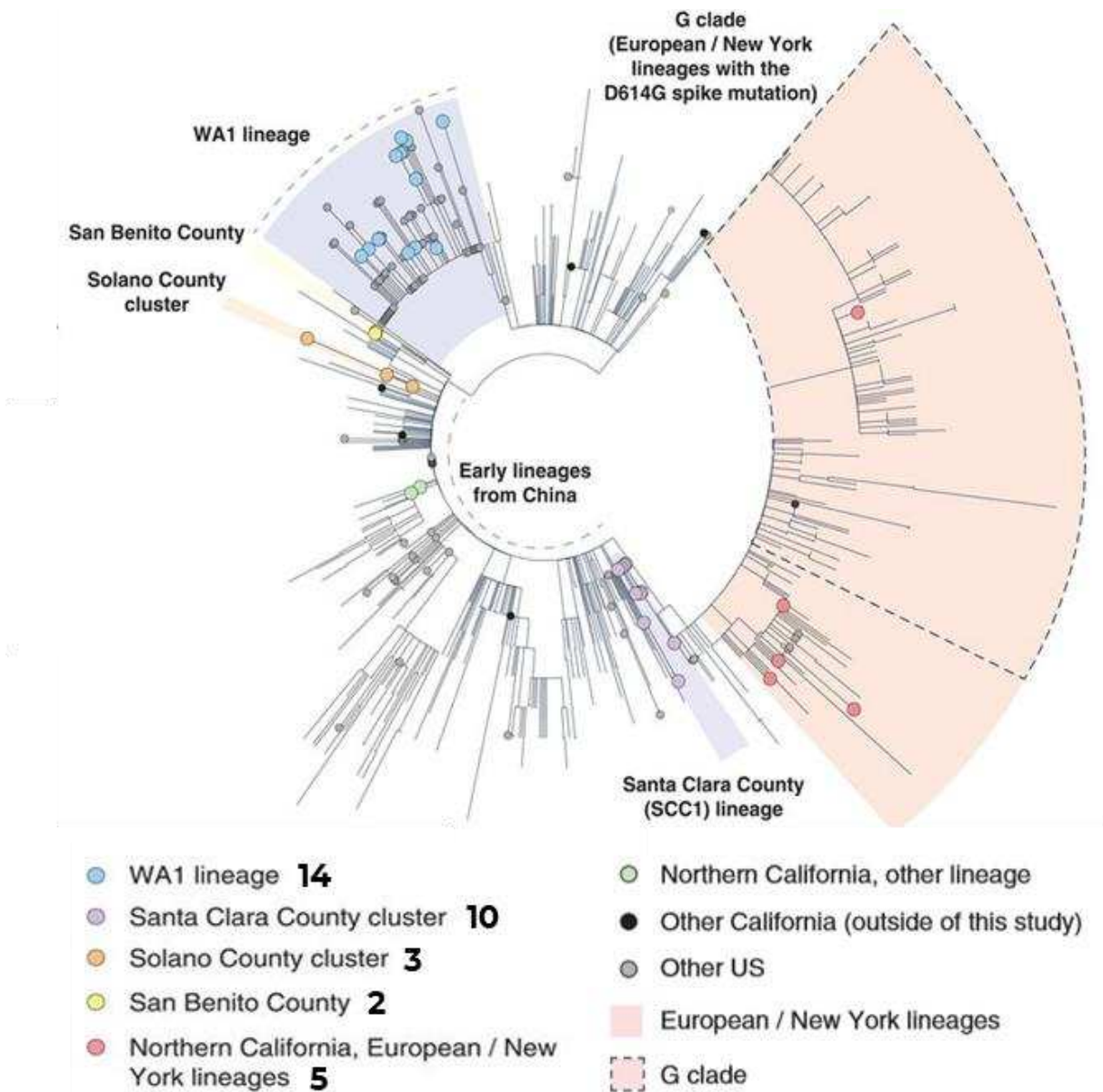


Figura 12. Filogenia de los linajes del SARS-CoV-2 en California (Deng, et al., 2020).

A partir del estudio *Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil*, se obtuvo un árbol filogenético de máxima credibilidad de clado dentro del cual se incluyen un total de 1182 secuencias de SARS-CoV-2 (490 correspondientes a secuencias brasileñas y 692 del resto del mundo). Se reveló que la mayoría de los genomas brasileños se agruparon en tres clados: clado 1 (n = 186/490, 38% de las secuencias brasileñas), clado 2 (n = 166, 34%) y clado 3 (n = 18/490, 4%). Los ancestros comunes más recientes de los tres clados fueron fechados al 28 de febrero (clado 1), 22 de febrero (clado 2), y 11 de marzo (clado 3) (Figura 13). Esto indica que la transmisión comunitaria ya estaba establecida en Brasil a principios de marzo, lo que sugiere que las restricciones de viaje internacionales iniciadas después de este período habrían tenido un impacto limitado (Candido et al., 2020).

En el mismo estudio, se empleó un modelo filogeográfico continuo para trazar los nodos filogenéticos a sus ubicaciones de origen, con el fin de comprender mejor la propagación del virus a través de escalas espacio - temporales dentro de Brasil. A partir de este análisis, se estimó que, durante una primera fase epidémica, el SARS-CoV-2 se propagó principalmente a nivel local y dentro de las fronteras estatales. Por el contrario, una segunda fase se caracterizó por el inicio de la epidemia fuera de la región sureste de Brasil (Figura 14) (Candido et al., 2020).

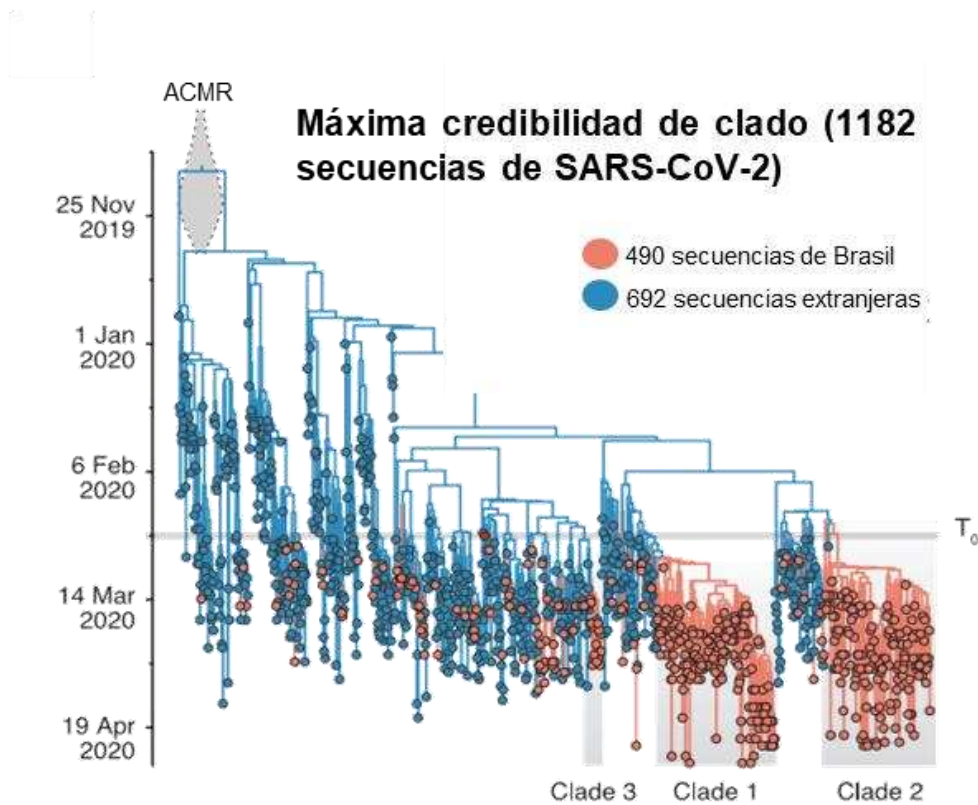


Figura 13. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado obtenido a partir de secuencias brasileñas y extranjeras (Candido et al., 2020).

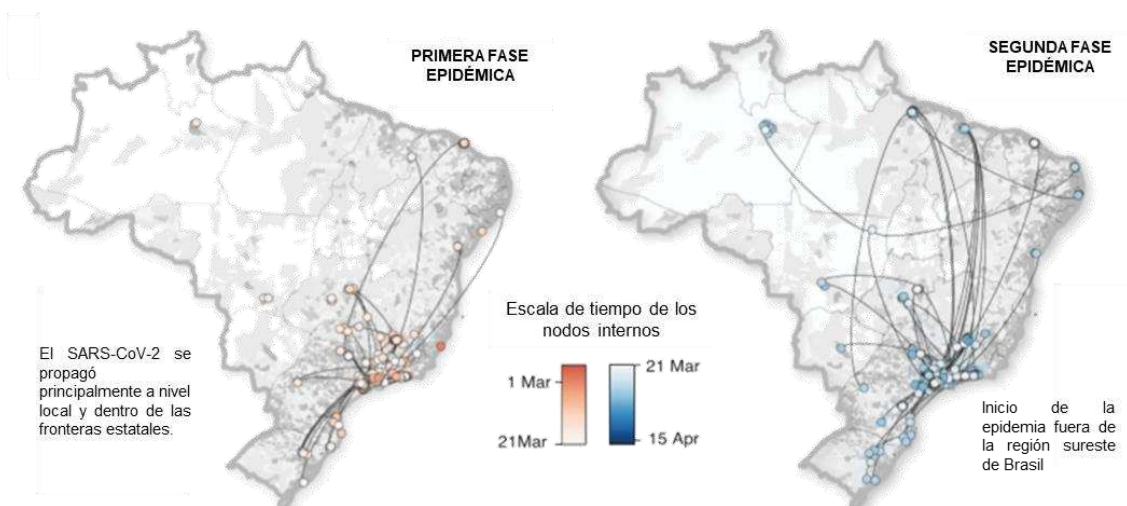


Figura 14. Reconstrucción espacio-temporal de la propagación de los clústeres brasileños de SARS-CoV-2 durante la primera y segunda fase epidémica (Candido et al., 2020).

2.2. Linajes circulantes de SARS-CoV-2 en México

Taboada y colaboradores, reportan en su trabajo *Genomic Analysis of Early SARS-CoV-2 Variants Introduced in Mexico*, que las cepas iniciales del virus introducidas en México provenían de Europa y Estados Unidos. El análisis filogenético global confirmó que ocho variantes mexicanas se agruparon dentro del linaje B del SARS-CoV-2, mientras que las nueve variantes mexicanas restantes se agruparon dentro del linaje A (Taboada et al., 2020).

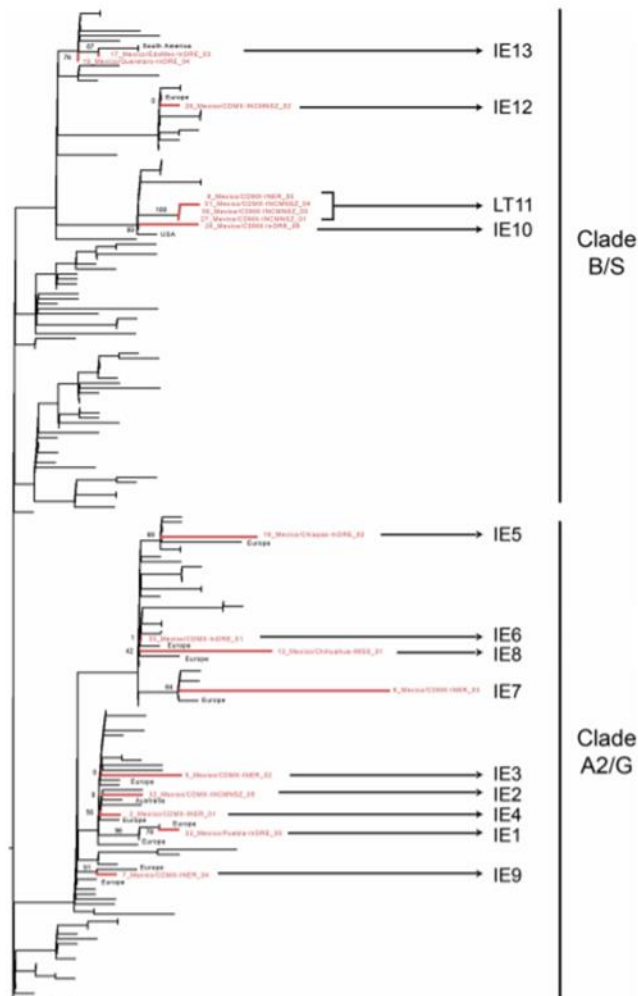


Figura 15. Posicionamiento filogenómico de las variantes del SARS-CoV-2 en México (Taboada et al., 2020).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Hasta mediados de noviembre de 2020, estaban reportadas más de 149,000 secuencias completas de SARS-CoV-2 en bases de datos públicas, sin embargo, solo existían 174 de México. Se desconoce el linaje al cual pertenecen los virus que circulan en el estado de Nuevo León. La publicación de las diferentes secuencias genómicas del SARS-CoV-2 permitirá comprender la evolución y los patrones de transmisión del virus después de que éste ingresó a la población, lo que dará lugar al diseño de estrategias efectivas de control y prevención.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existen distintos linajes de SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León, diferentes a los importados de otros países y surgidos a partir de transmisión comunitaria a través del tiempo.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar la variabilidad genética y reconstruir la dispersión viral del SARS-CoV-2 en Nuevo León.

5.2. Objetivos específicos

1. Identificar los diferentes linajes de SARS-CoV-2 que circulan en el Estado.
2. Determinar la evolución de los linajes virales en el estado de Nuevo León.
3. Reconstruir los eventos de transmisión de SARS-CoV-2 y determinar el número de introducciones al estado.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Estrategia experimental

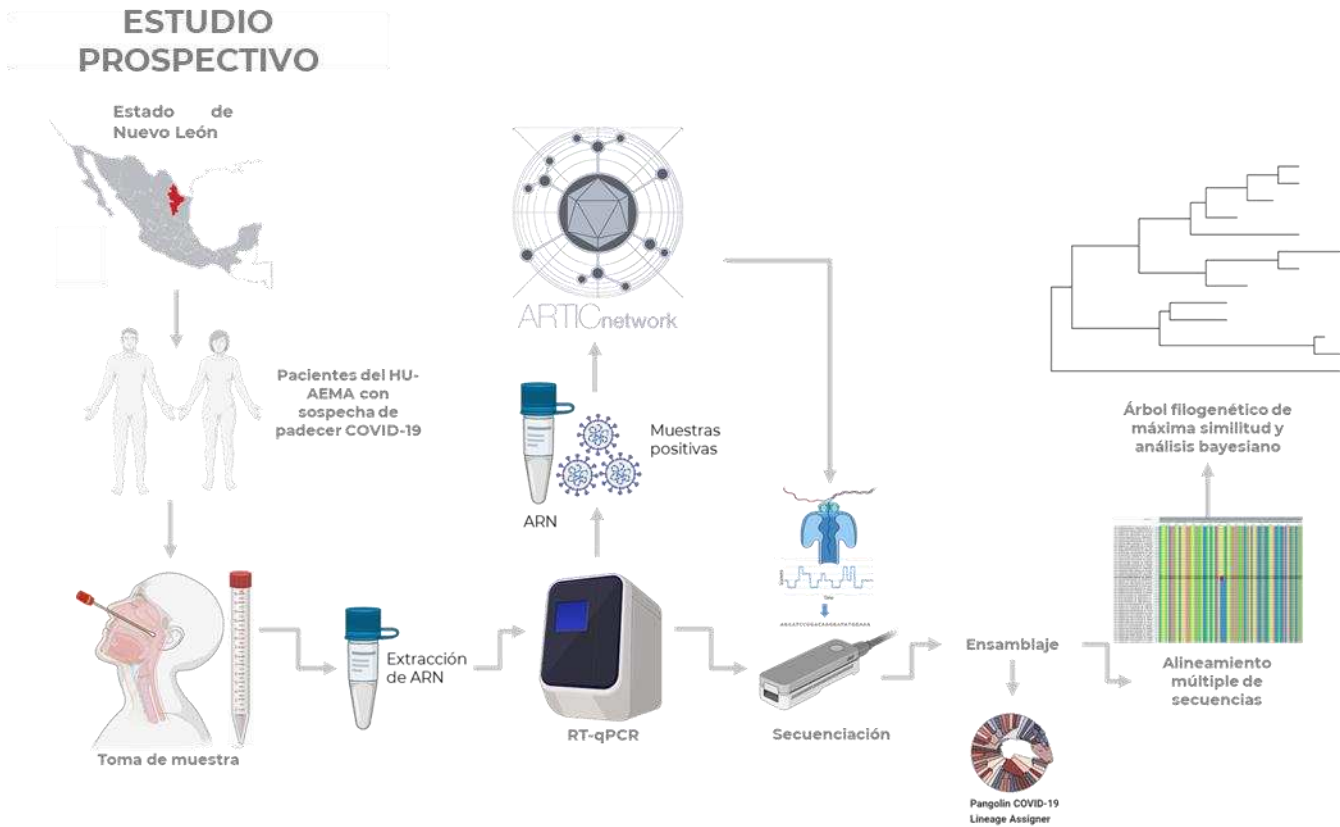


Figura 16. Estrategia general del proyecto.

6.2. Diseño

6.2.1. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 18 años que en los siete días previos al diagnóstico presentaron al menos dos de los siguientes signos y síntomas: temperatura corporal $>37.5^{\circ}\text{C}$, tos o cefalea. Además, acompañado de al menos uno de los siguientes: disnea, artralgias, mialgias, odinofagia, rinorrea, conjuntivitis y dolor torácico.

6.2.2. Criterios de exclusión

Pacientes que tuvieron más de siete días de evolución de síntomas, que presentaron cuadros clínicos recurrentes o que tuvieron otra causa de infección aparente. Personas menores de 18 años y mujeres embarazadas. Pacientes que decidieron no participar en el estudio y/o no hayan querido firmar el consentimiento informado.

6.2.3. Criterios de eliminación

Pacientes a los cuales no se les detectó ARN de SARS-CoV-2 por medio de RT-qPCR. Casos en los cuales la muestra fue insuficiente o presentó contaminación.

6.2.4. Caracterización epidemiológica de casos positivos

Se evaluó a los pacientes que solicitaron atención médica en la Unidad de Alta Especialidad y Medicina Avanzada del Hospital Universitario y en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León a partir del 15 de abril de 2020 hasta febrero de 2021 y que cumplieron con la definición de caso sospechoso. Además, se registraron la fecha de inicio de síntomas y la fecha de toma de muestra.

6.3. Obtención del número de casos de COVID-19 del estado de Nuevo León

Se llevó a cabo el registro del número de casos diarios de pacientes que tuvieron un resultado positivo en la prueba del virus de SARS-CoV-2 en el estado desde el inicio de la contingencia en marzo de 2020 hasta el 28 de febrero de 2021. La información mencionada se obtuvo a partir de los reportes de situación diarios emitidos por la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León.

6.4. Obtención de muestra de hisopado faríngeo

Se realizó una toma de muestra nasofaríngea con hisopo flexible de dacrón o nylon. Los hisopos se colocaron en un tubo cónico de 15 mL que a su vez contenía 3 mL de medio de transporte viral.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Infectología localizado en la Torre de AEMA del Hospital Universitario “José Eleuterio González” y en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León.

6.5. Extracción de ARN con columna QIAGEN

El ARN viral se extrajo utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN). La extracción se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se partió de un tubo de 1.5 mL con 560 µL de amortiguador AVL con acarreador de ARN. Se añadieron 140 µL de muestra. Lo anterior se mezcló durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente (15°C - 25°C) durante 10 minutos. Se añadieron 560 µL de etanol absoluto (96-100%) a cada tubo y éstos se mezclaron durante 15 segundos. Cada muestra se transfirió a una columna de centrifugación QIAamp previamente colocada en un tubo de recolección de 2 mL (incluido en el kit). Se llevó a cabo una centrifugación de 1 minuto a 6000 x g y se desechó el tubo con el filtrado. Para continuar, se utilizaron tubos de recolección limpios de 2 mL para cada muestra, a los que se agregaron 500 µL de Buffer AW1. Una vez más se llevó a cabo una centrifugación (1 minuto a 6000 x g) y posteriormente cada columna de centrifugado QIAamp se colocó en un tercer tubo de recolección limpio de 2 mL al que se le y añadieron 500 µL de Buffer AW2. Se llevó a cabo una centrifugación a 14.000 x g durante 3 minutos y el tubo con el filtrado anterior se desechó. Para

eliminar cualquier residuo de Buffer AW2, se colocó la columna de centrifugado QIAamp en un tubo de recolección nuevo, y se realizó una centrifugación a 14.000 x g durante 1 minuto. Se desechó el tubo de recolección con el filtrado y se colocó la columna QIAamp Mini en un tubo de microcentrífuga sin ARNasa de 1.5 mL, limpio y etiquetado. Se añadieron 60 µL de Buffer AVE y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente, se llevó a cabo una centrifugación a 6.000 x g durante 1 minuto.

Las muestras se almacenaron a 2°C - 8°C y se analizaron mediante PCR dentro de las 6 horas posteriores a la finalización del proceso de extracción. El almacenamiento a largo plazo de las muestras extraídas (> 6 horas) se realizó a -80°C.

6.6. Detección de ARN viral por medio de RT-qPCR

Para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 se utilizó el protocolo de RT-qPCR de Berlín (Corman et al., 2020) donde los iniciadores amplifican un fragmento del gen E y otro del gen RdRp (Tabla 2). Para llevar a cabo las reacciones, se utilizó el kit de *Super Script III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen). Se prepararon reacciones de 25 µL por cada muestra, donde se utilizaron 5 µL del ARN extraído. Las condiciones de las reacciones correspondientes al gen E, al gen RdRp viral y al ensayo confirmatorio, se encuentran enlistadas en la tabla 3. El ciclo de la RT-qPCR se realizó de acuerdo con las temperaturas y tiempos descritos en la tabla 4. Una muestra se consideró positiva si presentó un valor de CT menor a 37.

Tabla 2. Iniciadores y sondas empleadas en la RT-PCR en tiempo real (Corman et al., 2020), para el SARS-CoV-2.

Genes amplificados	Nombre	Secuencia*
	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Gen RdRP	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
	RdRp_SARSr-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA
	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
Gen E	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA

* W es A/T; R es G/A; M es A/C; S es G/C. FAM: 6-carboxifluoresceína; BBQ: blackberry quencher.

Tabla 3. Condiciones de reacción de RT-qPCR de Berlín (Genes E y RdRp, respectivamente), (Corman et al., 2020).

Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O (libre de ARNasa)	2.6	H ₂ O (libre de ARNasa)	1.1
2x mezcla de reacción*	12.5	2x mezcla de reacción*	12.5
MgSO ₄ (50mM)	0.4	MgSO ₄ (50mM)	0.4
BSA (1 mg/ml)**	1	BSA (1 mg/ml)**	1
Primer E_Sarbeco_F (10 µM)	1	Primer RdRP_SARSr-F (10 µM)	1.5
Primer E_Sarbeco_R (10 µM)	1	Primer RdRP_SARSr-R (10 µM)	2
Probe E_Sarbeco_P1 (10 µM)	0.5	Probe RdRP_SARSr-P2 (10 µM)	0.5
SSIII/Taq*	1	SSIII/Taq*	1
Templado de ARN	5	Templado de ARN	5
Volumen total	25	Volumen total	25

* Super Script III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System

** MgSO₄ (50 mM) [Sigma]

*** no acetilado [Roche].

Tabla 4. Programas de temperatura RT-qPCR

Pasos	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripción	55°C	10 min
PCR (I)	95 °C	3 min
PCR (II)	45 ciclos de 95 °C	15 s
PCR (III)	58 °C	30 s

6.7. Secuenciación del genoma completo

Se utilizó el protocolo de secuenciación en nanoporo de ARTIC (Quick, 2020), que se basa en la secuenciación de amplicones de 400 pb utilizando el secuenciador MinION.

6.7.1. Síntesis del ADN complementario

A partir de 8 μL del ARN previamente extraído se sintetizó el ADNc empleando LunaScript RT SuperMix (5X) utilizando hexámeros (Tabla 5). Se prepararon 116 muestras de ARN más un control negativo de agua libre de nucleasas por biblioteca. Las reacciones se incubaron de acuerdo con lo indicado en la tabla 6.

Tabla 5. Reacciones de retrotranscripción para preparar ADNc.

Componente	Volumen
LunaScript RT SuperMix (5X)	2 μL
Templado de ARN	8 μL
Total	10 μL

Tabla 6. Incubación de las reacciones de retrotranscripción.

Temperatura	Tiempo
25 °C	02 min
55 °C	10 min
95 °C	01 min
4 °C	Almacenaje

6.7.2. PCR múltiple

Para cada muestra se realizó una PCR múltiple empleando dos grupos de iniciadores, el primero con 110 y el segundo con 108 (secuencias mostradas en la Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR múltiple.

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_1_LEFT	nCoV-2019_1	ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT	24
nCoV-2019_1_RIGHT	nCoV-2019_1	CATCTTTAAGATGTTGACGTGCCTC	25
nCoV-2019_2_LEFT	nCoV-2019_2	CTGTTTTACAGGTTTCGCGACGT	22
nCoV-2019_2_RIGHT	nCoV-2019_2	TAAGGATCAGTGCCAAGCTCGT	22
nCoV-2019_3_LEFT	nCoV-2019_1	CGGTAATAAAGGAGCTGGTGGC	22
nCoV-2019_3_RIGHT	nCoV-2019_1	AAGGTGTCTGCAATTCATAGCTCT	24
nCoV-2019_4_LEFT	nCoV-2019_2	GGTGATACTGCTGCCGTGAAC	22
nCoV-2019_4_RIGHT	nCoV-2019_2	CACAAGTAGTGGCACCTTCTTTAGT	25
nCoV-2019_5_LEFT	nCoV-2019_1	TGGTGAAACTTCATGGCAGACG	22
nCoV-2019_5_RIGHT	nCoV-2019_1	ATTGATGTTGACTTTCTCTTTTTGGAGT	28
nCoV-2019_6_LEFT	nCoV-2019_2	GGTGTTGTTGGAGAAGGTTCCG	22
nCoV-2019_6_RIGHT	nCoV-2019_2	TAGCGGCCTTCTGTAAAACACG	22
nCoV-2019_7_LEFT	nCoV-2019_1	ATCAGAGGCTGCTCGTGTTGTA	22
nCoV-2019_7_LEFT_alt0	nCoV-2019_1	CATTTGCATCAGAGGCTGCTCG	22
nCoV-2019_7_RIGHT	nCoV-2019_1	TGCACAGGTGACAATTTGTCCA	22
nCoV-2019_7_RIGHT_alt5	nCoV-2019_1	AGGTGACAATTTGTCCACCGAC	22
nCoV-2019_8_LEFT	nCoV-2019_2	AGAGTTTCTTAGAGACGGTTGGGA	24
nCoV-2019_8_RIGHT	nCoV-2019_2	GCTTCAACAGCTTCACTAGTAGGT	24

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_8_LEFT	nCoV-2019_2	AGAGTTTCTTAGAGACGGTTGGGA	24
nCoV-2019_8_RIGHT	nCoV-2019_2	GCTTCAACAGCTTCACTAGTAGGT	24
nCoV-2019_9_LEFT	nCoV-2019_1	TCCCACAGAAGTGTTAACAGAGGA	24
nCoV-2019_9_LEFT_alt4	nCoV-2019_1	TTCCCACAGAAGTGTTAACAGAGG	24
nCoV-2019_9_RIGHT	nCoV-2019_1	ATGACAGCATCTGCCACAACAC	22
nCoV-2019_9_RIGHT_alt2	nCoV-2019_1	GACAGCATCTGCCACAACACAG	22
nCoV-2019_10_LEFT	nCoV-2019_2	TGAGAAGTGCTCTGCCTATACAGT	24
nCoV-2019_10_RIGHT	nCoV-2019_2	TCATCTAACCAATCTTCTTCTTGCTCT	27
nCoV-2019_11_LEFT	nCoV-2019_1	GGAATTTGGTGCCACTTCTGCT	22
nCoV-2019_11_RIGHT	nCoV-2019_1	TCATCAGATTCAACTTGCATGGCA	24
nCoV-2019_12_LEFT	nCoV-2019_2	AAACATGGAGGAGGTGTTGCAG	22
nCoV-2019_12_RIGHT	nCoV-2019_2	TTCACTCTTCATTTCCAAAAAGCTTGA	27
nCoV-2019_13_LEFT	nCoV-2019_1	TCGCACAAATGTCTACTTAGCTGT	24
nCoV-2019_13_RIGHT	nCoV-2019_1	ACCACAGCAGTTAAAACACCCT	22
nCoV-2019_14_LEFT	nCoV-2019_2	CATCCAGATTCTGCCACTCTTGT	23
nCoV-2019_14_LEFT_alt4	nCoV-2019_2	TGGCAATCTTCATCCAGATTCTGC	24
nCoV-2019_14_RIGHT	nCoV-2019_2	AGTTTCCACACAGACAGGCATT	22
nCoV-2019_14_RIGHT_alt2	nCoV-2019_2	TGCGTGTTTCTTCTGCATGTGC	22
nCoV-2019_15_LEFT	nCoV-2019_1	ACAGTGCTTAAAAAGTGTAAGTGCC	27
nCoV-2019_15_LEFT_alt1	nCoV-2019_1	AGTGCTTAAAAAGTGTAAGTGCCCT	26
nCoV-2019_15_RIGHT	nCoV-2019_1	AACAGAACTGTAGCTGGCACT	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_15_RIGHT_alt3	nCoV-2019_1	ACTGTAGCTGGCACTTTGAGAGA	23
nCoV-2019_16_LEFT	nCoV-2019_2	AATTTGGAAGAAGCTGCTCGGT	22
nCoV-2019_16_RIGHT	nCoV-2019_2	CACAACTTGCGTGTGGAGGTTA	22
nCoV-2019_17_LEFT	nCoV-2019_1	CTTCTTTCTTTGAGAGAAGTGAGGACT	27
nCoV-2019_17_RIGHT	nCoV-2019_1	TTTGTTGGAGTGTTAACAATGCAGT	25
nCoV-2019_18_LEFT	nCoV-2019_2	TGGAAATACCCACAAGTTAATGGTTTAAAC	29
nCoV-2019_18_LEFT_alt2	nCoV-2019_2	ACTTCTATTAAATGGGCAGATAACAACCTGT	30
nCoV-2019_18_RIGHT	nCoV-2019_2	AGCTTGTTTACCACACGTACAAGG	24
nCoV-2019_18_RIGHT_alt1	nCoV-2019_2	GCTTGTTTACCACACGTACAAGG	23
nCoV-2019_19_LEFT	nCoV-2019_1	GCTGTTATGTACATGGGCACACT	23
nCoV-2019_19_RIGHT	nCoV-2019_1	TGTCCAACCTTAGGGTCAATTTCTGT	25
nCoV-2019_20_LEFT	nCoV-2019_2	ACAAAGAAAACAGTTACACAACAACCA	27
nCoV-2019_20_RIGHT	nCoV-2019_2	ACGTGGCTTTATTAGTTGCATTGTT	25
nCoV-2019_21_LEFT	nCoV-2019_1	TGGCTATTGATTATAAACACTACACACCC	29
nCoV-2019_21_LEFT_alt2	nCoV-2019_1	GGCTATTGATTATAAACACTACACACCCT	29
nCoV-2019_21_RIGHT	nCoV-2019_1	TAGATCTGTGTGGCCAACCTCT	22
nCoV-2019_21_RIGHT_alt0	nCoV-2019_1	GATCTGTGTGGCCAACCTCTTC	22
nCoV-2019_22_LEFT	nCoV-2019_2	ACTACCGAAGTTGTAGGAGACATTATACT	29
nCoV-2019_22_RIGHT	nCoV-2019_2	ACAGTATTCTTTGCTATAGTAGTCGGC	27
nCoV-2019_23_LEFT	nCoV-2019_1	ACAACACTAACATAGTTACACGGTGT	27
nCoV-2019_23_RIGHT	nCoV-2019_1	ACCAGTACAGTAGGTTGCAATAGTG	25
nCoV-2019_24_LEFT	nCoV-2019_2	AGGCATGCCTTCTTACTGTACTG	23

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_24_RIGHT	nCoV-2019_2	ACATTCTAACCATAGCTGAAATCGGG	26
nCoV-2019_25_LEFT	nCoV-2019_1	GCAATTGTTTTTCAGCTATTTTGCAGT	27
nCoV-2019_25_RIGHT	nCoV-2019_1	ACTGTAGTGACAAGTCTCTCGCA	23
nCoV-2019_26_LEFT	nCoV-2019_2	TTGTGATACATTCTGTGCTGGTAGT	25
nCoV-2019_26_RIGHT	nCoV-2019_2	TCCGCACTATCACCAACATCAG	22
nCoV-2019_27_LEFT	nCoV-2019_1	ACTACAGTCAGCTTATGTGTCAACC	25
nCoV-2019_27_RIGHT	nCoV-2019_1	AATACAAGCACCAAGGTCACGG	22
nCoV-2019_28_LEFT	nCoV-2019_2	ACATAGAAGTTACTGGCGATAGTTGT	26
nCoV-2019_28_RIGHT	nCoV-2019_2	TGTTTAGACATGACATGAACAGGTGT	26
nCoV-2019_29_LEFT	nCoV-2019_1	ACTTGTGTTCCTTTTTGTGCTGC	24
nCoV-2019_29_RIGHT	nCoV-2019_1	AGTGTACTCTATAAGTTTTGATGGTGTGT	29
nCoV-2019_30_LEFT	nCoV-2019_2	GCACAATAATGGTGACTTTTTGCA	25
nCoV-2019_30_RIGHT	nCoV-2019_2	ACCACTAGTAGATACACAAACACCAG	26
nCoV-2019_31_LEFT	nCoV-2019_1	TTCTGAGTACTGTAGGCACGGC	22
nCoV-2019_31_RIGHT	nCoV-2019_1	ACAGAATAAACACCAGGTAAGAATGAGT	28
nCoV-2019_32_LEFT	nCoV-2019_2	TGGTGAATACAGTCATGTAGTTGCC	25
nCoV-2019_32_RIGHT	nCoV-2019_2	AGCACATCACTACGCAACTTTAGA	24
nCoV-2019_33_LEFT	nCoV-2019_1	ACTTTTGAAGAAGCTGCGCTGT	22
nCoV-2019_33_RIGHT	nCoV-2019_1	TGGACAGTAACTACGTCATCAAGC	25
nCoV-2019_34_LEFT	nCoV-2019_2	TCCCATCTGGTAAAGTTGAGGGT	23
nCoV-2019_34_RIGHT	nCoV-2019_2	AGTGAAATTGGGCCTCATAGCA	22
nCoV-2019_35_LEFT	nCoV-2019_1	TGTTCGCATTCAACCAGGACAG	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_36_LEFT	nCoV-2019_2	TTAGCTTGGTTGTACGCTGCTG	22
nCoV-2019_36_RIGHT	nCoV-2019_2	GAACAAAGACCATTGAGTACTCTGGA	26
nCoV-2019_37_LEFT	nCoV-2019_1	ACACACCACTGGTTGTTACTCAC	23
nCoV-2019_37_RIGHT	nCoV-2019_1	GTCCACACTCTCCTAGCACCAT	22
nCoV-2019_38_LEFT	nCoV-2019_2	ACTGTGTTATGTATGCATCAGCTGT	25
nCoV-2019_38_RIGHT	nCoV-2019_2	CACCAAGAGTCAGTCTAAAGTAGCG	25
nCoV-2019_39_LEFT	nCoV-2019_1	AGTATTGCCCTATTTTCTTCATAACTGGT	29
nCoV-2019_39_RIGHT	nCoV-2019_1	TGTA ACTGGACACATTGAGCCC	22
nCoV-2019_40_LEFT	nCoV-2019_2	TGCACATCAGTAGTCTTACTCTCAGT	26
nCoV-2019_40_RIGHT	nCoV-2019_2	CATGGCTGCATCACGGTCAAAT	22
nCoV-2019_41_LEFT	nCoV-2019_1	GTTCCCTTCCATCATATGCAGCT	23
nCoV-2019_41_RIGHT	nCoV-2019_1	TGGTATGACAACCATTAGTTTGGCT	25
nCoV-2019_42_LEFT	nCoV-2019_2	TGCAAGAGATGGTTGTGTTCCC	22
nCoV-2019_42_RIGHT	nCoV-2019_2	CCTACCTCCCTTTGTTGTGTTGT	23
nCoV-2019_43_LEFT	nCoV-2019_1	TACGACAGATGTCTTGTGCTGC	22
nCoV-2019_43_RIGHT	nCoV-2019_1	AGCAGCATCTACAGCAAAGCA	22
nCoV-2019_44_LEFT	nCoV-2019_2	TGCCACAGTACGTCTACAAGCT	22
nCoV-2019_44_LEFT_alt3	nCoV-2019_2	CCACAGTACGTCTACAAGCTGG	22
nCoV-2019_44_RIGHT	nCoV-2019_2	AACCTTTCCACATACCGCAGAC	22
nCoV-2019_44_RIGHT_alt0	nCoV-2019_2	CGCAGACGGTACAGACTGTGTT	22
nCoV-2019_45_LEFT	nCoV-2019_1	TACCTACA ACTTGTGCTAATGACCC	25

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_45_LEFT_alt2	nCoV-2019_1	AGTATGTACAAATACCTACAACCTTGTGCT	29
nCoV-2019_45_RIGHT	nCoV-2019_1	AAATTGTTTCTTCATGTTGGTAGTTAGAGA	30
nCoV-2019_45_RIGHT_alt7	nCoV-2019_1	TTCATGTTGGTAGTTAGAGAAAGTGTGTC	29
nCoV-2019_46_LEFT	nCoV-2019_2	TGTCGCTTCCAAGAAAAGGACG	22
nCoV-2019_46_LEFT_alt1	nCoV-2019_2	CGCTTCCAAGAAAAGGACGAAGA	23
nCoV-2019_46_RIGHT	nCoV-2019_2	CACGTTACCTAAGTTGGCGTA	22
nCoV-2019_46_RIGHT_alt2	nCoV-2019_2	CACGTTACCTAAGTTGGCGTAT	23
nCoV-2019_47_LEFT	nCoV-2019_1	AGGACTGGTATGATTTTGTAGAAAACCC	28
nCoV-2019_47_RIGHT	nCoV-2019_1	AATAACGGTCAAAGAGTTTTAACCTCTC	28
nCoV-2019_48_LEFT	nCoV-2019_2	TGTTGACACTGACTTAACAAAGCCT	25
nCoV-2019_48_RIGHT	nCoV-2019_2	TAGATTACCAGAAGCAGCGTGC	22
nCoV-2019_49_LEFT	nCoV-2019_1	AGGAATTACTTGTGTATGCTGCTGA	25
nCoV-2019_49_RIGHT	nCoV-2019_1	TGACGATGACTTGGTTAGCATTAAACA	28
nCoV-2019_50_LEFT	nCoV-2019_2	GTTGATAAGTACTTTGATTGTTACGATGGT	30
nCoV-2019_50_RIGHT	nCoV-2019_2	TAACATGTTGTGCCAACCACCA	22
nCoV-2019_51_LEFT	nCoV-2019_1	TCAATAGCCGCCACTAGAGGAG	22
nCoV-2019_51_RIGHT	nCoV-2019_1	AGTGCATTAACATTGGCCGTGA	22
nCoV-2019_52_LEFT	nCoV-2019_2	CATCAGGAGATGCCACAACCTGC	22
nCoV-2019_52_RIGHT	nCoV-2019_2	GTTGAGAGCAAATTCATGAGGTCC	25
nCoV-2019_53_LEFT	nCoV-2019_1	AGCAAAATGTTGGACTGAGACTGA	24
nCoV-2019_53_RIGHT	nCoV-2019_1	AGCCTCATAAACTCAGGTTCCC	23
nCoV-2019_54_LEFT	nCoV-2019_2	TGAGTTAACAGGACACATGTTAGACA	26

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_54_RIGHT	nCoV-2019_2	AACCAAAAACCTTGTCCATTAGCACA	25
nCoV-2019_55_LEFT	nCoV-2019_1	ACTCAACTTTACTTAGGAGGTATGAGCT	28
nCoV-2019_55_RIGHT	nCoV-2019_1	GGTGTACTCTCCTATTTGTACTTTACTGT	29
nCoV-2019_56_LEFT	nCoV-2019_2	ACCTAGACCACCACTTAACCGA	22
nCoV-2019_56_RIGHT	nCoV-2019_2	ACACTATGCGAGCAGAAGGGTA	22
nCoV-2019_57_LEFT	nCoV-2019_1	ATTCTACACTCCAGGGACCACC	22
nCoV-2019_57_RIGHT	nCoV-2019_1	GTAATTGAGCAGGGTCGCCAAT	22
nCoV-2019_58_LEFT	nCoV-2019_2	TGATTTGAGTGTTGTCAATGCCAGA	25
nCoV-2019_58_RIGHT	nCoV-2019_2	CTTTTCTCCAAGCAGGGTTACGT	23
nCoV-2019_59_LEFT	nCoV-2019_1	TCACGCATGATGTTTCATCTGCA	23
nCoV-2019_59_RIGHT	nCoV-2019_1	AAGAGTCCTGTTACATTTTCAGCTTG	26
nCoV-2019_60_LEFT	nCoV-2019_2	TGATAGAGACCTTTATGACAAGTTGCA	27
nCoV-2019_60_RIGHT	nCoV-2019_2	GGTACCAACAGCTTCTCTAGTAGC	24
nCoV-2019_61_LEFT	nCoV-2019_1	TGTTTATCACCCGCGAAGAAGC	22
nCoV-2019_61_RIGHT	nCoV-2019_1	ATCACATAGACAACAGGTGCGC	22
nCoV-2019_62_LEFT	nCoV-2019_2	GGCACATGGCTTTGAGTTGACA	22
nCoV-2019_62_RIGHT	nCoV-2019_2	GTTGAACCTTTCTACAAGCCGC	22
nCoV-2019_63_LEFT	nCoV-2019_1	TGTTAAGCGTGTTGACTGGACT	22
nCoV-2019_63_RIGHT	nCoV-2019_1	ACAAACTGCCACCATCACAACC	22
nCoV-2019_64_LEFT	nCoV-2019_2	TCGATAGATATCCTGCTAATTCCATTGT	28
nCoV-2019_64_RIGHT	nCoV-2019_2	AGTCTTGATAAAAGTGTTCCAGAGGT	25
nCoV-2019_65_LEFT	nCoV-2019_1	GCTGGCTTTAGCTTGTGGGTTT	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_65_RIGHT	nCoV-2019_1	TGTCAGTCATAGAACAAACACCAATAGT	28
nCoV-2019_66_LEFT	nCoV-2019_2	GGGTGTGGACATTGCTGCTAAT	22
nCoV-2019_66_RIGHT	nCoV-2019_2	TCAATTTCCATTTGACTCCTGGGT	24
nCoV-2019_67_LEFT	nCoV-2019_1	GTTGTCCAACAATTACCTGAAACTTACT	28
nCoV-2019_67_RIGHT	nCoV-2019_1	CAACCTTAGAACTACAGATAAATCTTGGG	30
nCoV-2019_68_LEFT	nCoV-2019_2	ACAGGTTTCATCTAAGTGTGTGTGT	24
nCoV-2019_68_RIGHT	nCoV-2019_2	CTCCTTTATCAGAACCAGCACCA	23
nCoV-2019_69_LEFT	nCoV-2019_1	TGTCGCAAAATATACTCAACTGTGTCA	27
nCoV-2019_69_RIGHT	nCoV-2019_1	TCTTTATAGCCACGGAACCTCCA	23
nCoV-2019_70_LEFT	nCoV-2019_2	ACAAAAGAAAATGACTCTAAAGAGGGTTT	29
nCoV-2019_70_RIGHT	nCoV-2019_2	TGACCTTCTTTTAAAGACATAACAGCAG	28
nCoV-2019_71_LEFT	nCoV-2019_1	ACAAATCCAATTCAGTTGTCTTCCTATTC	29
nCoV-2019_71_RIGHT	nCoV-2019_1	TGGAAAAGAAAGGTAAGAACAAGTCCT	27
nCoV-2019_72_LEFT	nCoV-2019_2	ACACGTGGTGTGTTTATTACCCTGAC	24
nCoV-2019_72_RIGHT	nCoV-2019_2	ACTCTGAACTCACTTTCCATCCAAC	25
nCoV-2019_73_LEFT	nCoV-2019_1	CAATTTTGTAATGATCCATTTTGGGTGT	29
nCoV-2019_73_RIGHT	nCoV-2019_1	CACCAGCTGTCCAACCTGAAGA	22
nCoV-2019_74_LEFT	nCoV-2019_2	ACATCACTAGGTTTCAAACCTTACTTGC	28
nCoV-2019_74_RIGHT	nCoV-2019_2	GCAACACAGTTGCTGATTCTCTTC	24
nCoV-2019_75_LEFT	nCoV-2019_1	AGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGT	26
nCoV-2019_75_RIGHT	nCoV-2019_1	ACCACCAACCTTAGAATCAAGATTGT	26
nCoV-2019_76_LEFT	nCoV-2019_2	AGGGCAAACCTGGAAAGATTGCT	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_76_LEFT_alt3	nCoV-2019_2	GGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGA	23
nCoV-2019_76_RIGHT	nCoV-2019_2	ACACCTGTGCCTGTAAACCAT	22
nCoV-2019_76_RIGHT_alt0	nCoV-2019_2	ACCTGTGCCTGTAAACCATTGA	23
nCoV-2019_77_LEFT	nCoV-2019_1	CCAGCAACTGTTTGTGGACCTA	22
nCoV-2019_77_RIGHT	nCoV-2019_1	CAGCCCCTATTAACAGCCTGC	22
nCoV-2019_78_LEFT	nCoV-2019_2	CAACTTACTCCTACTTGGCGTGT	23
nCoV-2019_78_RIGHT	nCoV-2019_2	TGTGTACAAAACTGCCATATTGCA	25
nCoV-2019_79_LEFT	nCoV-2019_1	GTGGTGATTCAACTGAATGCAGC	23
nCoV-2019_79_RIGHT	nCoV-2019_1	CATTTTCATCTGTGAGCAAAGGTGG	24
nCoV-2019_80_LEFT	nCoV-2019_2	TTGCCTTGGTGATATTGCTGCT	22
nCoV-2019_80_RIGHT	nCoV-2019_2	TGGAGCTAAGTTGTTTAAACAAGCG	24
nCoV-2019_81_LEFT	nCoV-2019_1	GCACTTGAAAACCTCAAGATGTGG	25
nCoV-2019_81_RIGHT	nCoV-2019_1	GTGAAGTTCTTTTCTTGTGCAGGG	24
nCoV-2019_82_LEFT	nCoV-2019_2	GGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCT	25
nCoV-2019_82_RIGHT	nCoV-2019_2	TGCCAGAGATGTCACCTAAATCAA	24
nCoV-2019_83_LEFT	nCoV-2019_1	TCCTTTGCAACCTGAATTAGACTCA	25
nCoV-2019_83_RIGHT	nCoV-2019_1	TTTGACTCCTTTGAGCACTGGC	22
nCoV-2019_84_LEFT	nCoV-2019_2	TGCTGTAGTTGTCTCAAGGGCT	22
nCoV-2019_84_RIGHT	nCoV-2019_2	AGGTGTGAGTAACTGTTACAAACAAC	27
nCoV-2019_85_LEFT	nCoV-2019_1	ACTAGCACTCTCCAAGGGTGTT	22
nCoV-2019_85_RIGHT	nCoV-2019_1	ACACAGTCTTTTACTCCAGATTCCC	25
nCoV-2019_86_LEFT	nCoV-2019_2	TCAGGTGATGGCACAACAAGTC	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_86_RIGHT	nCoV-2019_2	ACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTACGC	25
nCoV-2019_87_LEFT	nCoV-2019_1	CGACTACTAGCGTGCCTTTGTA	22
nCoV-2019_87_RIGHT	nCoV-2019_1	ACTAGGTTCCATTGTTCAAGGAGC	24
nCoV-2019_88_LEFT	nCoV-2019_2	CCATGGCAGATTCCAACGGTAC	22
nCoV-2019_88_RIGHT	nCoV-2019_2	TGGTCAGAATAGTGCCATGGAGT	23
nCoV-2019_89_LEFT	nCoV-2019_1	GTACGCGTTCCATGTGGTCATT	22
nCoV-2019_89_LEFT_alt2	nCoV-2019_1	CGCGTTCCATGTGGTCATTCAA	22
nCoV-2019_89_RIGHT	nCoV-2019_1	ACCTGAAAGTCAACGAGATGAAACA	25
nCoV-2019_89_RIGHT_alt4	nCoV-2019_1	ACGAGATGAAACATCTGTTGTCACT	25
nCoV-2019_90_LEFT	nCoV-2019_2	ACACAGACCATTCCAGTAGCAGT	23
nCoV-2019_90_RIGHT	nCoV-2019_2	TGAAATGGTGAATTGCCCTCGT	22
nCoV-2019_91_LEFT	nCoV-2019_1	TCACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGT	25
nCoV-2019_91_RIGHT	nCoV-2019_1	TTCAAGTGAGAACC AAAAGATAATAAGCA	29
nCoV-2019_92_LEFT	nCoV-2019_2	TTTGTGCTTTTTAGCCTTTCTGCT	24
nCoV-2019_92_RIGHT	nCoV-2019_2	AGGTTCTTGCAATTAATTGTAAAAGG	27
nCoV-2019_93_LEFT	nCoV-2019_1	TGAGGCTGGTTCTAAATCACCCA	23
nCoV-2019_93_RIGHT	nCoV-2019_1	AGGTCTTCCTTGCCATGTTGAG	22
nCoV-2019_94_LEFT	nCoV-2019_2	GGCCCCAAGGTTTACCCAATAA	22
nCoV-2019_94_RIGHT	nCoV-2019_2	TTTGGCAATGTTGTTCCCTTGAGG	23
nCoV-2019_95_LEFT	nCoV-2019_1	TGAGGGAGCCTTGAATACACCA	22
nCoV-2019_95_RIGHT	nCoV-2019_1	CAGTACGTTTTTGCCGAGGCTT	22
nCoV-2019_96_LEFT	nCoV-2019_2	GCCAACAACAACAAGGCCAAAC	22

Nombre	Grupo de iniciadores	Secuencia	Longitud
nCoV-2019_96_RIGHT	nCoV-2019_2	TAGGCTCTGTTGGTGGGAATGT	22
nCoV-2019_97_LEFT	nCoV-2019_1	TGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGA	28
nCoV-2019_97_RIGHT	nCoV-2019_1	ACACACTGATTAAAGATTGCTATGTGAG	28
nCoV-2019_98_LEFT	nCoV-2019_2	AACAATTGCAACAATCCATGAGCA	24
nCoV-2019_98_RIGHT	nCoV-2019_2	TTCTCCTAAGAAGCTATTAAAATCACATGG	30

Se prepararon dos reacciones de PCR por muestra de la manera especificada en la tabla 8. A cada reacción de PCR se le añadieron 2.5 μ L de ADNc, se mezcló por pipeteo, se centrifugó y se recuperó el líquido en el fondo de los tubos. El programa del termociclador empleado se describe en la tabla 9.

Tabla 8. Reacciones de PCR múltiple.

Componente	Reacción 1	Reacción 2
5X Q5 Buffer de reacción	5 μ L	5 μ L
10 mM dNTPs	0.5 μ L	0.5 μ L
Q5 Hot Start ADN Polimerasa	0.25 μ L	0.25 μ L
V3 Pool 1 (10 μ M)	2 μ L	0 μ L
V3 Pool 2 (10 μ M)	0 μ L	2 μ L
Agua libre de nucleasas	12.75 μ L	12.75 μ L
Total	22.5 μL	22.5 μL

Tabla 9. Programa del termociclador para PCR múltiple.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación por calor	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98 °C	15 s	25-35
Alineamiento	65°C	5 min	25-35
Almacenamiento	4 °C	Indefinido	1

Finalmente, se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa para corroborar que las reacciones se llevaron a cabo adecuadamente.

6.7.3. Dilución de los productos de PCR

Se llevaron a cabo las diluciones de los productos de PCR de acuerdo con la intensidad de las bandas obtenidas en las electroforesis en geles de agarosa. Las reacciones se describen en la tabla 10.

Tabla 10. Diluciones de los productos de PCR.

Intensidad Volumen	Alta	Media	Baja
Pool 1	2.5 µL	5 µL	7.5 µL
Pool 2	2.5 µL	5 µL	7.5 µL
Agua	45 µL	40 µL	35 µL
Total	50 µL	50 µL	50 µL

6.7.4. Adición de códigos de barras y purificación con perlas magnéticas

Se repararon los extremos de los amplicones de ADN de acuerdo con la reacción descrita en la tabla 11. Para los periodos de incubación, se siguieron los parámetros indicados en la tabla 12.

Tabla 11. Reacción para la reparación de los extremos de ADN.

Componente	Volumen (µL)
Producto de PCR del paso previo	3.3
Buffer de reacción Ultra II End Prep	1.2
Mezcla Ultra II End Prep Enzyme	0.5
Agua libre de nucleasas	5
Total	10

Tabla 12. Tiempos y temperaturas de incubación para la preparación de los extremos.

Temperatura	Tiempo
25 °C	15 min
65 °C	15 min
Incubación en hielo	01 min

Se utilizaron los códigos de barras de EXP-NBD196 en las muestras trabajadas. Las reacciones y los tiempos de incubación se describen en las tablas 13 y 14, respectivamente.

Tabla 13. Reacción para la ligación de los códigos de barras.

Componente	Volumen (µL)
Mezcla de preparación de extremos	0.75
Código de barras NBXX	1.25
Master Mix ligasa Blunt/TA	5
Agua libre de nucleasas	3
Total	10

Tabla 14. Tiempos y temperaturas de incubación para la ligación de los códigos de barras.

Temperatura	Tiempo
25 °C	20 min
65 °C	10 min
Incubación en hielo	01 min

En un tubo nuevo de 1.5 mL, se agruparon todas las reacciones de código de barras y se añadió 0.4 veces el volumen de perlas SPRI (*Agencourt AMPure XP beads*) a la pastilla. La reacción se mezcló y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó en una gradilla magnética y se incubó hasta que las perlas se sedimentaron y el sobrenadante adquirió una tonalidad transparente. El sobrenadante se desechó y las perlas se resuspendieron en 250 µL de buffer de fragmentos cortos (SFB, por sus siglas en inglés), se recogió el líquido en el fondo del tubo y se colocó sobre el imán. El sobrenadante se retiró y se desechó para llevar a cabo un segundo lavado con SFB. Posteriormente, se añadieron 200 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente para lavar el sedimento, y se retiraron. La reacción se incubó durante un minuto. El sedimento se resuspendió en 30 µL de Tris 10 milimolar (mM) pH 8.0, se mezcló y se incubó durante 2 minutos.

La muestra se transfirió a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL, asegurando de que no se transfirieran perlas y se cuantificó 1 μ L de los amplicones con código de barras, esperando obtener al menos 30 ng.

6.7.5. Cuantificación en el Qubit

Se cuantificó 1 μ L de muestra con código de barras con 199 μ L de intercalante, utilizando el fluorómetro Qubit aplicando el ensayo *ONE dsDNA*. Se buscó tener alrededor de 30 ng en total en esta etapa, para lograr el rendimiento máximo de ejecución.

6.7.6. Adición de adaptadores

La reacción para llevar a cabo la ligación de adaptadores se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en la tabla 15 y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Tabla 15. Reacción para ligación de adaptadores

Componente	Volumen (μL)
Pool de amplicones con códigos de barras	30
Buffer de reacción NEBNext Quick Ligation (5X)	10
Mezcla de adaptadores (AMII)	5
Ligasa ADN Quick T4	5
Total	50

Se añadieron perlas SPRI al tubo de muestra. La reacción se mezcló y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó en una gradilla magnética y se incubó hasta que las perlas se sedimentaron y el sobrenadante adquirió una tonalidad transparente. El sobrenadante se desechó y las perlas se resuspendieron en 250 μ L de SFB completamente, se recogió el líquido en el fondo del tubo y se colocó sobre el imán. El sobrenadante se retiró y se desechó para llevar a cabo un segundo lavado con SFB. Se removieron los residuos de SFB y las perlas se resuspendieron en 15 μ L de EB (ONT). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante dos minutos y posteriormente se colocó en una

gradilla magnética hasta que se adquirió una tonalidad transparente. Se cuantificó 1 μL de la biblioteca final, esperando obtener al menos 15 ng.

6.7.7. Secuenciación y ensamblaje

Se cargaron 15 ng de la biblioteca de secuenciación en la celda de flujo “FLO-MIN106”. El buffer de secuenciación, las perlas de carga, el buffer de lavado y el FLT (*Flush Tether*) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 30 μL de FLT al tubo del buffer de lavado y lo anterior se mezcló utilizando el vórtex.

Para llevar a cabo la carga de la biblioteca de secuenciación en la celda de flujo, se abrió el puerto de entrada de la celda y con una pipeta de 1000 μL con el volumen ajustado a 800 μL , se retiró el aire de esta. Se cargaron 800 μL de la mezcla del buffer de lavado y FLT por el puerto de entrada de la celda de flujo, evitando que se introdujeran burbujas de aire. Se esperaron 5 minutos y posteriormente, se abrió el puerto SpotON. Se cargaron otros 200 μL la mezcla del buffer de lavado y FLT en la celda de flujo a través del puerto de entrada. La biblioteca para secuenciación se preparó de acuerdo con lo descrito en la tabla 16 y se cargó en el puerto SpotON vertiendo la mezcla gota a gota. Se colocó la tapa en el puerto SpotON y se cerraron el puerto de entrada y la tapa del dispositivo de MinION.

Tabla 16. Dilución de la biblioteca para secuenciación

Componente	Volumen
Buffer de secuenciación	37,5 μL
Perlas de carga	25,5 μL
Biblioteca	12 μL
Total	75 μL

Finalmente, se inició la ejecución de la secuenciación en MinKNOW utilizando los parámetros descritos en la tabla 17. El progreso de la ejecución de la secuenciación fue monitoreado utilizando la interfaz MinKNOW.

Tabla 17. Parámetros para secuenciar utilizando MinKNOW

Parámetro	Selección
Kit	LSK109
Opciones de ejecución	6 horas
Llamado de bases	Rápido
Salida	4000

El ensamblaje de las secuencias se llevó a cabo utilizando la herramienta bioinformática de la red ARTIC, que se utiliza para filtrar la longitud de las lecturas obtenidas por código de barras, utilizando una longitud de lectura mínima de 400 pb y máxima de 700 pb.

Los comandos utilizados para realizar el ensamblaje de las secuencias fueron los siguientes:

1. Activación del ambiente de ARTIC:

```
source activate artic-ncov2019
```

2. Separación por código de barras:

```
guppy_barcode --require_barcodes_both_ends -i run_name -s output_directory -  
-arrangements_files "barcode_arrs_nb12.cfg barcode_arrs_nb24.cfg"
```

3. Leer filtrado:

```
artic guppyplex --skip-quality-check --min-length 400 --max-length 700 --dire  
ctory output_directory/barcode03 --prefix run_name
```

4. Ejecutar flujo de MinION:

```
artic minion --normalise 200 --threads 4 --scheme-directory ~/artic-ncov2019/pri  
mer_schemes --read-file run_name_barcode03.fastq --fast5-directory path_to_fast5  
--sequencing-summary path_to_sequencing_summary.txt nCoV-2019/V3 samplename
```

6.8. Análisis filogenético de máxima verosimilitud

Se llevó a cabo el control de calidad de las secuencias genómicas. A partir de la base de datos GISAID (Shu & McCauley, 2017), se recuperaron secuencias de SARS-CoV-2 que presentaron una longitud mayor a 29,000 pb, provenientes de estados de la República Mexicana (exceptuando Nuevo León), y representativas de cada linaje. Antes de llevar a cabo la reconstrucción filogenética, se eliminaron las secuencias de baja calidad del conjunto de datos, por lo que, además de las secuencias obtenidas en el paso previo, se analizaron 213 secuencias procedentes de México. También se recuperó un conjunto de datos de referencia global (N = 104) en el que se incluyeron secuencias representativas de cada linaje.

Los genomas se descargaron y junto con las secuencias de genomas de longitud completa con cobertura mayor a 95%, provenientes del estado de Nuevo León, se utilizaron para crear un alineamiento múltiple por medio del servidor web de MAFFT (Kato et al., 2017). Posteriormente ese alineamiento se utilizó para construir un árbol de máxima verosimilitud empleando el software IQ-Tree (Trifinopoulos et al., 2017), con el modelo de sustitución HKY+G4, utilizando como parámetro 1000 réplicas. Además, se aplicaron las pruebas de *Ultrafast Bootstrap* (UFboot) y *SH-aLRT* con el fin de obtener valores de soporte de clado confiables (>80/95).

6.9. Análisis evolutivo bayesiano

La reconstrucción de la filogenia por métodos Bayesianos se realizó utilizando el alineamiento múltiple previamente realizado para generar un archivo con extensión .xml, a partir del programa BEAUti (Drummond et al., 2012). Los parámetros incluidos para generar el archivo fueron el modelo de sustitución HKY+G4, el reloj molecular estricto y la población de crecimiento exponencial. Se utilizaron además cadenas de 10,000,000 de estados. El archivo generado se llevó al software BEAST v1.10.4 (Drummond et al., 2012) que fue utilizado con los parámetros preestablecidos. A partir de este programa el archivo .xml se corrió 10 veces. Los archivos resultantes se combinaron utilizando el programa LogCombiner v1.10.4 (Drummond et al., 2012) y se determinó que se hubiera alcanzado un tamaño de muestra efectivo mayor a 200.

Finalmente, se generó un consenso de los árboles predichos, utilizando el software TreeAnnotator 1.8.4 descartando el 10% de los árboles. El consenso de árboles se visualizó utilizando FigTree v1.4.3 y el paquete de R ggtree (Yu et al., 2017). Se determinó el ancestro común más reciente.

Para llevar a cabo la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus y determinar el número de introducciones en el estado, se creó un archivo con extensión .xml utilizando el programa de BEAUti (Drummond et al., 2012), a partir del empleo del alineamiento múltiple previamente realizado. Paralelamente, se creó un archivo de texto delimitado por tabulaciones en el que se incluyeron los nombres de las secuencias empleadas en el alineamiento y las etiquetas de “NL” cuando las secuencias utilizadas se habían obtenido a partir de muestras provenientes del estado de Nuevo León, y “NO-NL” cuando las muestras se habían tomado fuera del estado. Este archivo se agregó como partición al programa de BEAUti, utilizando la opción *Import traits*. Una vez llevado a cabo lo anterior, para esta partición se estableció como modelo de sustitución de rasgos discretos el modelo simétrico y como reloj molecular el reloj estricto. Los parámetros empleados con el alineamiento original fueron el modelo de sustitución de HKY+G4, el reloj molecular estricto y la población de crecimiento exponencial. El nuevo archivo con extensión .xml fue corrido 10 veces utilizando el software BEAST v1.10.4 (Drummond et al., 2012). Los archivos resultantes se combinaron utilizando el programa LogCombiner v1.10.4 (Drummond et al., 2012) y se determinó que se hubiera alcanzado un tamaño de muestra efectivo mayor a 200.

6.10. Tamaño de la muestra

Considerando la prevalencia de COVID-19 en el estado de Nuevo León (10%), con un nivel de confianza del 95% y precisión de la estimación del 5%, se utilizaron 116 muestras provenientes de pacientes positivos para SARS-CoV-2.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1. Datos epidemiológicos del estado de Nuevo León

La dinámica epidemiológica del estado de Nuevo León reportada hasta el 28 de febrero de 2021, indica que, a partir de la llegada del virus del SARS-CoV-2 a la región, se ha tenido registro de tres grandes olas epidémicas. Como se puede observar en la figura 17, el primer aumento exponencial del número de casos en el estado inició hacia finales de junio de 2020, mostrando una ligera disminución para mediados de agosto del mismo año. La segunda ola epidémica de SARS-CoV-2 en Nuevo León, comenzó el 21 de octubre de 2020, semanas después del decremento en el número de casos registrados diariamente, tras el primer pico. Este aumento en el número de casos registrados estuvo presente de forma constante en la región hasta el 23 de diciembre de 2020. Finalmente, la tercera ola epidémica comenzó pocos días después de un mínimo en los casos registrados diariamente tras el segundo pico, el 30 de diciembre de 2020, y concluyó durante la primera semana de febrero de 2021. En el pico más pronunciado de la epidemia estatal, a finales de enero de 2021, hubo más de 1000 casos confirmados por día.

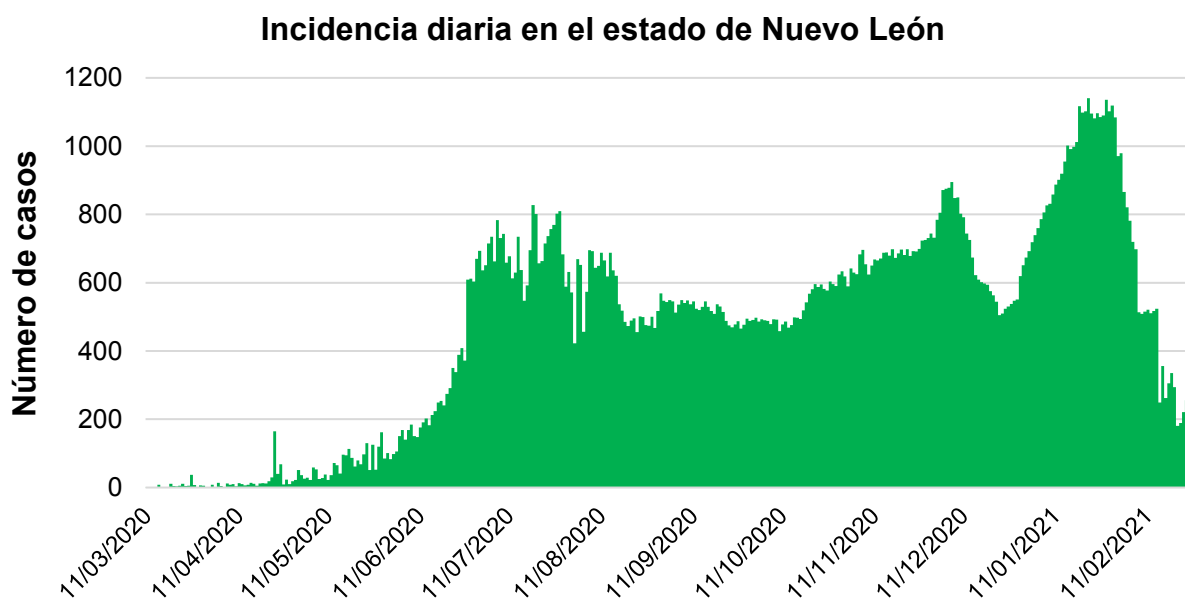


Figura 17. Curva epidemiológica del estado de Nuevo León.

7.2. Secuenciación

Se utilizaron muestras de ARN que resultaron positivas a SARS-CoV-2 de acuerdo con el protocolo de RT-qPCR de Berlín, procedentes de diferentes instituciones de salud del estado de Nuevo León. Tras llevar a cabo el protocolo de secuenciación en nanoporo dictado por la red de ARTIC, se realizó el ensamblaje de los genomas. Se obtuvieron 116 secuencias del virus del SARS-CoV-2, 92 de las cuales correspondieron a genomas de longitud completa. Las secuencias presentaron valores de profundidad que variaron desde 30x hasta 487x y las coberturas obtenidas se situaron entre 53.91% y 100%. Las consideradas secuencias de genoma completo presentaron coberturas mayores a 95% y profundidades cuyos valores se encontraron por encima de 125x (tabla 18).

Tabla 18. Secuencias obtenidas utilizando el protocolo de ARTIC.

Secuencia	Profundidad	Cobertura
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-126/2020	436x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-2088/2020	440x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-2098/2020	440x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-4479/2020	441x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-001/2020	421x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-003/2020	429x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-004/2020	420x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-005/2020	429x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-006/2020	430x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-007/2020	440x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-008/2020	293x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-009/2020	436x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-012/2020	442x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-013/2020	423x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-014/2020	362x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-015/2020	443x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-017/2020	375x	100.00%

Secuencia	Profundidad	Cobertura
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-018/2020	312x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-019/2020	399x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-020/2020	392x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-021/2020	379x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-022/2020	399x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-023/2020	406x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-024/2020	383x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-025/2020	410x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-026/2020	391x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-027/2020	410x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-028/2020	414x	98.66%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-029/2020	343x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-030/2020	415x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-031/2020	440x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-032/2020	415x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-033/2020	417x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-034/2020	422x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-035/2020	439x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-036/2020	411x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-037/2020	425x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-038/2020	440x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-039/2020	410x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-040/2020	418x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-041/2020	373x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-042/2020	434x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-043/2020	429x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-044/2020	434x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-045/2020	424x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-046/2020	132x	92.68%

Secuencia	Profundidad	Cobertura
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-047/2020	95x	91.92%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-048/2020	115x	91.80%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-049/2020	288x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-050/2020	126x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-051/2020	97x	91.92%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-052/2020	148x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-053/2020	297x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-054/2020	230x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-055/2020	244x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-056/2020	187x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-057/2020	268x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-058/2020	164x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-059/2020	302x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-060/2020	255x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-061/2020	217x	94.55%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-062/2020	221x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-063/2020	148x	90.07%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-064/2020	96x	86.34%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-065/2020	43x	63.87%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-066/2020	68x	79.94%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-067/2020	92x	88.11%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-068/2020	115x	91.82%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-069/2020	30x	53.91%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-070/2020	41x	61.04%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-071/2020	68x	75.95%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-072/2020	78x	81.44%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-073/2020	98x	82.21%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-074/2020	101x	84.30%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-075/2020	64x	68.87%

Secuencia	Profundidad	Cobertura
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-076/2020	86x	88.06%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-077/2020	118x	90.86%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-078/2020	69x	83.79%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-079/2020	171x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-080/2020	97x	89.09%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-081/2020	55x	69.10%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-082/2020	86x	81.58%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-083/2020	308x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-084/2020	301x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-085/2020	156x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-086/2020	229x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-087/2020	219x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-088/2020	426x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-002/2021	425x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-003/2021	430x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-004/2021	436x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-005/2021	420x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-006/2021	434x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-007/2021	420x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-008/2021	422x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-009/2021	420x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-010/2021	421x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-011/2021	435x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-012/2021	427x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-013/2021	427x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-014/2021	424x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-015/2021	434x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-016/2021	138x	97.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-017/2021	364x	100.00%

Secuencia	Profundidad	Cobertura
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-018/2021	356x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-019/2021	346x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-020/2021	296x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-021/2021	317x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-022/2021	215x	97.39%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-023/2021	184x	97.26%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-024/2021	315x	98.25%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-025/2021	268x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-026/2021	365x	100.00%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-027/2021	370x	98.43%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-028/2021	487x	97.31%
hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-029/2021	335x	98.26%

7.3. Asignación de linajes

A cada una de las secuencias, depositadas en la base de datos *GISAID*, procedentes del estado de Nuevo León y reportadas hasta el 28 de febrero de 2021 por el Laboratorio de Infectología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), le fue asignado un linaje de acuerdo con los parámetros establecidos por el servidor web asignador de linajes, *Pangolin COVID-19 Lineage Assigner* versión 2021-05-27. Las 123 secuencias de SARS-CoV-2 reportadas se situaron en 30 linajes. 121 presentaron un cambio de un ácido aspártico por una glicina en la posición 614 de la proteína de espícula (tabla 19).

Tabla 19. Linajes a los que corresponden cada una de las secuencias obtenidas en la UANL y sustituciones aminoacídicas presentadas en cada caso.

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
A	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-065/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-070/2020*	NSP2 T85I Espícula D614G

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
A.2	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-001/2020	NSP4 F308Y NS3 G196V NS8 L84S N S197L
B.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-4479/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-019/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-046/2020*	NSP2 S248N NSP1 P323L Espícula D614G
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-003/2020	NSP12 P323L Espícula D614G NS3 Q57H
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-005/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-017/2020	NSP3 K19R NSP12 P323L Espícula D614G Espícula L5F N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-014/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-053/2020	NSP6 V149F NSP12 P323L Espícula D614G NS3 V29F N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-015/2020	NSP5 H246Y NSP12 P323L Espícula D614G NS3 Q57H
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-022/2020	NSP8 T141M NSP12 P323L NSP14 L493F Espícula D614G NS3 S165F N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-025/2020	NSP3 V521I NSP5 K90R NSP12 P323L Espícula D614G N R203K

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-036/2020	NSP6 M183I NSP12 P323L NSP13 S166L NSP14 L157F Espícula D614G N S194L N T166I
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-048/2020*	NSP2 T85I NSP3 M560I NSP6 M183I Espícula D614G Espícula V1230L NS3 Q57H
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-056/2020	NSP3 T819I NSP6 L37F NSP12 P323L NSP16 D179Y Espícula D614G Espícula T22I NS3 A23V NS3 H93Y N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-063/2020*	NSP6 M183I NSP14 L157F Espícula D614G N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-077/2020*	NSP6 V149F Espícula D614G NS3 V29F N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-078/2020*	Espícula D614G N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-079/2020	NSP5 K90R NSP6 V149F NSP12 P323L Espícula D614G NS3 V29F N S194L

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-086/2020	NSP2 T85I NSP12 P323L NSP13 S350L NSP16 P134S Espícula D614G NS3 Q57H NS8 S24L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-010/2021	NSP12 P323L NSP13 R392C Espícula D614G NS7a F65L NS7a A64H NS7a A66N N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-012/2021	NSP3 T720I NSP6 A117V NSP12P323L NSP13 V169F Espícula T859N Espícula D614G Espícula L452R Espícula Y144del Espícula F490L Espícula P9L NS7a V29L NS8 Q18stop
B.1.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-018/2020	NSP12 P323L Espícula D614G N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-021/2020	NSP2 T634I NSP8 T187I NSP12 P323L Espícula P681H Espícula D614G NS3 G44R NS8 L118V N G204R N T362I N R203K

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-047/2020*	NSP12 P323L Espícula D614G N G204R N L230F N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-069/2020*	Espícula D614G N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-080/2020*	NSP6 V149F NSP12 P323L Espícula D614G N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-004/2021	NSP2 H237Y NSP3 G145C NSP12 P323L NSP14 A504S Espícula D936H Espícula D614G NS3 S166L N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-024/2021	NSP2 I251M NSP5 A129V NSP12 P323L Espícula D614G Espícula T732A NS3 Q213K NS3 G172C N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-066/2020*	NSP2 S473L Espícula A1020S Espícula D614G N G204R N R203K

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-074/2020*	Espícula D614G N G204R N R203K
B.1.1.28	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-087/2020	NSP3 T1363I NSP12 P323L NSP14 H455Y Espícula A1020S Espícula D614G Espícula V1176F N G204R N D371N N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-015/2021	NSP2 A555V NSP2 P129S NSP3 P141S NSP12 P323L NSP14 Q22H Espícula S939F Espícula A1020S Espícula D614G Espícula V1176F N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-016/2021	NSP2 A555V NSP2 P129S NSP3 P141S NSP3 R586C NSP12 P323L NSP14 Q22H NSP16 K160R Espícula S939F Espícula A1020S Espícula D614G Espícula V1176F N G204R N R203K N S416L

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.222	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-028/2020	NSP2 I42V NSP6 L37F NSP12 P323L NSP14 P158S Espícula D614G Espícula H49Y Espícula G257S Espícula T732A N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-033/2020	NSP3 T936I NSP3 T1002I NSP4 T492I NSP12 P323L Espícula D614G Espícula A522V Espícula T732A Espícula A892S NS3 G174C NS8 I10V N P199S N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-054/2020	NSP3 H342Y NSP3 M560I NSP12 P323L NSP12 K91R Espícula D614G Espícula T732A N G204R N R203K

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.222	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-014/2021	NSP1 H110Y NSP2 I251M NSP3 T1275I NSP4 L18F NSP6 V84F NSP12 P323L NSP12 T259I Espícula D614G Espícula R21I Espícula G181V Espícula L18F Espícula T732A NS3 S171L N G204R N R203K
B.1.1.316	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-017/2021	NSP3 A231V NSP3 K384N NSP3 Q774R NSP8 D143G NSP12 P323L Espícula D614G Espícula Q677H Espícula T732S N G204R N P383L N R203K
B.1.1.329	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-020/2021	NSP2 A318V NSP2 A507T NSP2 K443Q NSP2 T634I NSP4 T96I NSP5 K90R NSP5 V18I NSP10 P86H NSP10 R134C NSP12 P323L Espícula D614G Espícula P681H N G204R N R203K NS7a T120I

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.344	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-2088/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-2098/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-007/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-008/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-009/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-012/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-013/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-049/2020	NSP12 P323L Espícula D614G M V70F N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-050/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-051/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-073/2020*	Espícula D614G M V70F N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-058/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-067/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-068/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-076/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-083/2020	NSP12 P323L Espícula D614G M V70F N A12S N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-082/2020*	NSP3 E177D NSP3 E1202G NSP8 T123I Espícula D614G M V70F N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-084/2020	NS6 Y49C NSP3 P109S NSP12 P323L NSP16 K24N Espícula A845S Espícula D614G M V70F N G204R N L139F N R203K

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.432	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-027/2020	NSP4 D217N NSP12 P323L Espícula D614G Espícula P807L NS3 S74F NS3 G174C N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-034/2020	NSP3 V1385I NSP4 S336L NSP12 P323L NSP12 A97V NSP15 M218I Espícula D614G NS3 S74F NS3 T89I N T24I N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-038/2020	NSP3 D135Y NSP12 P323L Espícula D614G Espícula V70F Espícula A522V Espícula L189F NS3 S74F NS3 G174C N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-072/2020*	Espícula D614G N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-085/2020	NSP2 A621V NSP2 G115C NSP6 V149F NSP12 P323L Espícula D614G NS3 S74F NS7a T11I N G204R N R203K

Linaje	Nombre de secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.432	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-002/2021	NSP3 D135Y NSP3 T1465I NSP12 P323L NSP14 S137I Espícula D614G Espícula Q1201H NS3 S74F NS3 G174C N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-013/2021	NSP3 P1044L NSP3 D1115G NSP3 D714G NSP12 P323L NSP13 D260Y NSP15 P205S Espícula D614G NS3 S74F NS3 G174C N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-029/2021	NSP3 D135Y NSP3 V1315del NSP3 I1320del NSP3 N1313del NSP3 S1314del NSP3 D1318del NSP3 P1316del NSP3 T1319del NSP3 W1317del NSP12 P323L NSP13 P53L Espícula D614G Espícula V70F Espícula A522V Espícula L189F NS3 S74F NS3 G174C N G204R N R203K

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.434	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-035/2020	NSP2 I513V NSP2 T44I NSP3 A1033T NSP3 Q180H NSP6 L207F NSP12 P323L NSP13 A296S NSP16 D26Y Espícula D614G Espícula D1168G N G204R N R203K NS3 E226G
B.1.1.518	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-071/2020*	NSP4 T204I NSP15 V320L Espícula D614G N G204R N R203K
B.1.1.519	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-029/2020	NSP2 S138L NSP3 G730S NSP3 P141S NSP4 T492I NSP6 I49V NSP9 T35I NSP12 P323L Espícula P681H Espícula D614G Espícula T478K Espícula T20I Espícula T732A N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-044/2020	NSP3 P141S NSP4 T492I NSP6 I49V NSP8 T187I NSP9 T35I NSP12 P323L NSP13 V348L Espícula P681H Espícula D614G Espícula T478K Espícula T732A NS7a

		N G204R N D377Y N R203K
--	--	-------------------------------

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.1.519	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-003/2021	NSP3 P141S NSP4 L353F NSP4 T492I NSP6 I49V NSP9 T35I NSP12 P323L Espícula P681H Espícula D614G Espícula T478K Espícula T732A N Q418H N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-006/2021	NSP3 C1392F NSP3 P141S NSP3 M1436I NSP4 T492I NSP6 I49V NSP9 T35I NSP12 P323L Espícula P681H Espícula D614G Espícula T478K Espícula T732A N G204R N R203K
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-019/2021	NSP3 P141S NSP4 T492I NSP6 I49V NSP9 T35I NSP12 P323L Espícula P681H Espícula D614G Espícula T478K Espícula T732A N G204R N R203K

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.2	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-023/2020	NSP2 T85I NSP5 L89F NSP10 A24S NSP12 P323L NSP14 N129D NSP16 R216C Espícula D614G NS3 Q57H NS3 G172V NS8 S24L N P364S N P67S N P199L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-039/2020	NSP2 T85I NSP3 H290Y NSP4 M458I NSP5 L89F NSP12 P323L NSP12 M668I NSP12 T739I NSP14 N129D NSP16 R216C Espícula G769V Espícula D614G Espícula K854N Espícula L5F Espícula Q677H NS3 Q57H NS3 G172V E D72G NS8 S24L N E378Q N A376V N P67S N P199L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-009/2021	NSP2 T85I NSP5 L89F NSP12 P323L NSP14 N129D NSP14 P203L NSP16 R216C Espícula D614G

		Espícula L18F NS3 Q57H NS3 G172V NS8 S24L N P67S N P199L
Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.36.10	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-075/2020*	N S194L N A208S
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-081/2020*	Espícula D614G N P20L N S194L
B.1.153	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-064/2020*	NSP6 L227F Espícula D614G
B.1.241	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-008/2021	NSP3 A644S NSP3 G1389S NSP3 K977Q NSP3 V1762F NSP12 P323L NSP13 K202Q NSP14 A360S Espícula D614G N S194L NS7a G38V NS7a Q94K
B.1.243	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-024/2020	NSP2 V381F NSP3 D807E NSP3 P1103L NSP12 P323L Espícula D614G Espícula A520S Espícula Q675H E P71S N S194L

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.243	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-031/2020	NSP2 S138L NSP3 T182I NSP8 P10S NSP12 P323L NSP14 A353V Espícula P681H Espícula D614G NS6 W27L N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-043/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-021/2021	NSP12 P323L NSP14 A353V Espícula P681H Espícula D614G Espícula V1228L N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-011/2021	NSP8 A194V NSP12 P323L NSP13 A296S NSP14 A353V Espícula P681H Espícula D614G NS7a G38V N A182S N D399Y N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-022/2021 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-023/2021	NSP3 A225V NSP3 T492I NSP12 P323L NSP14 A353V Espícula P681H Espícula D614G Espícula V1228L N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-026/2021	NSP2 R218C NSP12 P323L NSP14 A353V NSP15 P65S Espícula P681H Espícula D614G N S194L

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.243	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-028/2021	NSP12 P323L NSP14 A353V Espícula P681H Espícula D614G NS7a E41D NS8 R115C N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-042/2020	NSP2 T85I NSP2 T256I NSP3 T133I NSP6 V149F NSP12 K871R NSP12 P323L Espícula D614G Espícula I101del M K15N N H145Y N P199S NS3 Q57H NS8 E59G
B.1.366	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-059/2020	NSP2 T85I NSP2 T256I NSP4 A128V NSP4 T295I NSP12 K871R NSP12 P323L Espícula D614G Espícula I101del Espícula P384S N P199S NS3 Q57H
B.1.369	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-006/2020	NSP2 T85I NSP12 P323L NSP14 A119V Espícula D614G Espícula Q675H N S183Y NS3 Q57H

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.396	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-032/2020	NSP2 P129L NSP3 A1769V NSP4 L323I NSP12 P323L Espícula D614G N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-041/2020	NSP2 P129L NSP4 L360F NSP4 L323I NSP12 P323L Espícula D614G NS3 Q57H M H125Y N S193N N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-045/2020 hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-007/2021	NSP2 P129L NSP3 N1329S NSP4 L323I NSP12 P323L NSP15 Q196H Espícula D614G N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-055/2020	NSP2 P129L NSP4 L323I NSP12 P323L NSP14 D345G Espícula D614G N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-057/2020	NSP2 P129L NSP6 L37F NSP12 P323L Espícula D614G N S194L

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.396	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-060/2020	NSP2 P129L NSP4 L323I NSP12 P323L NSP14 P203L Espícula D614G Espícula T20I N S194L
B.1.427	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-025/2021	NSP2 I349T NSP2 T85I NSP4 S395T NSP12 P323L NSP13 D260Y NSP13 P53L Espícula D614G Espícula L452R Espícula S13I Espícula S1252F Espícula V320A Espícula W152C N T205I NS3 Q57H NS3 V225A
B.1.429	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-005/2021	NSP2 T85I NSP3 A1461T NSP8 Q24E NSP9 I65V NSP12 P323L NSP13 D260Y Espícula D614G Espícula L452R Espícula P26S Espícula S13I Espícula W152C N T205I NS3 E266D NS3 Q57H NS8 C102F

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.558	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-020/2020	NSP1 L27F NSP12 P323L NSP16 D102Y Espícula D614G NS3 T223I N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-026/2020	NSP2 K500N NSP3 V1253I NSP5 A94V NSP12 P323L Espícula D614G Espícula E309Q Espícula A701V Espícula L5F NS3 E239D NS3 R126S NS3 K21N N S194L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-040/2020	NSP1 L27F NSP12 P323L NSP16 D102Y Espícula D614G NS3 T223I N S194L N A152S
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-061/2020* hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-062/2020	NSP1 L27F NSP2 A306V NSP2 T223I NSP3 E92G NSP12 P323L NSP16 D102Y Espícula D614G NS3 T223I N S194L

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.576	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-037/2020	NSP1 R24C NSP2 T85I NSP7 L71F NSP8 R51L NSP12 P323L NSP13 S468L Espícula D614G E P71S N S197L NS3 Q57H
B.1.588	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-088/2020	NSP2 T85I NSP3 V404F NSP5 A129V NSP5 L89F NSP12 P323L Espícula D614G Espícula T20I N D401Y N M234I NS3 D155Y NS3 Q57H NS7b M1I NS8 S24L
B.1.595	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-030/2020	NSP2 S263T NSP3 D1761G NSP5 L89F NSP5 V261F NSP12 P323L Espícula D614G N S202G NS3 G172V NS3 Q57H NS3 T12I NS3 T151I NS8 S24L

Linaje	Secuencia	Sustituciones aminoacídicas
B.1.595	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-027/2021	NSP2 T85I NSP3 A480V NSP5 L89F NSP6 I49V NSP12 P323L NSP13 T153I NSP14 H82R Espícula D614G Espícula Q52R Espícula V1264L N P207S NS3 Q57H NS3 S171L NS8 S24L
B.1.609	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-004/2020	NSP12 P323L NSP15 V22L Espícula D614G Espícula P384L
	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-018/2021	NSP4 I140V NSP12 P323L NSP16 Q238H Espícula D614G Espícula G75V Espícula P681H Espícula Q779R N M234I NS3 A99S
B.1.610	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-126/2020	NSP12 P323L Espícula D614G
C.23	hCoV-19/Mexico/NLE-UANL-052/2020	NSP3 T428I NSP5 G15S NSP6 L37F NSP12 P323L NSP13 P234L Espícula D614G Espícula S940F N G204R N R203K

* Secuencias con cobertura menor a 95%.

Al 28 de febrero de 2021, en la base de datos *GISAID* se reportaban 99 secuencias correspondientes a genomas de longitud completa con cobertura mayor a 95%, circulando en el estado de Nuevo León entre el 16 de marzo de 2020 y el 29 de enero de 2021. De acuerdo con sus características genómicas, estas secuencias se situaron en 27 linajes, correspondiendo la mayoría con los linajes B.1, B.1.243 y B.1.1.344 (Figuras 18 y 19).

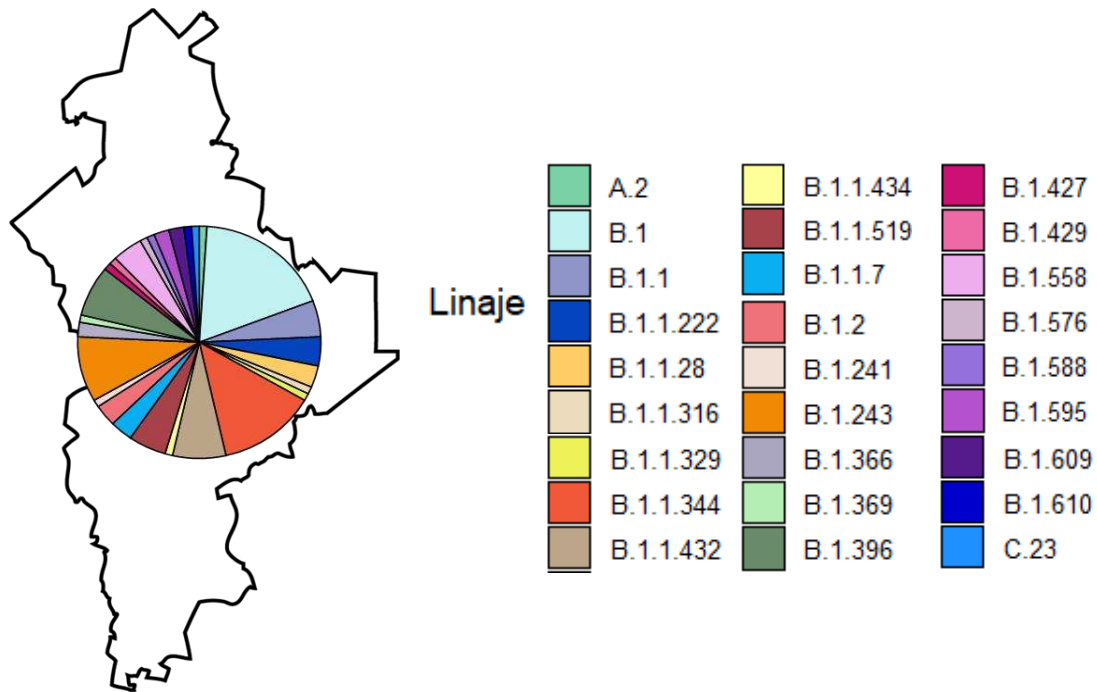


Figura 18. Linajes del virus SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León, al 29 de enero de 2021.

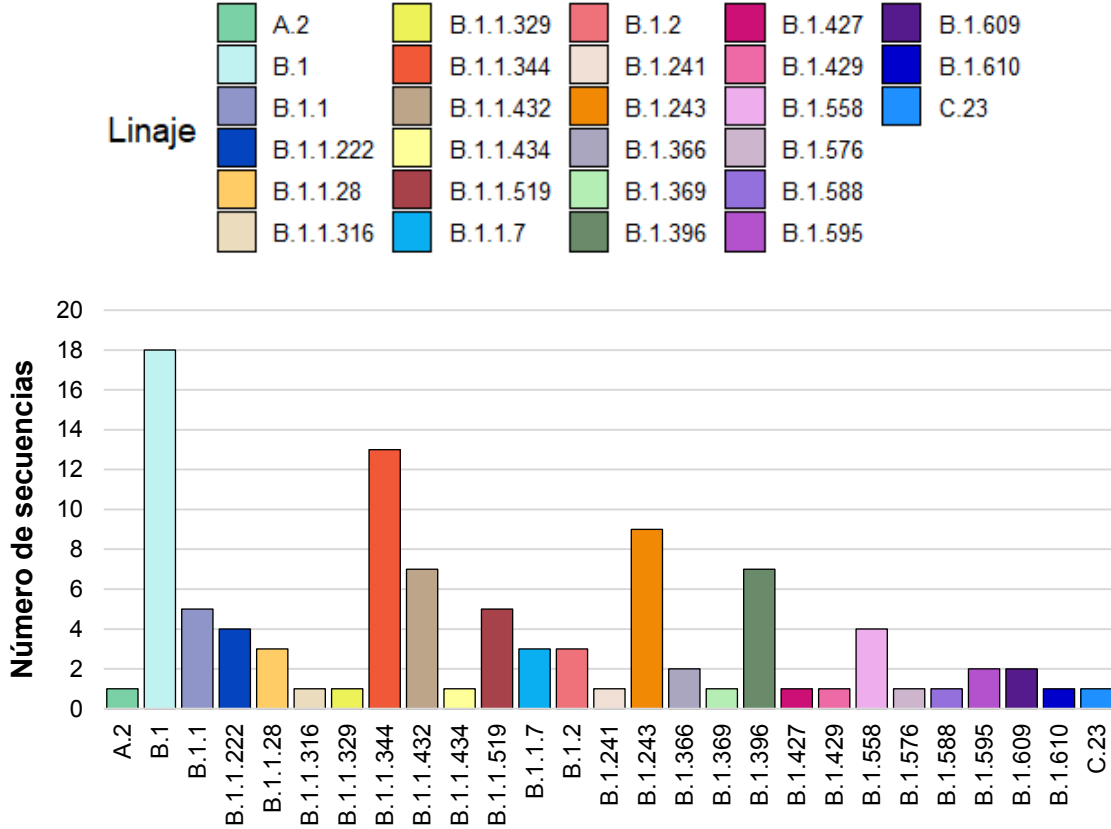


Figura 19. Número de secuencias provenientes del estado de Nuevo León, que corresponden a cada linaje del virus SARS-CoV-2.

Sólo se identificó una muestra cuya secuencia correspondió con una derivación del linaje A, al inicio de la epidemia en Nuevo León durante la tercera semana de marzo de 2020. Por otro lado, los linajes B.1 y B.1.609 se encontraron en la región desde el inicio de la contingencia sanitaria en el estado, hasta enero de 2021 (Figura 20).

Se encontraron circulando durante meses consecutivos, los linajes B.1.1 (julio-agosto y diciembre-enero), B.1.2 (noviembre-enero), B.1.243 (noviembre-enero), B.1.396 (julio-agosto y diciembre-enero), B.1.558 (junio-julio y noviembre-diciembre), B.1.1.222 (diciembre-enero), B.1.1.344 (mayo-agosto), B.1.1.432 (noviembre-enero) y B.1.1.519 (diciembre-enero). Por otro lado, sólo se reportó la existencia de una secuencia representativa para el caso de los linajes B.1.1.316,

B.1.1.329, B.1.1.434, B.1.241, B.1.369, B.1.427, B.1.429, B.1.576, B.1.588, B.1.610 y C.23. Finalmente, los linajes B.1.1.7, B.1.1.28, B.1.369 y B.1.595 estuvieron representados por dos o más secuencias que se encontraron circulando durante un mismo mes en el estado (Figura 20).

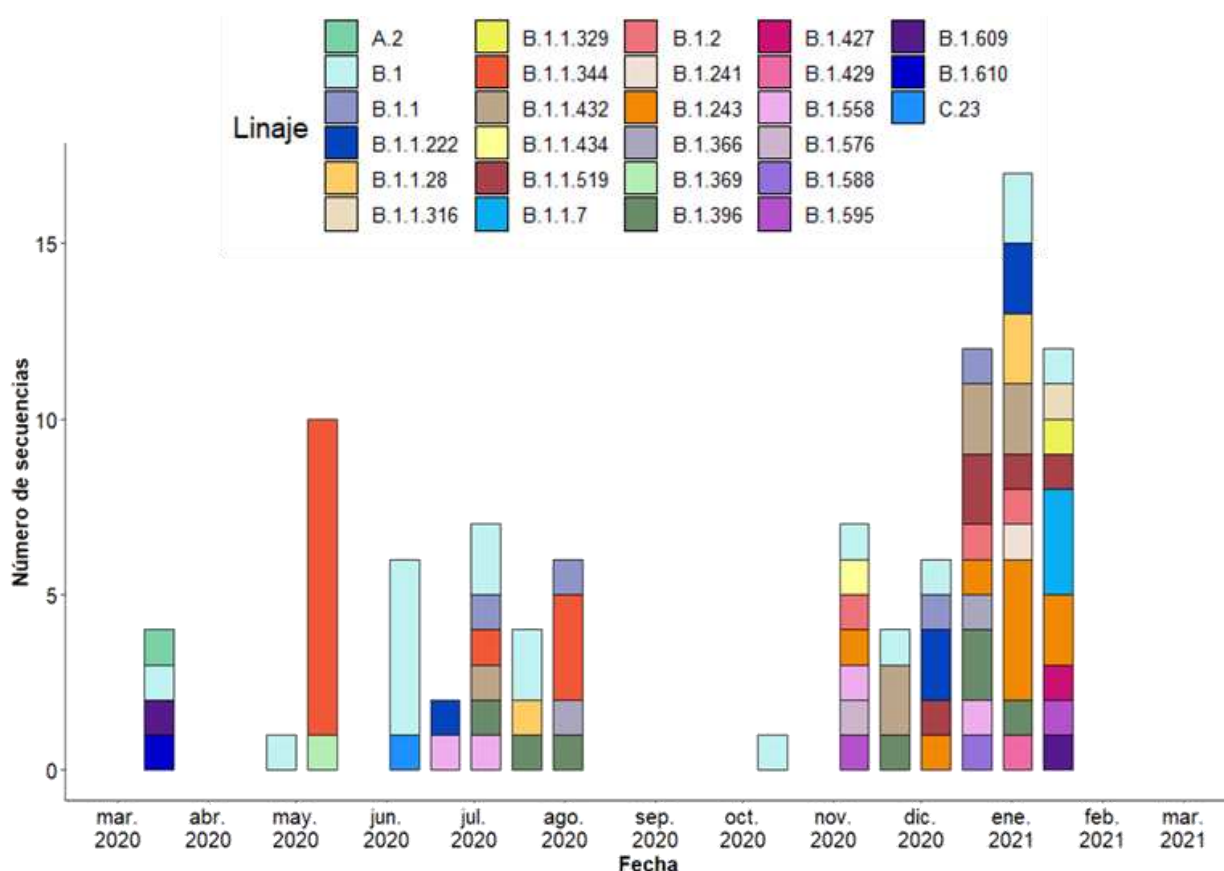


Figura 20. Linajes del SARS-CoV-2 que circulan en Nuevo León a lo largo del tiempo.

7.4. Análisis filogenético de máxima verosimilitud

Se analizaron 416 secuencias de genomas de longitud completa de SARS-CoV-2. 312 de las secuencias utilizadas fueron obtenidas en México y entre ellas, se encontraron 99 genomas completos provenientes del estado de Nuevo León. Las muestras a partir de las cuales se obtuvieron las secuencias utilizadas fueron recolectadas entre diciembre de 2019 y febrero de 2021.

El árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido a partir de los genomas de SARS-CoV-2, indicó que, las secuencias correspondientes al estado de Nuevo León

se encontraron tanto agrupadas en los mismos clústeres, como dispersas a lo largo del árbol filogenético, intercaladas con secuencias virales muestreadas en otros estados de México y en el extranjero (Figura 21). Todos los clados en los que se situaron las secuencias obtenidas en el presente análisis contaron con valores confiables de soporte de clado de acuerdo con las pruebas de UFBoot y SH-*alt*.

En la representación gráfica, destaca la presencia de tres amplios clústeres que se componen esencialmente por secuencias que se encontraron circulando en Nuevo León durante una temporalidad similar (Figura 21).

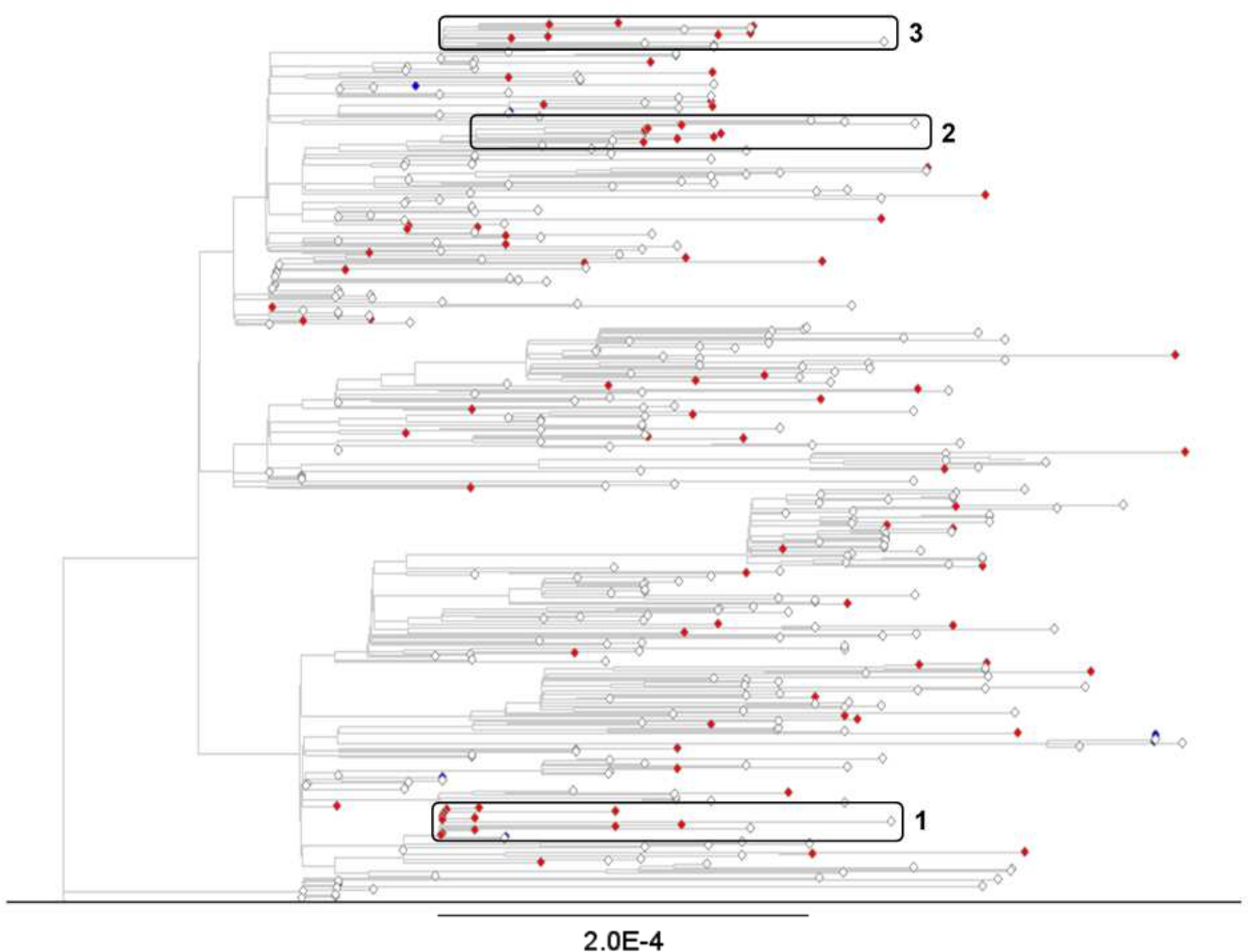


Figura 21. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con 416 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (UANL: rojo, InDRE: azul). Los clústeres mencionados en el texto se encuentran resaltados en rectángulos negros.

7.5. Análisis evolutivo bayesiano

7.5.1. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado

Se llevó a cabo un análisis evolutivo bayesiano, utilizando las 416 secuencias de genomas de longitud completa de SARS-CoV-2, empleadas para llevar a cabo el análisis filogenético de máxima verosimilitud.

El árbol filogenético de máxima credibilidad de clado obtenido a partir del análisis, resultó ser altamente congruente con el árbol filogenético de máxima verosimilitud reportado previamente. Las probabilidades posteriores presentadas por los clados del árbol filogenético en los que se situaron secuencias provenientes del estado de Nuevo León fueron todas mayores a 0.9 (Figura 22).

Las secuencias obtenidas en Nuevo León se encontraron tanto intercaladas con secuencias muestreadas fuera del estado, como formando agrupaciones entre sí en los mismos clústeres. Por otro lado, los clústeres destacados en el árbol filogenético de máxima verosimilitud pudieron ser identificados nuevamente tras la realización del análisis evolutivo bayesiano. El primer clúster, se encuentra principalmente conformado por virus presentes en el estado entre el 19 y el 23 de mayo de 2020. En el mismo clúster se observa la presencia de secuencias encontradas en Nuevo León durante los meses siguientes, entre el 15 de julio y el 14 de agosto de 2020. Además, las secuencias neolonesas ubicadas en este clúster se encuentran agrupadas también con un genoma proveniente de la Ciudad de México, con un genoma de Tamaulipas, y con uno publicado por el Laboratorio de Salud Pública del Condado de Humboldt en California, Estados Unidos, que circularon durante los meses de agosto, octubre y junio, respectivamente. Todas las secuencias ubicadas en este clúster corresponden con el linaje B.1.1.344 (Figuras 22 y 23).

Por otro lado, en el segundo clúster se encontraron secuencias presentes en el estado de Nuevo León del 18 de noviembre de 2020 al 29 de enero de 2021, que se agruparon con virus provenientes de la Ciudad de México, de los estados de Tamaulipas, Baja California, Zacatecas y Campeche en México, y de los países de Inglaterra y Estados Unidos que circularon entre abril de 2020 y febrero de 2021.

En este grupo se ubican las secuencias correspondientes al linaje B.1.243 (Figuras 22 y 23).

Finalmente, el tercer clúster se conforma por 16 secuencias, nueve de ellas correspondientes a virus circulando en el estado de Nuevo León entre el 07 de julio de 2020 y el 08 de enero de 2021. En este clúster se encuentran secuencias provenientes de la Ciudad de México, de Aguascalientes y de los estados de Florida, Texas y California, Estados Unidos. Las secuencias ubicadas en este clado se encontraron circulando entre julio de 2020 y enero de 2021 (Figura 22).

A partir del árbol de máxima credibilidad de clado, se estimaron los tiempos de aparición de los ancestros comunes más recientes para los clústeres constituidos principalmente por secuencias de Nuevo León, siendo las fechas estimadas el 30 de marzo de 2020 para el primer clúster, 10 de agosto de 2020 para el segundo clúster y 28 de abril de 2020 para el tercero.

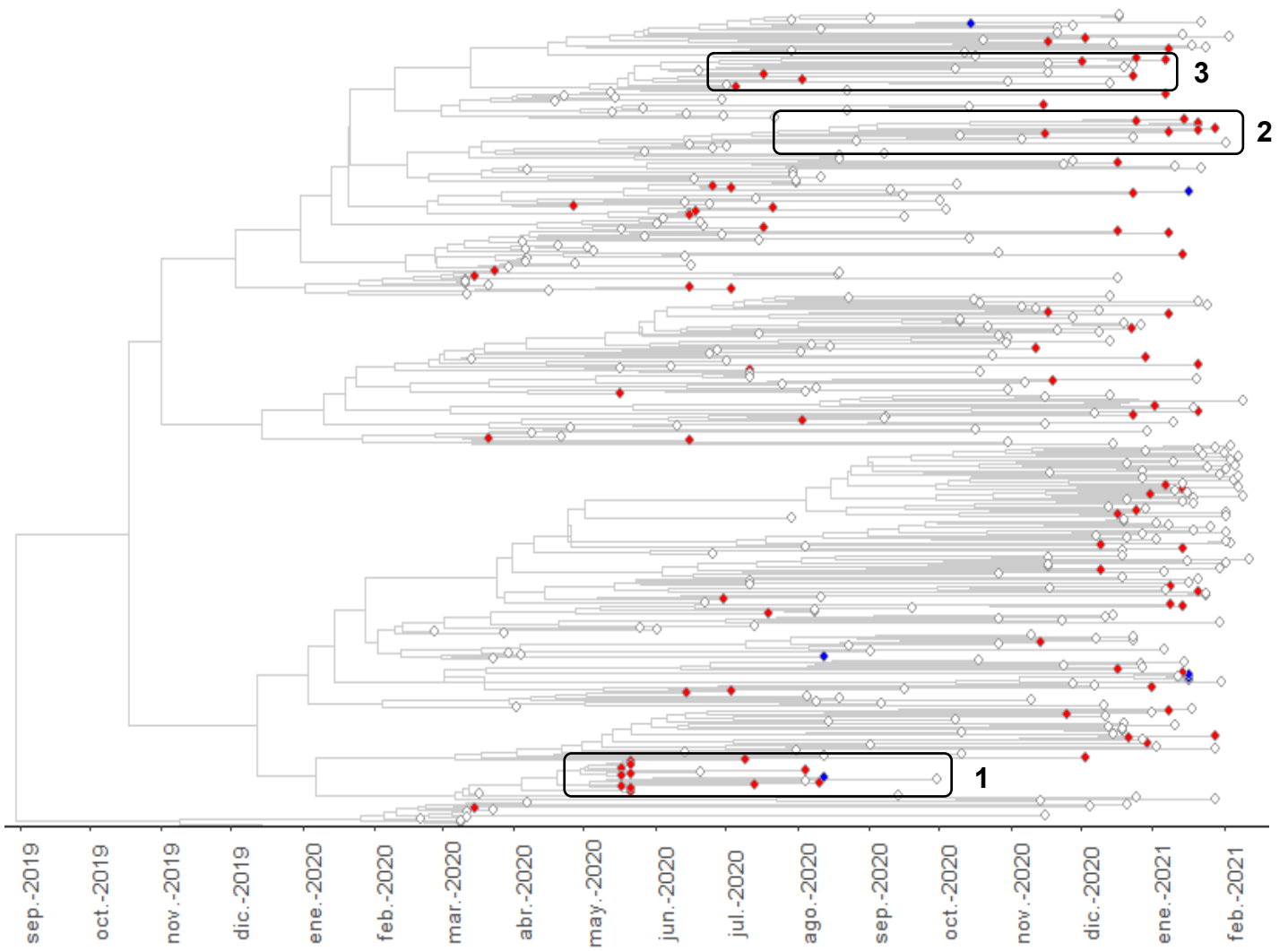


Figura 22. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 416 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (UANL: rojo, InDRE: azul). Los clados de Nuevo León más grandes están resaltados por rectángulos negros.

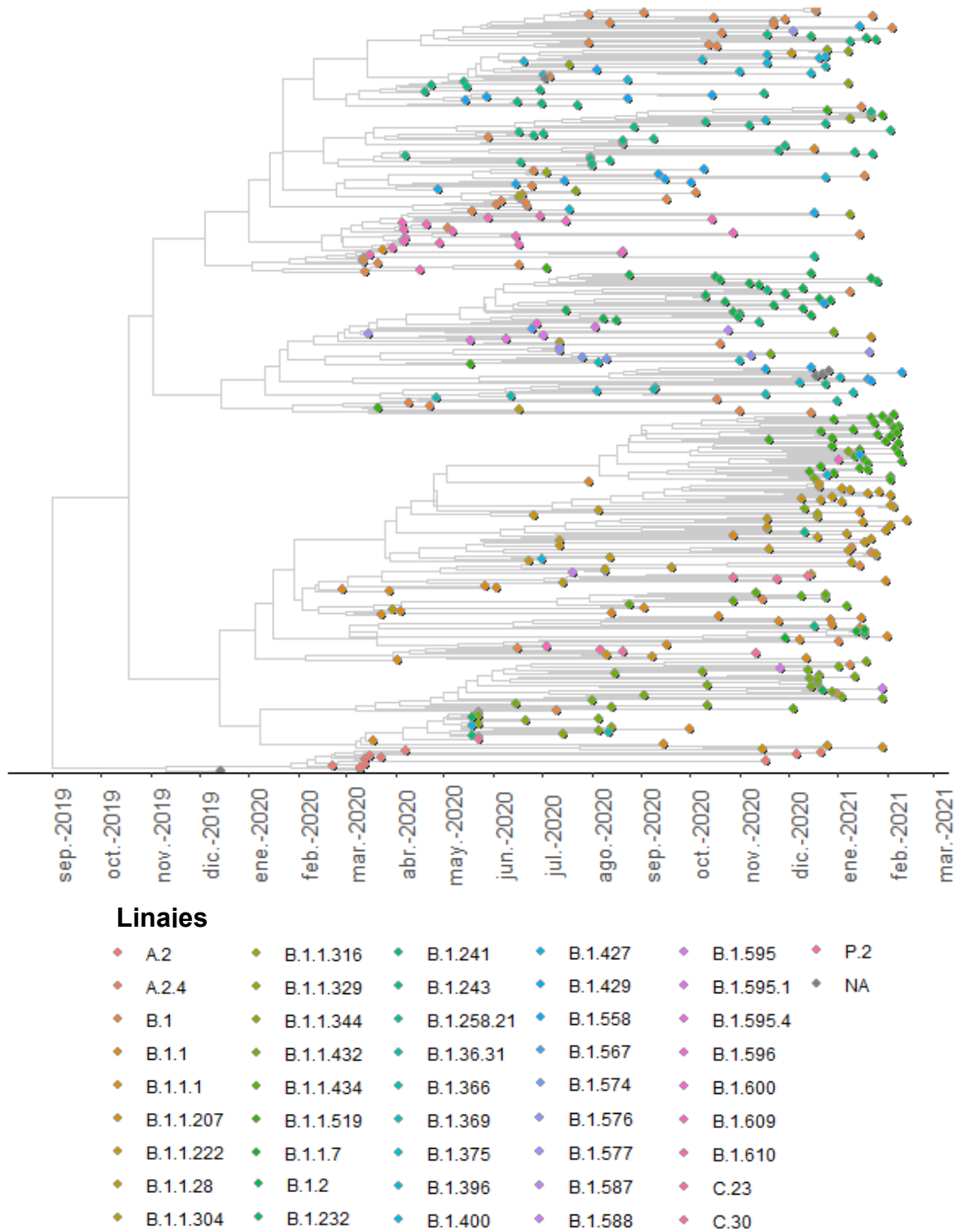


Figura 23. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 416 secuencias internacionales. Los linajes a los que corresponden cada una de las secuencias, se destacan con distintos colores.

7.5.2. Eventos de transmisión del virus SARS-CoV-2 en Nuevo León

Se llevó a cabo la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus SARS-CoV-2 en el estado de Nuevo León, utilizando 414 secuencias de genomas de longitud completa de SARS-CoV-2. De las secuencias utilizadas, 312 fueron obtenidas en México y entre ellas, se encontraron 99 genomas completos provenientes del estado de Nuevo León. Las muestras a partir de las cuales se obtuvieron las secuencias utilizadas fueron recolectadas entre el 22 de febrero de 2020 y el 13 de febrero de 2021. En la figura 24, las secuencias que correspondieron con introducciones procedentes de otros estados y del extranjero, se encuentran resaltadas en color anaranjado. Por otro lado, los genomas que se agruparon en clústeres asociados con eventos de transmisión comunitaria se encuentran destacadas en color amarillo. 70 de las secuencias obtenidas fueron identificadas como introducciones procedentes de otras locaciones y las 22 secuencias restantes se asociaron con eventos de transmisión comunitaria. Las seis secuencias reportadas por el IN-DRE correspondieron con introducciones.

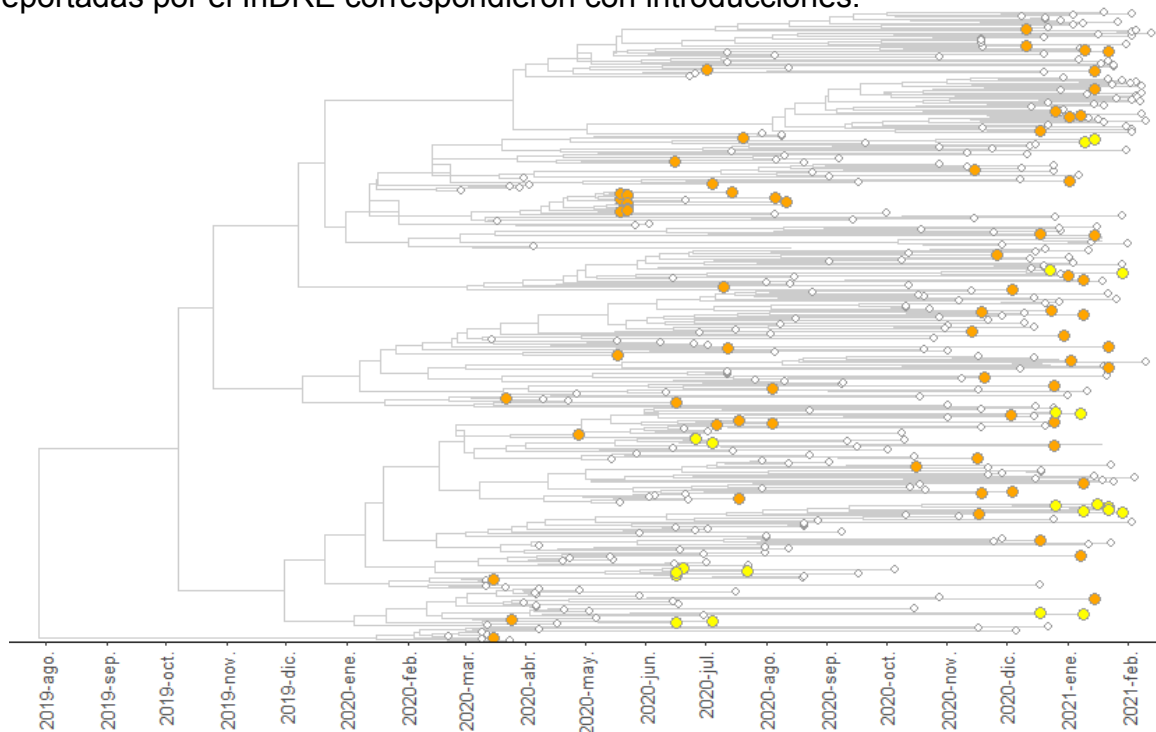


Figura 24. Árbol filogenético de máxima credibilidad de clado con 414 secuencias internacionales, 99 de las cuales son procedentes de Nuevo León (Introducciones: anaranjado, transmisión comunitaria: amarillo).

7.6. Linajes de interés y de preocupación circulando en México

Al 28 de febrero de 2021, en la base de datos *GISAID* se reportaban dos linajes de interés (B.1.427 y B.1.429) y dos linajes de importancia (B.1.1.7 y P.1) circulando por territorio mexicano. Particularmente, los linajes de interés fueron encontrados circulando en el estado de Nuevo León durante el mes de enero de 2021 (Figura 24). Además, el 09 de febrero de 2021, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) publicó tres secuencias de longitud completa provenientes de Nuevo León, que correspondieron al linaje de preocupación B.1.1.7 y que estuvieron circulando en la región durante la segunda mitad de enero de 2021 (Figura 24).

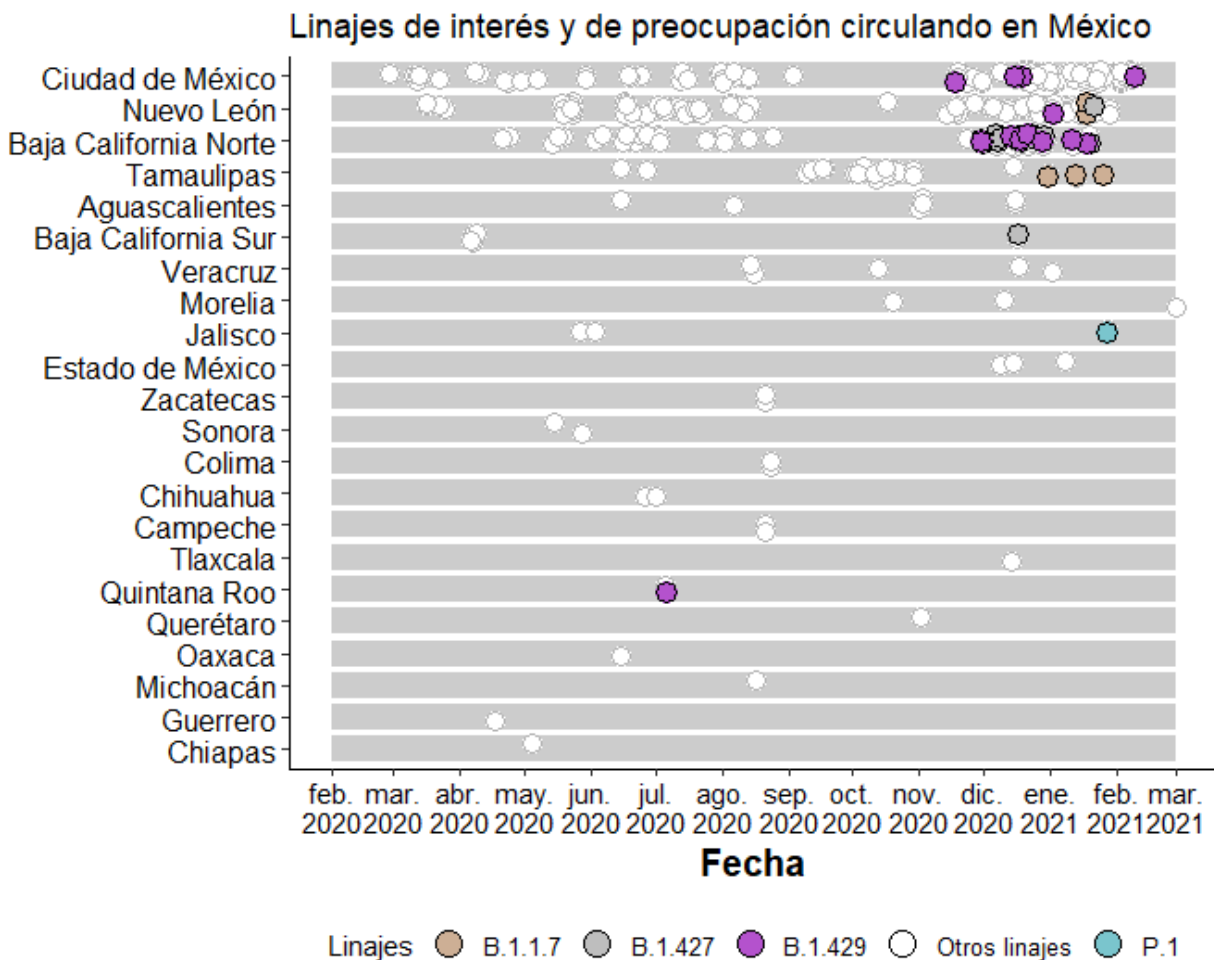


Figura 25. Linajes de interés y de preocupación que se encontraron circulando en México al 28 de febrero de 2021.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

La secuenciación viral proporciona información crítica sobre la transmisión y la evolución del virus del SARS-CoV-2. Específicamente, la secuenciación en nanoporo, desarrollada por *Oxford Nanopore Technologies*, resulta en un valor de precisión por encima de ~60x de profundidad de cobertura, lo que garantiza la idoneidad para el análisis del genoma del SARS-CoV-2 (Bull et al., 2020). De acuerdo con lo anterior, a partir del presente trabajo se obtuvieron 112 secuencias del virus del SARS-CoV-2 que presentaron valores de profundidad óptimos para el estudio del virus (64x-487x). Las cuatro secuencias restantes, mostraron valores de profundidad que oscilaron entre 30x y 55x, situación que podría atribuirse a que las muestras a partir de las cuales se llevó a cabo la secuenciación se obtuvieron durante los primeros meses de la pandemia (abril-julio de 2020), pero fueron sometidas al protocolo de secuenciación hasta finales de enero de 2021, por lo que se cree que los ARN virales pudieron haberse degradado mientras las muestras se encontraban almacenadas.

Por otro lado, las secuencias obtenidas a partir de este estudio presentaron porcentajes de cobertura que se situaron entre 53.91% y 100%. Los porcentajes de cobertura menores al 95%, presentados por 14 de las secuencias nucleotídicas, podrían estar asociados con que la mayoría de las muestras a partir de las cuales se obtuvieron las secuencias, presentaron valores de Ct mayores a 25, lo cual de acuerdo con lo establecido puede resultar en una cobertura del genoma deficiente (Pillay et al., 2020).

Los resultados indican que las 123 secuencias del virus del SARS-CoV-2, reportadas circulando en Nuevo León, se situaron en 30 linajes virales. Los genomas que presentaron longitud completa (cobertura $\geq 95\%$), se ubicaron en 27 linajes. Lo anterior, implica una gran diversidad genética en la región, lo que podría atribuirse a múltiples introducciones procedentes tanto del resto del territorio nacional, como del extranjero.

La literatura establece que una variante del SARS-CoV-2 que lleva el cambio de aminoácidos D614G en la proteína de espícula, se ha convertido en la forma del virus más prevalente en la pandemia mundial y está asociada con el linaje B.1 (Korber et al., 2020), (Volz et al., 2020). Lo anterior coincide parcialmente con lo observado en los resultados obtenidos, ya que, 121 de las 123 secuencias del SARS-CoV-2 reportadas circulando en Nuevo León, presentaron el cambio mencionado, sin embargo, la mutación se observó tanto en secuencias pertenecientes al linaje B.1 y sus derivaciones, como en secuencias correspondientes al linaje A. Lo anterior podría atribuirse a que las secuencias ubicadas en el linaje A, presentaron profundidad menor a 45x y coberturas que no superaron el 65%, por lo que no se puede asegurar que hayan presentado la mutación en conflicto.

Por otro lado, la mayoría de las secuencias obtenidas en este proyecto que presentaron una longitud completa, correspondieron a los linajes B.1, B.1.243, B.1.1.344 y B.1.1.396. Se reporta que, hasta la fecha, el linaje B.1 es el linaje que predomina mundialmente (Volz et al., 2020). Los resultados mostrados indican que 18 de las 97 secuencias encontradas circulando en Nuevo León, se ubicaron en este linaje, lo que lo señala que, al 29 de enero de 2021, este era también el linaje predominante en el estado.

La literatura establece que linaje A del virus del SARS-CoV-2 es mucho menos frecuente que el linaje B (Phan et al., 2021). Lo anterior pudo ser observado en los resultados obtenidos, ya que sólo se identificó una secuencia de longitud completa que correspondió con una derivación del linaje A (A.2), circulando al inicio de la epidemia en Nuevo León. Por lo anterior, se cree que no surgió una cadena de transmisión en la comunidad a partir de virus que corresponden a este linaje. De acuerdo con la información obtenida a partir de la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus del SARS-CoV-2 en Nuevo León, se determinó que la secuencia identificada como parte de la derivación A.2, correspondió con una introducción procedente de otros estados o del extranjero.

Los linajes B.1, B.1.243, B.1.1.344 y B.1.1.396, se encontraron circulando por el estado de Nuevo León durante meses consecutivos. La presencia de los linajes B.1.243, B.1.1.344 y B.1.1.396 en los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud y de máxima credibilidad de clado destaca debido a que éstos se identifican como tres amplios clústeres en ambos casos, compuestos esencialmente por secuencias que se encontraron circulando en Nuevo León durante una temporalidad similar.

De acuerdo con la información obtenida a partir del árbol filogenético de máxima credibilidad de clado, el clúster en el que se ubican las secuencias identificadas como parte del linaje B.1.1.344, se encuentra principalmente conformado por virus que estuvieron circulando en Nuevo León durante los meses de mayo a agosto de 2020. De acuerdo con la información dada por la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus SARS-CoV-2 en el estado, se determinó que, a pesar de que todas las secuencias del virus incluidas en este clúster presentaron sustituciones aminoacídicas coincidentes (S D614G, M V70F, N G204R y N R203K), éstas tienen su origen en introducciones provenientes de viajes internacionales o interestatales. La literatura establece que el 60% de las secuencias reportadas del linaje B.1.1.344 se han encontrado circulando en territorio estadounidense, el 35% en territorio mexicano y el 5% restante en los países de Filipinas, Australia y Corea del Sur (O'Toole, et al., 2020). Esta información coincide con los resultados, ya que estos indican que las secuencias neolonesas ubicadas en este clado se encontraron relacionadas con genomas que se encontraron circulando en los estados de Nueva York y California, Estados Unidos durante los meses de marzo y de junio de 2020, respectivamente. Por otro lado, en el mismo clado se encontraron también secuencias que estuvieron circulando en la Ciudad de México y en el estado de Tamaulipas durante los meses de agosto y octubre de 2020, respectivamente. Por lo anterior, estas locaciones podrían sugerirse como el posible origen de algunas de las introducciones en el estado de Nuevo León.

El árbol filogenético de máxima credibilidad de clado indica que en el clúster en el que se situaron las secuencias catalogadas como pertenecientes al linaje B.1.243, se encontraron virus que estuvieron circulando en Nuevo León del 18 de noviembre

de 2020 al 29 de enero de 2021. Con respecto a las secuencias agrupadas en este clúster, la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus indicó que éstas se encuentran asociadas con eventos de transmisión comunitaria en el estado de Nuevo León. Todas las secuencias presentaron las sustituciones aminoacídicas S D614G y N S194L que, de acuerdo con lo establecido, son cambios definitorios de linaje (Skidmore et al., 2021). Además, la mayoría de las secuencias del linaje B.1.243, obtenidas en este trabajo, presentaron el cambio S P681H, cuyas implicaciones para la transmisión y la virulencia no están claras (Lasek-Nesselquist, et al., 2021). Según la literatura, los genomas del linaje que mostraron esta sustitución aminoacídica representaron la variante predominante del SARS-CoV-2 en Nueva York durante noviembre de 2020 (Lubinski et al., 2021). Coincidente con lo anterior, los árboles filogenéticos obtenidos indicaron que los genomas de Nuevo León situados en el clúster del linaje B.1.243, se agruparon también con una secuencia procedente del estado de Nueva York, que se encontró circulando el 26 de diciembre de 2020.

La literatura establece que el linaje B.1.396 está catalogado como un linaje estadounidense (O'Toole, et al., 2020). Los resultados obtenidos indican que el clado en el que se encuentran las secuencias correspondientes a este linaje en los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud y de máxima credibilidad de clado, presenta también virus provenientes de los estados de Florida, Texas y California, Estados Unidos. Dos de las secuencias obtenidas que se ubicaron en este clúster, presentaron exactamente las mismas sustituciones aminoacídicas y se encontraron circulando en el estado de Nuevo León durante fechas cercanas (27 de diciembre de 2020 y 08 de enero de 2021). A partir de la reconstrucción de los eventos de transmisión del virus, se determinó que estas mismas secuencias se encontraron asociadas con eventos de transmisión comunitaria en el estado. El resto de las secuencias agrupadas en el clúster correspondiente al linaje B.1.396, se relacionaron con introducciones internacionales o interestatales.

Al 28 de febrero de 2021, en la base de datos *GISAID* se reportaban dos linajes de interés (B.1.427 y B.1.429) y un linaje de preocupación (B.1.1.7) circulando por el

estado de Nuevo León. Se establece que, en comparación con otros linajes, el B.1.427 y el B.1.429 del SARS-CoV-2, podrían ser más infecciosos, causar una enfermedad más grave y ser menos susceptibles a anticuerpos monoclonales neutralizantes (Martin et al., 2021). Por otro lado, el linaje B.1.1.7, se caracteriza por la acumulación de un gran número de mutaciones en la proteína de espícula, que conducen a reducciones significativas en la potencia de neutralización de anticuerpos monoclonales específicos, de sueros convalecientes y de sueros provocados por Pfizer / BioNTech BNT162b2 o Moderna mRNA-1273 (McCallum et al., 2021).

Finalmente, se determinó que fueron identificados distintos linajes de SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León, sin embargo, estos no fueron diferentes a los importados de otros países y no surgieron a partir de transmisión comunitaria a través del tiempo.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 92 secuencias que presentaron longitudes de genoma completo del virus del SARS-CoV-2 (cobertura $\geq 95\%$), a partir de muestras de pacientes recolectadas en el estado de Nuevo León.
- Se identificó la variabilidad genética del virus en el estado de Nuevo León. De acuerdo con las características genómicas presentadas por las secuencias obtenidas, éstas se situaron en 27 linajes que se encontraron circulando en el estado entre el 16 de marzo de 2020 y el 29 de enero de 2021, siendo más prevalentes los linajes B.1, B.1.1.344, B.1.243 y B.1.396.
- Se logró la reconstrucción de la dispersión viral del virus del SARS-CoV-2 en Nuevo León. Setenta de las secuencias obtenidas fueron identificadas como introducciones procedentes de otras locaciones y las 22 secuencias restantes se asociaron con eventos de transmisión comunitaria. Se determinó que los linajes B.1.1.344 y B.1.396, estuvieron principalmente asociados con introducciones internacionales o interestatales, mientras que los linajes B.1, B.1.558, B.1.1.28, B.1.1.432 y B.1.243, se relacionan con eventos de transmisión comunitaria, ya que se encontraron formando parte de cadenas de transmisión.
- Se identificaron distintos linajes de SARS-CoV-2 circulando en el estado de Nuevo León, sin embargo, estos no fueron diferentes a los importados de otros países y no surgieron a partir de transmisión comunitaria a través del tiempo.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

1. Abduljali, J. M., & Abduljali, B. M. (2020). *Epidemiology, genome and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view*. *New Microbes and New Infections*, 100672.
2. Bielejec, F. et al. (2016). *Spread3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes*. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2167–9.
3. Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T. Y., Perry, B., Castoe, T., ... & Robertson, D. L. (2020). *Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic*. *bioRxiv*.
4. Bull, R. A., Adikari, T. N., Ferguson, J. M., Hammond, J. M., Stevanovski, I., Beukers, A. G., ... & Deveson, I. W. (2020). Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nature communications*, 11(1), 1-8.
5. Candido, D. S., Claro, I. M., de Jesus, J. G., Souza, W. M., Moreira, F., Dellicour, S., Mellan, T. A., du Plessis, L., Pereira, R., Sales, F., Manuli, E. R., Thézé, J., Almeida, L., Menezes, M. T., Voloch, C. M., Fumagalli, M. J., Coletti, T. M., da Silva, C., Ramundo, M. S., Amorim, M. R., ... Faria, N. R. (2020). *Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil*. *Science* (New York, N.Y.), 369(6508), 1255–1260.
6. Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). *Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan*. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 221-236.
7. Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). *Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis*. *Journal of medical virology*, 92(4), 418-423.
8. Chu, Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., ... Poon, L. L. M. (2020). *Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia*. *Clinical Chemistry*.

9. Comité internacional de taxonomía de virus (2019). "Taxonomía de virus: versión 2019". Consultado el 08 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>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., Peiris, M., ... Drosten, C. (2020). *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 25(3), 2000045.
10. Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). *Origin and evolution of pathogenic coronaviruses*. Nature reviews Microbiology, 17(3), 181-192.
11. De Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. Nature Reviews Microbiology, 14(8), 523–534. doi:10.1038/nrmicro.2016.81
12. Deng, X., Gu, W., Federman, S., du Plessis, L., Pybus, O. G., Faria, N. R., Wang, C., Yu, G., Bushnell, B., Pan, C. Y., Guevara, H., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Servellita, V., Hsu, E., Miller, S., Bedford, T., Greninger, A. L., Roychoudhury, P., ... Chiu, C. Y. (2020). *Genomic surveillance reveals multiple introductions of SARS-CoV-2 into Northern California*. Science (New York, N.Y.), 369(6503), 582–587.
13. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México. *Coronavirus (COVID-19): algoritmos, avisos epidemiológicos y lineamiento*. México: Secretaría de Salud, 2020 [citado febrero 2021]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/618880/Comunicado Tecnico Diario COVID-19 2021.02.28.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/618880/Comunicado_Tecnico_Diario_COVID-19_2021.02.28.pdf)
14. Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 29, 1969–1973.
15. Eckert, A., & Higgins, D. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) illustration.

16. Enjuanes, L., Almazán, F., Sola, I., & Zuñiga, S. (2006). *Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 211-230.
17. Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., De Groot, R. J., Cowley, J. A., Ziebuhr, J., & Snijder, E. J. (2008). *Nidovirales*. *Encyclopedia of virology*, 419.
18. Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). *Bat Coronaviruses in China*. *Viruses*, 11(3), 210.
19. Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). *Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes*. *Trends in Microbiology*, 25(1), 35–48.
20. Ghosh, A. K., Brindisi, M., Shahabi, D., Chapman, M. E., & Mesecar, A. D. (2020). *Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and Covid-19 Therapeutics*. *ChemMedChem*.
21. Gobierno del estado de Nuevo León (2020). *Casos confirmados COVID-19*. Secretaría de salud.
22. Hsieh, Y. C., Li, H. C., Chen, S. C., & Lo, S. Y. (2008). *Interactions between M protein and other structural proteins of severe, acute respiratory syndrome-associated coronavirus*. *Journal of biomedical science*, 15(6), 707–717.
23. Hussain, S., Pan, J., Chen, Y., Yang, Y., Xu, J., Peng, Y., Wu, Y., Li, Z., Zhu, Y., Tien, P., & Guo, D. (2005). *Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. *Journal of virology*, 79(9), 5288–5295.
24. Jaimes, J. A., André, N. M., Chappie, J. S., Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2020). *Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop*. *Journal of molecular biology*, 432(10), 3309–3325.
25. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. (2017). *MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization*. *Brief. Bioinform.*
26. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., ... & 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.
27. Lasek-Nesselquist, E., Pata, J., Schneider, E., & George, K. S. (2021). A tale of three SARS-CoV-2 variants with independently acquired P681H mutations in New York State. medRxiv.
28. Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). *Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses*. *Nature microbiology*, 5(4), 562-569.
29. Li, H. & Durbin, R. (2009). *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. *Bioinformatics* 25, 1754–1760
30. Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). *Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.
31. Lu, J., du Plessis, L., Liu, Z., Hill, V., Kang, M., Lin, H., ... & McCrone, J. T. (2020). *Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China*. *Cell*.
32. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Bi, Y. (2020). *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. *The Lancet*, 395(10224), 565-574.
33. Lubinski, B., Tang, T., Daniel, S., Jaimes, J. A., & Whittaker, G. (2021). Functional evaluation of proteolytic activation for the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7: role of the P681H mutation. bioRxiv.
34. Martin Webb, L., Matzinger, S., Grano, C., Kawasaki, B., Stringer, G., Bankers, L., & Herlihy, R. (2021). Identification of and Surveillance for the SARS-CoV-2 Variants B.1.427 and B.1.429 - Colorado, January-March 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(19), 717–718.
35. Masters, P. S., & Perlman, S. (2013). Chapter 28: Coronaviridae. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 825-79.
36. McCallum, M., Bassi, J., De Marco, A., Chen, A., Walls, A. C., Di Iulio, J., ... & Velesler, D. (2021). *SARS-CoV-2 immune evasion by variant B. 1.427/B. 1.429*. BioRxiv.

37. Organización Mundial de la Salud. (2021). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): reporte de situación*.
38. O'Toole, A., Scher, E., Underwood, A., Jackson, B., Hill, V., McCrone, J. T., ... & Rambaut, A. (2020). Pangolin: lineage assignment in an emerging pandemic as an epidemiological tool.
39. Phan, M. V., Ssewanyana, I., Semanda, P., Nansumba, H., Dhaala, B., Nabadda, S., ... & Cotten, M. (2021). A SARS-CoV-2 lineage A variant (A.23.1) with altered spike has emerged and is dominating the current Uganda epidemic.
40. Pasternak, A. O., van den Born, E., Spaan, W. J., & Snijder, E. J. (2001). *Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis*. The EMBO journal, 20(24), 7220–7228.
41. Pillay, S., Giandhari, J., Tegally, H., Wilkinson, E., Chimukangara, B., Lessells, R., Moosa, Y., Mattison, S., Gazy, I., Fish, M., Singh, L., Khanyile, K. S., San, J. E., Fonseca, V., Giovanetti, M., Alcantara, L. C., Jr, & de Oliveira, T. (2020). Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. *Genes*, 11(8), 949.
42. Quick, J. (2020). *nCoV-2019 sequencing protocol*. protocols.io
43. Rambaut, A., Holmes, E. C., Hill, V., O'Toole, A., McCrone, J., Ruis, C., ... & Pybus, O. (2020). *A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology*. bioRxiv.
44. Shu, Y. & McCauley, J. (2017). GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality. *Euro Surveill.* 22, 30494.
45. Skidmore, P. T., Kaelin, E. A., Holland, L. A., Maqsood, R., Wu, L. I., Mellor, N. J., ... & Lim, E. S. (2021). Emergence of a SARS-CoV-2 E484K variant of interest in Arizona. *medRxiv*.
46. Snijder, E. J., Decroly, E., & Ziebuhr, J. (2016). *The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing*. *Advances in Virus Research*, 59–126.

47. Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., & Enjuanes, L. (2015). *Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses*. *Annual Review of Virology*, 2(1), 265–288.
48. Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., ... & Gao, G. F. (2016). *Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses*. *Trends in microbiology*, 24(6), 490-502.
49. Taboada, B., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Ramos-Cervantes, P., Escalera-Zamudio, M., Boukadida, C., Sanchez-Flores, A., Isa, P., Mendieta-Condado, E., Martínez-Orozco, J. A., Becerril-Vargas, E., Salas-Hernández, J., Grande, R., González-Torres, C., Gaytán-Cervantes, F. J., Vazquez, G., Pulido, F., Araiza-Rodríguez, A., Garcés-Ayala, F., González-Bonilla, C. R., ... Arias, C. F. (2020). *Genomic Analysis of Early SARS-CoV-2 Variants Introduced in Mexico*. *Journal of virology*, 94(18), e01056-20.
50. Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., ... & Cui, J. (2020). *On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2*. *National Science Review*.
51. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2016). *W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis*. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235.
52. Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., ... & Wang, M. L. (2020). *A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials*. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2657.
53. Van Hemert, M. J., van den Worm, S. H., Knoops, K., Mommaas, A. M., Gorbalenya, A. E., & Snijder, E. J. (2008). *SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro*. *PLoS pathogens*, 4(5).
54. Volz, E., Hill, V., McCrone, J. T., Price, A., Jorgensen, D., O'Toole, Á., ... & Allan, J. (2021). *Evaluating the effects of SARS-CoV-2 Spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity*. *Cell*, 184(1), 64-75.
55. Wevers, B. A., & van der Hoek, L. (2009). *Recently Discovered Human Coronaviruses*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), 715–724.

56. Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. (2017) *Host Factors in Coronavirus Replication*. In: Tripp R., Tompkins S. (eds) *Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 419. Springer, Cham.
57. Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K.-Y. (2010). *Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis*. *Viruses*, 2(8), 1804–1820
- Worobey, M., Pekar, J., Larsen, B. B., Nelson, M. I., Hill, V., Joy, J. B., ... & Lemey, P. (2020). *The emergence of SARS-CoV-2 in Europe and the US*. bioRxiv.
58. Yu, I. M., Oldham, M. L., Zhang, J., & Chen, J. (2006). *Crystal Structure of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein Dimerization Domain Reveals Evolutionary Linkage between Corona- and Arteriviridae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17134–17139.
59. Yu G, Smith D, Zhu H, Guan Y, Lam TT (2017). “ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data.” *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 28-36.
60. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Chen, H. D. (2020). *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. *Nature*, 579(7798), 270-273.
61. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Niu, P. (2020). *A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019*. *New England Journal of Medicine*.