



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS



**DISEÑO IN SILICO DE UNA PRUEBA RT-qPCR
PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2**

TESIS

Presentada para obtener el grado de Licenciada
en biología

PRESENTA

Briseida Gámez Parra

Director de Tesis:

D en C. Nidia Gary Pazos Salazar
Laboratorio de Infectología Molecular, Dpto. de
Microbiología, FCQ-BUAP

Co-Director de Tesis:

D en C. Joaquin Manzo Merino
Sub-dirección de Investigación Básica, INCAN

Heroica Ciudad de Puebla de Zaragoza, agosto
2023

Índice

Introducción	5
1. Los coronavirus y las pandemias	5
2. El nuevo coronavirus: SARS-CoV-2	7
3. Organización genómica y estructura de SARS-CoV-2	8
4. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2	10
5. Filogenia e historia evolutiva de SARS-CoV-2	13
6. Zoonosis como causa del COVID-19	16
7. Evolución y generación de variantes virales	17
8. Clasificación de SARS-CoV-2	20
8.1 Nomenclatura PANGO	20
8.2 Clasificación de variantes según la OMS	21
9. Variantes de SARS-CoV-2	23
10. Vigilancia epidemiológica	24
Antecedentes	25
1. Diagnóstico de SARS-CoV-2	25
1.1 Diagnóstico de SARS-CoV-2 por pruebas inmunológicas	25
1.2 Diagnóstico de SARS-CoV-2 por pruebas moleculares	25
1.2.1 RT-qPCR	25
1.2.1.1 Principales biomarcadores en pruebas RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2	26
1.2.1.1.1 Variabilidad de los biomarcadores	27
1.2.1.1.1.1 Mutaciones en genoma de SARS-CoV-2	27
1.2.1.1.1.2 Nivel de expresión genética	27
1.2.1.1.2 Linajes de SARS-CoV-2 y su prevalencia para la detección del virus	28
1.2.1.2.1 VOCs, VOIs y VUMs	28
1.2.1.2.2 Prevalencia de linajes de SARS-CoV-2 en México	28
1.2.1.2.3 Turismo en México y el intercambio de variantes de SARS-CoV-2	29
1.2.1.3 Estandarización y validación del ensayo RT-qPCR	29
1.2.1.3.1 Especificidad	30
1.2.1.3.2 Rango reportable	30

1.2.1.3.3 Sensibilidad analítica	30
1.2.1.3.4 Precisión	31
Planteamiento del problema	31
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivos	32
Material y métodos	33
1. Selección de secuencias	33
1.1 Selección de linajes de SARS-CoV-2	33
1.2 Selección de coronavirus filogenéticamente cercanos a SARS-CoV-2	33
2. Selección de biomarcadores	34
2.1 Selección de biomarcadores para la detección de SARS-CoV-2	34
2.2 Selección de biomarcador humano como control interno	34
3. Diseño <i>in silico</i>	34
3.1 Alineamiento de secuencias para la ubicación de zonas conservadas	34
3.2 Diseño de cebadores y sondas	34
3.3 Comprobación de especificidad <i>in silico</i>	35
4. Control positivo	35
5. Diseño de la fase húmeda	35
Resultados	35
1. Selección de linajes según criterios de exclusión e inclusión	35
2. Diseño <i>in silico</i>	35
2.1 Alineamiento múltiple	35
2.1.1 Ubicación de zonas conservadas	36
2.2 Blancos elegidos, diseño de cebadores y diseño de sondas	36
2.3 Comprobación <i>in silico</i> de especificidad de cebadores y sondas	37
3. Diseño de la fase húmeda	37
3.1 Propuesta para el desarrollo experimental de la prueba diagnóstica	37
3.1.1 Especificidad Analítica	37
3.1.2 PCR's individuales y su estandarización	38
3.2 Propuesta para la estandarización experimental y sensibilidad	39

3.2.1 Rango reportable	39
3.2.2 Sensibilidad analítica	40
3.2.3 Precisión o reproducibilidad	40
4. Controles	40
Discusión	40
Conclusiones	49
Referencias	49

Introducción

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son las enfermedades más comunes entre los seres humanos, los agentes causales son primordialmente bacterias y virus. Entre estos últimos, los virus de la influenza y los coronavirus pueden desencadenar enfermedades con síntomas graves (Khan et al., 2020).

Los coronavirus se caracterizan por tener envoltura y un genoma de RNA de una sola cadena positiva. Estos virus infectan primordialmente huéspedes vertebrados y producen enfermedades respiratorias, tanto en humanos como en animales domésticos (Kadam et al., 2021). Los coronavirus son conocidos por su rápida evolución, causada por su alta tasa de recombinación y de sustitución de nucleótidos. Actualmente se han identificado 39 especies de coronavirus, 7 de las cuales son coronavirus humanos, mismas que se han dividido en 27 subgéneros, 5 géneros y dos subfamilias dentro de la Familia *Coronaviridae*, Suborden *Cornidovirineae*, Orden *Nidovirales*, Phylum *Negarnaviricota*, Reino *Riboviria* (Kadam et al., 2021 & Kirtipal et al., 2020) (Figura 1).

1. Los coronavirus y las pandemias

Los dos primeros coronavirus humanos descubiertos fueron: HCoV-229E y HCoV-OC43, identificados en la década de los 60s (Graham et al., 2013). Normalmente, los

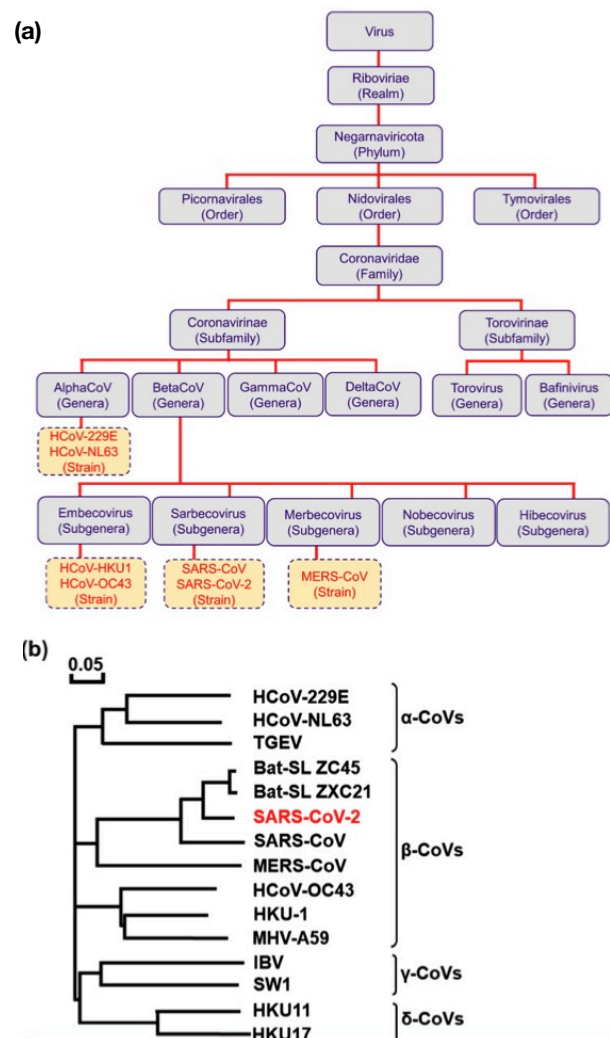


Figura 1. a) Clasificación de los 7 coronavirus humanos. b) árbol filogenético de coronavirus relacionados con SARS-CoV-2, construido en base al gen S. La barra de escala representa el número de sustituciones por sitio. (Tomado de Kirtipal et al., 2020).

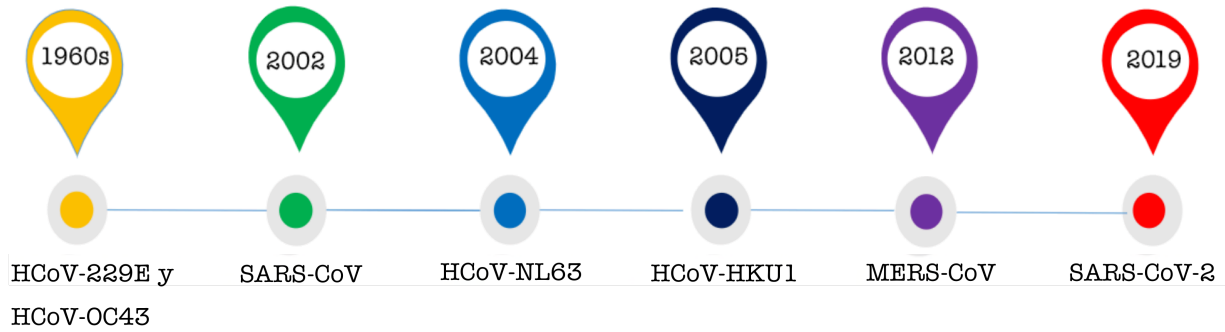


Figura 2. Línea del tiempo de la aparición de los coronavirus humanos. (Imagen modificada de Alyami et al., 2020).

coronavirus causan resfriados comunes; sin embargo, en infantes, ancianos y personas inmunodeprimidas pueden ocasionar enfermedades severas. Por otro lado, entre el año 2004 y el 2005, fueron identificados dos coronavirus humanos causantes de infecciones respiratorias medias o graves: HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 (Graham et al., 2013) (Figura 2). La alta transmisibilidad de los coronavirus los hace agentes potenciales de pandemias.

La palabra pandemia se refiere al gran esparcimiento geográfico de una enfermedad; esta debe tener características explosivas al ser altamente transmisible e infecciosa, con una mínima inmunidad colectiva y usualmente causadas por microorganismos recién descubiertos que suelen causar enfermedades graves (Morens et al., 2009).

La primera pandemia de coronavirus se remonta a inicios del siglo XXI. El primer caso de neumonía atípica ligado a SARS-CoV (síndrome respiratorio agudo grave, por sus siglas en inglés) tuvo lugar en China, en noviembre del 2002 (Figura 2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) no tardó en declarar a la enfermedad como "una amenaza a la salud mundial". En los primeros meses, los casos ascendieron a más de 300, siendo los trabajadores de la salud los principales afectados. Con el paso del tiempo, la enfermedad se esparció a otras regiones del mundo debido a la gran disponibilidad de viajes internacionales (Graham et al., 2013).

Con el objetivo de vencer este brote, en marzo del 2003, la OMS coordinó una red de centros de investigación alrededor del mundo para identificar el agente causal del SARS; en el mismo año se descubrió que un nuevo coronavirus podría provocarla. La pandemia finalizó en Julio del 2003, infectando 8096 individuos y causando 774 muertes en 27 países, con una tasa de mortalidad del 9.6%, provocando hasta un 50%

de muertes en adultos mayores. Ningún caso de SARS se ha registrado después de 4 casos esporádicos que surgieron entre diciembre del 2003 y enero del 2004 (Graham et al., 2013; Hui et al., 2020; Khan et al., 2020).

La segunda pandemia de coronavirus humanos aconteció en el año 2012 en Arabia Saudita, 10 años después de la pandemia de SARS-CoV (Figura 2). Un caso de neumonía aguda y fiebre renal fue reportado en junio de ese año, a pesar de ello, no se conocía el agente causal de la nueva enfermedad, por lo que muestras de los pacientes fueron almacenadas (Khan et al., 2020). Tiempo después, se descubrió que MERS-CoV (síndrome respiratorio de Oriente Medio, por sus siglas en inglés), se encontraba en la muestra de un paciente que había sufrido enfermedad respiratoria en abril del 2012. La tasa de mortalidad de MERS-CoV es de casi 35% y la transmisión de persona a persona fue facilitada en hospitales. Se registraron 2494 casos de MERS-CoV (confirmados en laboratorio) hasta noviembre del 2019, incluyendo 858 muertes en 27 países (Chafekar & Fielding, 2018; Hui et al., 2021; Khan et al., 2020; Shahrajabian et al., 2021). SARS-CoV y MERS-CoV son parte del género *Betacoronavirus* de la familia *Coronaviridae* (Khan et al., 2020) (Figura 1).

En diciembre del 2019, en diversas unidades médicas de la ciudad de Wuhan, en China, se reportaron numerosos pacientes que presentaban un cuadro de síndrome respiratorio severo, el cual incluía fiebre, mareos y tos. Saltaba a la vista que todos los afectados compartían su lugar de trabajo: el mercado de mariscos de tal ciudad. El patógeno desconocido, resultó ser un virus y fue confirmado utilizando técnicas como PCR, PCR en tiempo real y secuenciación de nueva generación. El genoma encontrado no parecía coincidir con otros genomas, por lo que se consideró a este virus como uno nuevo y fue llamado temporalmente: 2019-nCoV (Kadam et al., 2021 & Wu et al., 2020).

2. El nuevo coronavirus: SARS-CoV-2

Con el fin de conocer más sobre el nuevo virus, la comunidad científica internacional inmediatamente buscó determinar las relaciones evolutivas entre 2019-nCoV y otros coronavirus. Se realizaron árboles filogenéticos de las secuencias de los genes ORF1a, ORF1b, S, E, M y N, encontrando que este nuevo coronavirus pertenece al subgénero *Sarbecovirus*, en el cual se encuentra SARS-CoV y otros virus relacionados a

murciélagos (Figura 1). Debido a estos resultados, el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), cambió el nombre de 2019-nCoV a SARS-CoV-2, y la OMS nombró COVID-19 a la enfermedad causada por este (Kadam et al., 2021 & Wu et al., 2020). El 30 de enero del año 2020, la OMS declaró que la epidemia causada por el virus SARS-CoV-2 era una emergencia de salud pública de interés internacional (Wang et al., 2020).

3. Organización genómica y estructura de SARS-CoV-2

La organización genómica de SARS-CoV-2, se determinó con la alineación de su secuencia con dos miembros representativos del género *Betacoronavirus*: SARS-CoV Tor2 (asociado a humanos) y bat SL-CoVZC45 (asociado a murciélagos) (Wu et al., 2020). El genoma viral de RNA de una sola cadena positiva cuenta con los siguientes elementos: una estructura de capuchón en el extremo 5' y una cola de adeninas en el 3', ambos extremos cuentan con una región UTR (región estructurada sin traducir) (Kirtipal et al., 2020 & Romano et al., 2020). El genoma de SARS-CoV-2 también cuenta con secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) dentro de su arquitectura, en la cola 5' hay TRSs conocidas como TRS-L. A los lados de cada ORF (marcos de lectura abierta), también se encuentra un TRS llamado TRS-B (Kadam et al., 2021 & Romano et al., 2020). Al final de la cola 3' del genoma, se ubican 9 marcos abiertos de lectura (ORFs), que codifican para factores accesorios (Kadam et al, 2021; Kirtipal et al., 2020; Romano et al., 2020; Wu et al, 2020) (Figura 3).

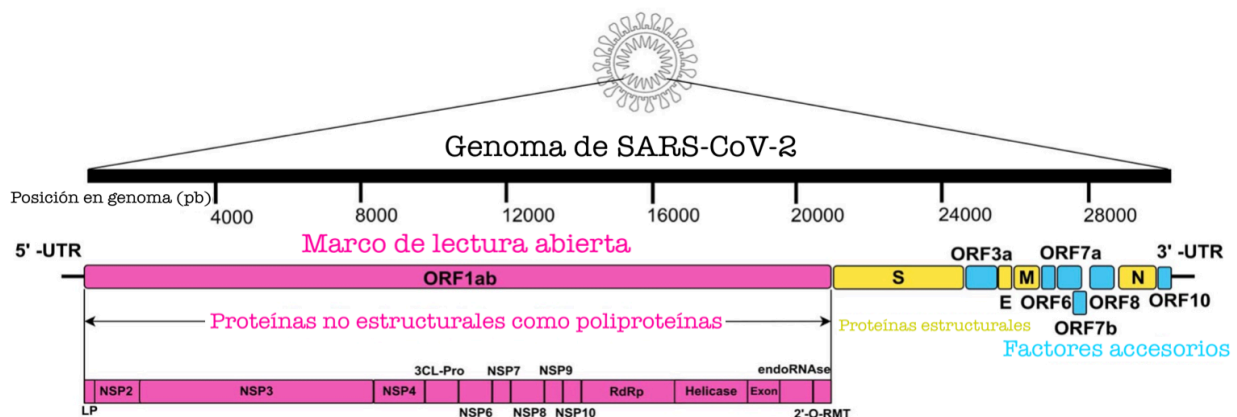


Figura 3. Mapa genómico de SARS-CoV-2. Regiones codificantes y sus respectivas proteínas; en color rosa se ilustran las regiones codificantes de las proteínas no estructurales, en color amarillo las proteínas estructurales y en azul los factores accesorios. (Imagen modificada de Saha et al., 2021).

En total, SARS-CoV-2 cuenta con 14 ORFs, los principales son ORF1a y ORF1b, mismos que se sobrelapan y constituyen dos tercios del genoma total, estos dos ORFs codifican a la poliproteína replicasa 1a (PP1a) y a la poliproteína 1ab (PP1ab), respectivamente (Kadam et al., 2021; Kirtipal et al., 2020; Romano et al., 2020) (Figura 3).

A partir de las poliproteínas PP1a Y PP1ab se producen diversas proteínas no estructurales, (Nsps), por medio de una reacción autoproteolítica. Las Nsps tienen como principal función conformar el complejo de transcripción viral (RTC), las funciones de cada Nsp se ilustran en la Figura 4 (Kirtipal et al., 2020 & V'kovski et al., 2021).

Los genes de SARS-CoV-2 que codifican proteínas estructurales, se encuentran en la cola 3' del genoma, estos son: el gen E (envoltura), M (membrana), gen N (nucleocápside) y S (proteína spike), importantes para la formación de las copias del virus y para la integridad de su estructura (Kadam et al, 2021; Kirtipal et al., 2020;

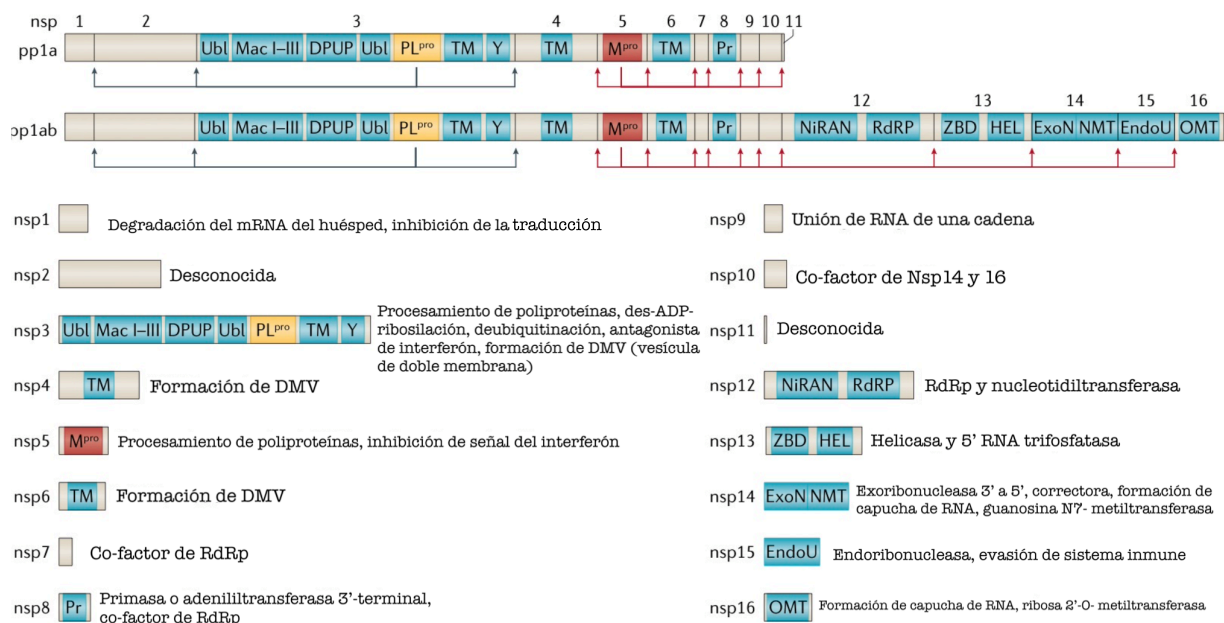


Figura 4. Procesamiento de poliproteínas y Nsps de los coronavirus. Se ilustra el procesamiento de las poliproteínas y los dominios de las Nsps. Las poliproteínas pp1a y pp1ab, deben pasar por un proceso autoproteolítico, facilitado por las proteasa virales que residen en la Nsp3 (PL^{pro}) y en Nsp5 (M^{pro}). PL^{pro} libera proteolíticamente de pp1a y pp1ab a Nsp1, Nsp2, Nsp3 y al amino terminal Nsp4 (flechas azules). M^{pro} libera Nsp5-16 y al carboxy terminal Nsp4 de pp1a y pp1ab (flechas rojas). De igual forma, se mencionan las funciones conocidas de los Nsp1-16. (Imagen modificada de V'kovski et al., 2021).

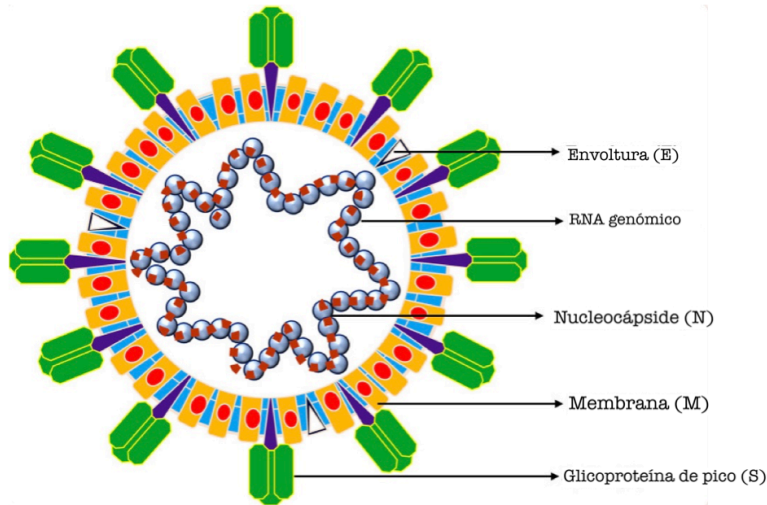


Figura 5. Estructura típica de un coronavirus. Se ilustran las proteínas estructurales: E, M, S y la proteína N que se encuentra al interior y empaqueta el RNA genómico. (Imagen modificada de Kirtipal et al., 2020).

Romano et al., 2020; Wu et al., 2020). Los coronavirus humanos (HCoV) contienen proteínas de nucleocápsides fosforiladas (N) que forman la nucleocápside externa del genoma de RNA. El RNA genómico está envuelto por bicapas de fosfolípidos y está asociado con las 3 proteínas estructurales: M, S y E, que forman partículas esféricas o pleomórficas de entre 80-120

nm. Se caracterizan por tener proteínas externas de superficie llamadas de pico (S), que le da su aspecto característico de una corona (Kirtipal et al., 2020 & Wang et al., 2020) (Figura 5).

4. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2

El primer paso del ciclo de vida de un virus es la entrada a la célula huésped. La proteína S es esencial para que SARS-CoV-2 lleve a cabo este paso y todo comienza con el reconocimiento del receptor humano. El mecanismo de reconocimiento del receptor de SARS-CoV-2 determina la infectividad, el alcance del virus para infectar diferentes huéspedes y su patogenicidad. SARS-CoV y SARS-CoV-2 reconocen al receptor ACE2 en humanos. En la estructura de la unión RBD-ACE2, 17 de los 20 residuos de ACE2 que interactúan con RBD de SARS-CoV y SARS-CoV-2, son los mismos; sin embargo, hay diferencias sutiles que aumentan la afinidad entre ACE2 y SARS-CoV-2 (Chambers et al., 2020; Jackson et al., 2022; Kirtipal et al., 2020; Wang et al., 2020).

El receptor humano ACE2 se puede encontrar en las células epiteliales de la tráquea, bronquios, glándulas serosas bronquiales, alveolo, monocitos alveolares y macrófagos. ACE2 de igual forma se expresa en las células endoteliales de arterias y venas, neuronas cerebrales, células inmunes, células epiteliales tubulares de los riñones,

células mucosas del intestino y células epiteliales de los túbulos renales (Kirtipal et al., 2020).

Existen dos rutas descritas que pueden ser tomadas por los coronavirus: cuando el virus entra por medio del reconocimiento de receptores en la superficie de la célula huésped para que se dé una fusión de membranas, la entrada es referida como "temprana", así se logra directamente la fusión membranal del virus y la célula. Pero, si la entrada del virus se da por endocitosis, se le llama "tardía", aquí el virus primero será endocitado y después será escindido por furinas convertasas, este fenómeno induce cambios conformacionales en la partícula viral que resultará en la fusión de la envoltura viral y la pared endosomal (Chambers et al., 2020 & Kirtipal, et al., 2020).

Dos subunidades de la proteína S necesitan ser escindidas proteolíticamente en dos diferentes momentos y sitios; la primera escisión sucede en el sitio S1/S2 y se le llama "cebado", este paso es necesario para que las subunidades funcionales estén disponibles. Después, otra proteasa escinde en el sitio de escisión de la S2, este paso convierte a la proteína de fusión en un estado competente, esta segunda proteólisis resulta en la activación de la fusión de las membranas. En SARS-CoV-2, el cebado y la activación es llevado a cabo por la serin proteasa humana TMPRSS-2 o por furinas (Chambers et al., 2020 & Jackson et al., 2022).

En la entrada "temprana", ya que hubo una fusión membranal, el RNA genómico empaquetado en la nucleocápside del virus se liberará en el citoplasma celular, esto es posible debido a cambios estructurales. Los ribosomas de la célula huésped traducirán el genoma viral que actúa como mRNA. Al traducir ORF1a y ORF1b, se producen dos poliproteínas llamadas: PP1a y PP1ab, respectivamente. Después de la traducción, 16 proteínas no estructurales serán liberadas; de PP1a (nsp1-11) y de PP1ab (nsp1-10, nsp12-16), por medio de las proteasas codificadas por las Nsp 3 (PLpro) y Nsp 5 (Mpro) (Kirtipal et al., 2020 & V'kovski et al., 2021).

Los motivos de RdRp regulan la síntesis de RNA dirigida en la cavidad central por medio de 4 rutas accesibles, estas son: ruta de entrada de la plantilla, ruta de entrada del cebador, canal de entrada de NTP y la ruta de salida de la hebra nueva. Cuando se agrega una pequeña cantidad de sustrato de RNA de horquilla, el complejo Nsp12-

Nsp7-Nsp8 lleva a cabo la polimerización de RNA dependiente de RNA (Wang et al., 2020).

La replicación viral comienza con la generación de hebras de RNA de sentido negativo que son copias del genoma viral, estas sirven como molde para generar nuevas hebras de RNA pero de sentido positivo (mRNAs). Este nuevo material genético producido, funciona a su vez para la traducción y así generar más proteínas virales para la nueva progenie viral (Kirtipal et al., 2020 & V'kovski et al., 2021).

Se ha determinado que los coronavirus inducen modificaciones en la membrana de la célula huésped para acomodar su replicación. Los Nsps 3, 4, y 6 desvían las endomembranas del huésped para convertirlas en organelos de replicación, estas estructuras son conocidas como vesículas de doble membrana (DMVs) (V'kovski et al., 2021).

Después de la transcripción, el RNA viral se libera de las DMVs por medio de poros y se une a las proteínas N. Esta proteína estructural se localiza junto al poro de salida de las DMVs, por lo que se cree que el RNA se une a la proteína N en cuanto sale del poro, aquí empieza el empaquetamiento del RNA viral. El complejo N-RNA, es conocido como ribonucleoproteínas (RNPs) (Bracquemond & Muriaux, 2021).

La proteína M es primordial para el armado de la partícula viral debido a sus interacciones clave M-M y entre proteínas estructurales. Cuando esta proteína está en el estado conformacional Mlong, interactúa con las RNPs, para así incorporar a N-RNA a la partícula de tipo viral (VLP). Esta interacción tiene varios puntos de contacto que crean una estructura selectiva para impedir la entrada de proteínas no virales (Bracquemond & Muriaux, 2021).

El ensamblaje viral se lleva a cabo en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, llamado ERGIC. La proteína E también se encuentra localizada en ERGIC y forma una interacción M-E. La proteína S es dirigida a ERGIC por medio de vesículas de transporte y fusión membranal, para finalmente ser incorporada por medio de la interacción M-S (Bracquemond & Muriaux, 2021).

Las rutas de salida de las partículas de coronavirus difieren dependiendo del número que se haya generado. Primeramente, se transporta a las partículas virales de ERGIC a la membrana plasmática por medio de vesículas: cuando hay pocas, se utilizan

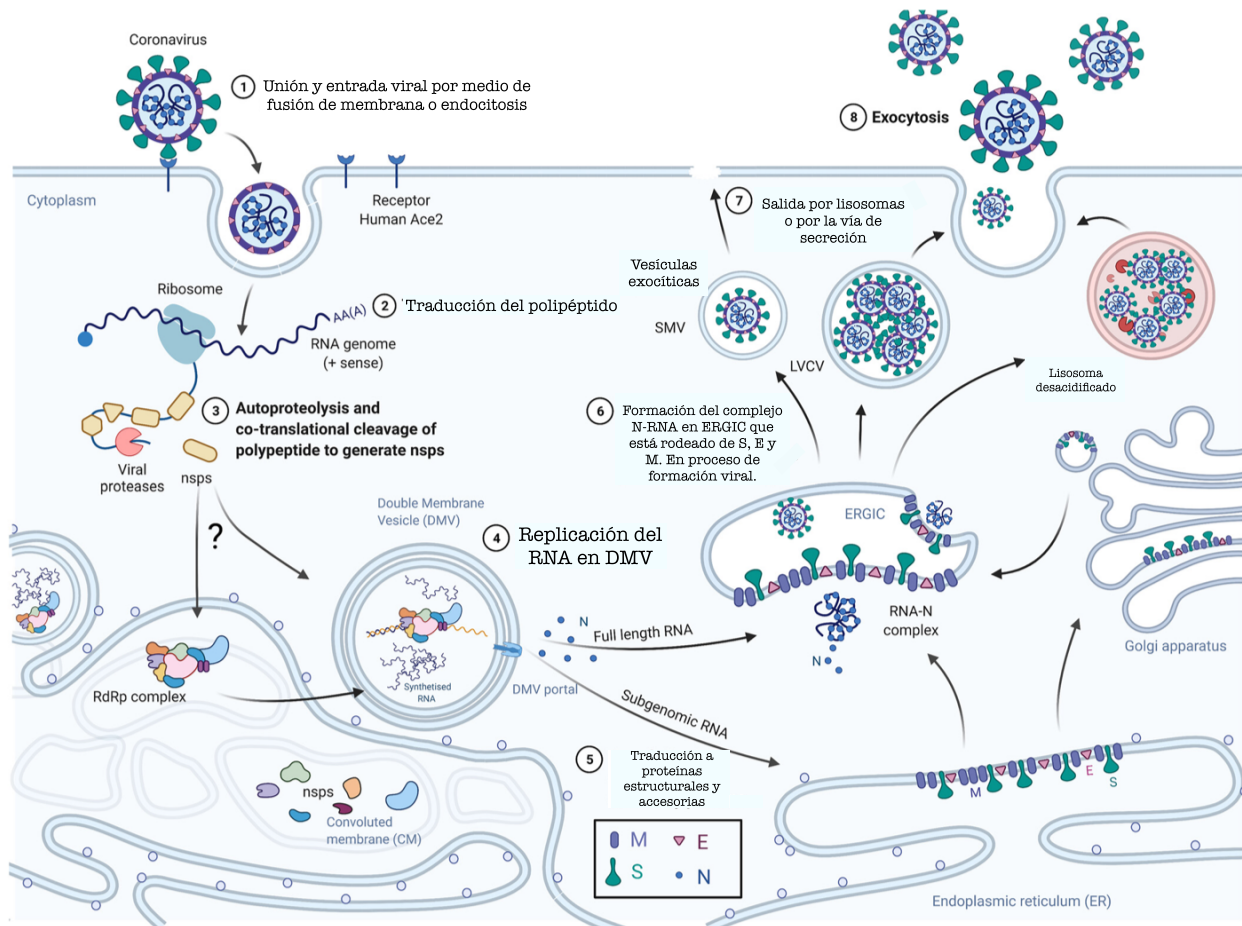


Figura 6. Modelo de la replicación de SARS-CoV-2. Los pasos 1, 2, 3, 4, y 5, representan los pasos tempranos del ciclo de replicación viral, junto con la entrada viral y la replicación del RNA. En este esquema se hace mayor énfasis en los últimos pasos. Los pasos 6, 7 y 8 representan la formación del complejo N-RNA con las proteínas M, E y S, que se lleva a cabo en ERGIC, para después seguir rutas de salida por medio de vesículas lisosomales antes de la exocitosis. (Imagen modificada de Bracquemond & Muriaux, 2021).

vesículas con una sola membrana (SMVs), y cuando hay múltiples partículas, se transportan por medio de partículas grandes contenedoras de virus (LVCVs). En el primer tipo de transporte, el mecanismo de salida no es del todo claro pero involucra una ruptura de la membrana; en la segunda, la salida es por exocitosis. La Figura 6 ilustra el ciclo completo de replicación de SARS-CoV-2 (Bracquemond & Muriaux, 2021).

5. Filogenia e historia evolutiva de SARS-CoV-2

Los análisis filogenéticos ubicaron a este nuevo virus en el género de los *Betacoronavirus* y en primera estancia, se encontró que el genoma de SARS-CoV-2

Investigadores llevaron a cabo una secuenciación metagenómica con 411 muestras de murciélagos, así lograron ensamblar 24 metagenomas de CoVs. Entre ellos se encuentra a un familiar cercano de SARS-CoV-2: RpYN06, con el cual comparte una identidad del 94.5% entre sus secuencias, además de presentar la mayor identidad entre genes que se haya registrado. RpYN06 es el segundo familiar más cercano después del virus RaTG13. Un dato interesante, es que todos los sarbecovirus encontrados en este estudio, son pertenecientes al género *Rhinolophus*. La proximidad genética de RpYN06 y RaTG13 con SARS-CoV-2, apunta a que el nuevo coronavirus tuvo su origen en murciélagos para después adaptar al ser humano como su huésped (Zhou et al., 2021).

La región ORF1b del genoma del nuevo coronavirus, no presenta similitud con otro virus de murciélago conocido, lo cual indica el importante papel que jugó la recombinación en la historia evolutiva de SARS-CoV-2 (Lu et al., 2020). Los coronavirus poseen una alta tasa de recombinación, lo que provoca que sus regiones genómicas tengan un origen diferente entre ellos. Los linajes de SARS-CoV-2 obtuvieron residuos en la proteína S, específicamente en el dominio de unión al receptor (RBD), que permite al virus unirse al receptor humano ACE2. Lam et al. (2020), encontró que RBD es genéticamente más cercano al virus de un pangolín que a RaTG13, señal de un probable evento de recombinación.

Sin embargo, diferentes investigaciones sugieren que la proteína S no presenta indicios de recombinación con linajes ancestrales de SARS-CoV-2 o con otros sarbecovirus.

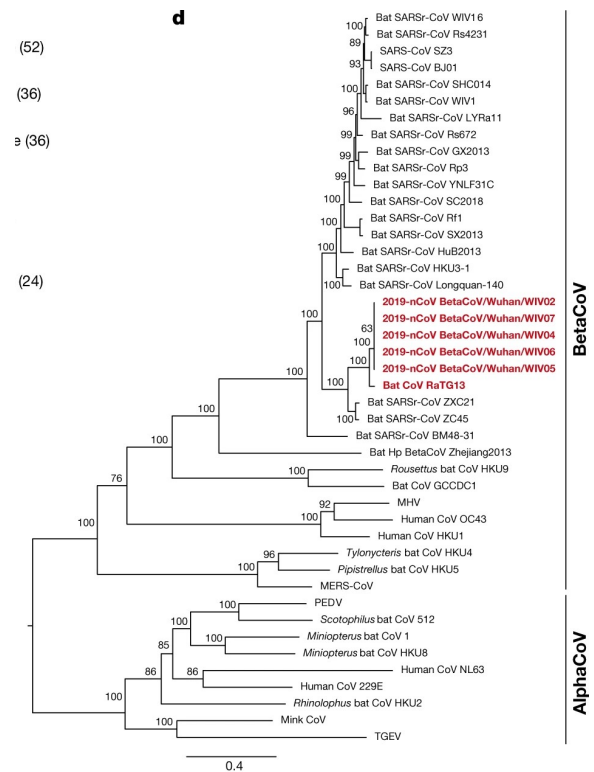


Figura 8. Árbol filogenético de genomas completos de SARS-CoV-2 y coronavirus relacionados. (Imagen tomada de Zhou et al., 2020).

Todo indica a que hay un solo linaje de virus de murciélagos en circulación con la capacidad de infectar a los humanos (Boni et al., 2020 & Menachery, et al., 2015).

Las secuencias de sarbecovirus presentan evidencia de mosaicismos, lo que sugiere que sucedió un evento de recombinación homóloga entre sus ancestros o en los inicios de su historia evolutiva, producido por eventos de recombinación ancestral compartidos. Existe un solo linaje ancestral de SARS-CoV-2 y RaTG13, el cual provocó el surgimiento de dos virus de murciélago (CoVZXC21 y CoVZC45) al suceder un evento de recombinación entre sus progenitores y los ancestros de SARS-CoV-2 y RaTG13 (Boni et al., 2020).

Los primos de SARS-CoV-2 y RaTG13 son 2 virus de pangolín descubiertos en el 2019 y el 2017, en las ciudades chinas de Guandong y Guangxi, respectivamente (Boni et al., 2020). Los residuos de unión a ACE2 se presentaban en los ancestros en común de SARS-CoV-2, RaTG13 y en los virus de pangolín; en el caso del virus RaTG13, perdió estos residuos en algún evento de recombinación, por esta razón se creía que los residuos fueron originados por recombinación entre SARS-CoV-2 y los virus de pangolín (Boni et al., 2020).

Así se apoya la hipótesis que menciona que el linaje de SARS-CoV-2 es consecuencia de un salto zoonótico, casi directo, proveniente de murciélagos, debido a que los residuos de unión al receptor ACE2 están presentes en virus de murciélagos circulantes (Boni et al., 2020).

SARS-CoV-2 surgió del mismo subgénero de murciélagos de herradura que hospedaban el virus SARS-CoV. Estos dos virus divergieron hace 40 a 70 años de linajes de virus de murciélago. Este gran número de años sugiere la existencia de virus de murciélago con el potencial zoonótico de infectar humanos, ya que los residuos de unión al receptor ACE2, proviene de virus de estos peculiares mamíferos (Boni et al., 2020).

6. Zoonosis como causa del COVID-19

Diversos aspectos de la vida y ecología de los murciélagos influyen en el papel de los murciélagos como reservorios virales, entre estos están: su habilidad para volar, un periodo de vida largo y la coevolución entre los genomas de murciélago y los genomas virales (Brook & Dobson, 2015). Existe una relación filogenética antigua entre

murciélagos y un grupo de patógenos virales; estos mamíferos voladores son el taxón más ancestral que hospedó a diferentes familias virales, entre ellas, los coronavirus (Cui et al., 2007).

Los murciélagos pueden ser infectados por un sinnúmero de patógenos virales y aun así, son capaces de no presentar enfermedad. Aparentemente, han desarrollado la capacidad de restringir respuestas inmunológicas para evadir la inmunopatología de las infecciones con los patógenos que comparte una historia evolutiva. El descubrimiento de elementos virales endógenos en genomas animales indica que el sistema inmune de los murciélagos puede resistir estos patógenos, ya que los reconoce como partes de su ser (Brook & Dobson, 2015). Los murciélagos pueden ser infectados por más de dos virus a la vez, permitiendo así la recombinación (Graham et al., 2013).

Estudios filogenéticos han comprobado que los coronavirus de murciélago son ancestros del género *Alfa* y *Betacoronavirus* (Woo et al., 2012). Los últimos eventos provocados por los coronavirus, son prueba de que estos virus tienen la capacidad de adaptarse rápidamente y transmitirse a los seres humanos (Graham et al., 2013).

Hay más de 1100 especies de murciélagos esparcidos alrededor del mundo, los cuales conforman el 20% de todas las especies de mamíferos, por lo que aumenta su potencial de actuar como huéspedes de patógenos, tan virulentos y letales como los coronavirus humanos. Los hábitos de percha de los murciélagos, junto con las presiones ecológicas causadas por el hombre, provocan un acercamiento de estos animales a los humanos, así aumentando la posibilidad de la transmisión de murciélago-animal o murciélago-humano (Graham et al., 2013).

7. Evolución y generación de variantes virales

Otro factor que promueve la adaptación de los coronavirus a huéspedes específicos es la expansión de su genoma, lo que conlleva la adquisición y el mantenimiento de genes que codifican para proteínas accesorias que permiten el salto zoonótico, además de ayudar a la supresión del sistema inmunológico y a la virulencia (Forni et al., 2017).

Los coronavirus tienen genomas grandes (hasta más de 32kb) y se cree que esta expansión fue mediada parcialmente por el incremento en la fidelidad de su replicación. Otros factores que provocaron la expansión del genoma son su organización peculiar y el complejo de replicación. Este fenómeno conlleva la ganancia y la pérdida de genes

que contribuye al cambio de fenotipos, lo cual es una gran herramienta para trazar la evolución viral (Forni et al., 2017).

Existen factores moleculares y factores extrínsecos como el ambiente bioquímico de diferentes tipos de células de distintos huéspedes, que influyen en la tasa de errores que se comenten durante la replicación de los coronavirus. Por ejemplo, para catalizar la reacción de las polimerasas virales se requiere de ciertos sustratos, donde la calidad y la cantidad de estos componentes puede diferir entre tipos de células o huéspedes (Banerjee et al., 2021).

De igual modo, las diferencias inherentes en la secuencia codificante de las enzimas del huésped, impactan en la evolución del virus. En el caso de la proteasa TMPRSS2, su secuencia codificante es diferente entre especies de mamíferos, especialmente si no son cercanos filogenéticamente. Cuando SARS-CoV-2 tiene contacto con una nueva especie de mamífero, el virus interaccionará con una enzima ortóloga de TMPRSS2 (Banerjee et al., 2021). Aunque la unión de la proteína S con su nuevo huésped sea suficiente para facilitar la entrada del viroma a la célula, con el tiempo, la población viral evolucionará para seleccionar variantes virales con una mayor tasa de unión al ortólogo de TMPRSS2 de la nueva especie de huésped. Los sitios de unión a furina de los ancestros de SARS-CoV-2, descubiertos en murciélagos, difieren en su secuencia codificante, lo que sugiere una posible adaptación específica según la especie del huésped (Banerjee et al., 2021). La mayoría de los cambios adaptativos en el genoma de SARS-CoV-2 ocurrieron en reservorios de vida silvestre, como los murciélagos, antes de llegar a los seres humanos (MacLean et al., 2021).

Los virus de RNA presentan una tasa de mutación mayor a la de los virus de DNA, ya que como se ha mencionado, su RNA polimerasa es propensa a cometer errores en el proceso de replicación y a que sus genomas ensamblan mutaciones en cada paso del ciclo (Janik et al., 2021). Por otro lado, estos ciclos ocurren en cuestión de horas, lo que puede asegurar que se genere una población viral diversa en un solo huésped. Los coronavirus no producen tantas mutaciones como otros virus de RNA debido a que poseen enzimas capaces de cortar nucleótidos mutagénicos erróneos incorporados por la RNA polimerasa (Banerjee et al., 2021 & Janik et al., 2021).

La selección natural regula el destino de las nuevas mutaciones creadas. Si estas no brindan ventajas respecto a la transmisión, replicación viral o al escape de la inmunidad, provocará una disminución en su eficiencia y serán removidas de la población viral que se encuentre en circulación. Ahora bien, si la situación es contraria, el virus podrá adaptarse a nuevos hábitats y huéspedes, así como resistirse a presiones selectivas como el sistema inmune del huésped y medicamentos antivirales (Janik et al., 2021).

Cuando un virus tiene una o más mutaciones en su genoma se le conoce como variante. Las variantes pueden diferir entre ellas por una sola mutación o por varias. Debido a la alta tasa de mutación de los virus, se espera el surgimiento de numerosas variantes las cuales pueden aparecer y desaparecer aleatoriamente (Janik et al., 2021). Conforme SARS-CoV-2 circule en el ambiente, presiones selectivas como la selección natural y la inmunidad mediada por vacunas influirán que variantes virales predominen en el ambiente. Las variantes actuales y futuras fueron y serán creadas por medio de la replicación y la recombinación (Banerjee et al., 2021).

Las mutaciones generadas por la replicación añaden pequeños cambios en el genoma; por el contrario, la recombinación introduce modificaciones de mayor relevancia, así es como se logra modificar el fenotipo de SARS-CoV-2 de manera trascendente. Cuando sucede una transcripción discontinua, se puede iniciar un proceso de recombinación en las células que están co-infectadas con más de una especie o más de una variante de coronavirus, generado por la RdRp viral que lleva a cabo un cambio de cadenas (Banerjee et al., 2021).

La recombinación homóloga también sucede entre los genomas de SARS-CoV-2, en donde las moléculas de RNA semejantes se combinan (Banerjee et al., 2021). En recientes estudios se han identificado 8 eventos de potencial recombinación homóloga entre genomas de SARS-CoV-2 (Pollett et al., 2021). El tropismo celular y de tejido, así como la distribución de los receptores, son factores elementales que determinan una co-infección de coronavirus y simultáneamente determina la probabilidad de que un proceso de recombinación homóloga suceda (Banerjee et al., 2021).

8. Clasificación de SARS-CoV-2

A la fecha, no existe un procedimiento estandarizado para clasificar a los virus debajo del nivel de especie. Tradicionalmente la diversidad genética se categoriza en clados, es decir, que todas las secuencias genómicas que se tengan de una especie se ubicarán dentro de un solo clado o se denominarán como "sin clasificar". El virus SARS-CoV-2 necesita de un sistema de clasificación filogenética más explícito, para cubrir la necesidad que la emergencia de salud requiere (Rambaut et al., 2020).

8.1 Nomenclatura PANGO

La pandemia de SARS-CoV-2 está en constante cambio, de ahí que se necesite de una nomenclatura que refleje dicha actividad. La Asignación Filogenética de Linajes de Brotes Globales Nombrados (PANGOLIN, por sus siglas en inglés), o mejor conocida como la nomenclatura PANGO, propone designar linajes en lugar de clados, para así reflejar el dinamismo de dicho virus y no un estado estático. Esta nomenclatura funciona como un sistema jerárquico que se refleja en el nombramiento de linajes, tiene como objetivo destacar eventos epidemiológicos importantes, los cuales pueden ser la aparición del virus en una nueva locación, el incremento de contagios o la aparición de nuevos fenotipos (PANGO Network, 2021 & Rambaut et al., 2020).

El nombre de los linajes empieza con una letra y ocupa el orden alfabético para ilustrar el periodo en el que fueron apareciendo los diferentes linajes. Si nos vamos a la raíz de la filogenia de SARS-CoV-2, se encontrarán dos linajes que se denotan como linaje A y B. Con lo ya establecido se puede entender que el linaje A es el más temprano y su primera variante es Wuhan/WH04/2020, esta fue muestreada en enero del 2020 (Rambaut et al, 2020). El segundo linaje es el B, que incluye la primera variante secuenciada, que a su vez es su principal representante: Wuhan-Hu-1. Cabe destacar que las variantes pertenecientes al linaje B fueron secuenciadas y publicadas antes que las del linaje A, pero, de acuerdo con información actual, es probable que el antepasado en común más reciente de la filogenia de SARS-CoV-2 comparta la misma secuencia genómica que las variantes pertenecientes al linaje A (Rambaut et al, 2020).

Los siguientes lineamientos se deben seguir para designar un nuevo linaje Pango: 1) un conjunto de secuencias debe compartir un solo ancestro en común y representar un clado monofilético o parafilético en la filogenia de SARS-CoV-2. El clado debe

distinguirse por poseer al menos un evento evolutivo, como el cambio de un solo nucleótido, una inserción o deleción, o un evento de recombinación. Este clado debe contener al menos 5 secuencias de genomas completos. El clado debe incluir al menos un nodo interno. 2) Un linaje debe representar uno o más eventos de significancia epidemiológica, como el movimiento del virus a un nuevo país, rápido crecimiento de la frecuencia del clado en comparación con otros linajes circulantes, cambios en la transmisibilidad, inmunogenicidad o patogenicidad, o que el clado contenga mutaciones de interés biológico o de preocupación (PANGO Network, 2021). Por ejemplo: en México, el linaje B.1.1.519 fue visto por primera vez en octubre del 2020, sin embargo, se clasificó erróneamente como B.1.1.222. En las secuencias de este linaje se identificaron las mutaciones T478K, P681H y T732A, las cuales no coincidían con B.1.1.222, además, los casos en México ascendieron conforme los días pasaban; todos estos factores señalaban a este linaje como uno nuevo: B.1.1.519 (Rodríguez-Maldonado, 2021).

Los nombres de los linajes se constituyen por prefijos alfabéticos (escritos en mayúsculas) y por sufijos numéricos. Para representar a un sucesor de cada linaje en la nomenclatura, se utiliza un punto y sólo puede figurar cuando el ancestro de un linaje se identifica claramente. Sirva de ejemplo el linaje B.1.1.7: este es el descendiente número siete del linaje B.1.1 y así mismo, B.1.1 es el primer descendiente del linaje B.1. Solo puede haber tres sufijos numéricos; los descendientes del tercer sufijo, son asignados al siguiente prefijo alfabético que esté disponible (en orden alfabético), por ejemplo: B.1.1.1.1 es llamado C.1, por lo que B.1.1.1 también puede llamarse C (PANGO Network, 2021).

Cuando todas las letras del alfabeto sean usadas como prefijos, se usarán combinaciones de letras, igualmente en orden alfabético, por ejemplo: AA, AB, hasta llegar a AZ; después se utiliza BA, BB, y así sucesivamente hasta llegar a BZ. Lo mismo ocurre con las siguientes letras de alfabeto, incluso se pueden utilizar más de dos prefijos: AAA, AAB, AAC, etcétera (PANGO Network, 2021).

8.2 Clasificación de Variantes según la OMS

Desde enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud ha monitoreado la evolución del virus SARS-CoV-2 y creó una clasificación de variantes basada en el posible riesgo

que éstas podrían significar para la salud pública global. Esta clasificación puede ser cambiada por las autoridades nacionales de un determinado país para que cumplan con las necesidades locales. Este sistema nombra a las variantes como:

- Variantes de preocupación (VOCs)
- Variantes de interés (VOIs)
- Variantes de monitoreo (VOMs)

Esta clasificación, puede cambiar con el paso del tiempo. Es necesario recalcar que la OMS recomienda el uso de letras del alfabeto griego, en lugar de usar otras nomenclaturas como la de PANGO, para que parezcan amigables al público en general (WHO, 2022).

Las variantes de preocupación (VOC, por sus siglas en inglés), son las variantes que cumplen con uno o más de los siguientes puntos: que tengan un aumento en la transmisibilidad, que afecten negativamente la epidemiología de la COVID-19, aumento de virulencia, cambio en la presentación clínica de la enfermedad, que disminuyan la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o que disminuyan la efectividad de los diagnósticos, vacunas y terapias (WHO, 2022).

Las variantes de interés (VOI, por sus siglas en inglés), se definen como las variantes que cumplen con uno o más de los siguientes puntos: que contenga cambios genéticos que se sepa o se prediga que afectan las características del virus como la transmisibilidad, la severidad de la enfermedad, el escape inmune, diagnóstico o escape terapéutico. También, qué cause transmisión comunitaria en varios países, cuente con un incremento en su prevalencia, junto a un incremento de los casos en el tiempo, además de otros impactos epidemiológicos que puedan significar un riesgo para la salud global (WHO, 2022).

Las variantes bajo monitoreo (VUM, por sus siglas en inglés), se refiere a las variantes con cambios genéticos que se sospecha afectan las características del virus y que puedan indicar un posible riesgo futuro. En el caso de estas variantes, la evidencia de su impacto epidemiológico y fenotípico no está completamente claro, por lo que se requiere mayor vigilancia y más evidencia científica (WHO, 2022).

En contraste, la OMS también considera a las "variantes anteriormente monitoreadas", estas son aquellas que han sido reclasificadas por las siguientes razones: la variante

ya no está en circulación o ya no tiene significancia en la salud pública a nivel global, la variante ha circulado por un tiempo prolongado sin tener impacto en la situación epidemiológica actual, o, la evidencia científica demuestra que esta variante ya no está asociada a características preocupantes (WHO, 2022).

9. Variantes de SARS-CoV-2

Entre las variantes más relevantes que han surgido desde que empezó la pandemia de SARS-CoV-2 en 2019, encontramos a la variante Alpha. Esta variante se identificó en el Reino Unido, en diciembre del 2020 y su linaje PANGO es B.1.1.7. Alpha se caracteriza por tener la mutación N501Y y una acumulación de estas en el gen S, además de tener deleciones en la posición 69 y 70. Estas modificaciones tienen como consecuencia el aumento en su transmisibilidad y el fallo de pruebas diagnósticas RT-PCR (Rambaut, 2020 & Alessandrini et al., 2020).

La variante Beta fue encontrada en Sudáfrica, en mayo del 2020, su linaje PANGO es B.1.351. Ésta presenta un total de 12 mutaciones y una deleción. De igual manera, tiene la mutación N501Y, como la variante Alpha; la mayoría de sus mutaciones se encuentran en la proteína S (LAL 242–244 del, D80A, D614G, R246I, D215G, K417N, L18F, E484K, N501Y, y A701V), una en la proteína E (P71L), una en la N (T2051I) y una en ORF1a (K1655N) (Wang et al., 2021).

En el 2020, la variante Gamma se encontró en Brasil y su linaje PANGO es el P.1. Adquirió la capacidad de evadir anticuerpos por medio de las 3 mutaciones K417T, E484K y N501Y, ubicadas en la proteína S. Provoca síntomas graves, gracias a la mutación V11765. Las mutaciones P209H, N188del, T1066, A243/L244del, y A243/L244, de igual forma, son características de esta variante (Oróstica, et al., 2021 & Zimerman et al., 2021).

En octubre del 2020 se identifica a la variante Delta en India, sin embargo, no fue hasta el 2021 que se convirtió en la variante dominante. Delta tiene capacidad de inmunoescape, además de tener una mayor carga viral, más infecciosa y por lo tanto, provoca una alta tasa de reinfección (Fajardo et al., 2022) Tiene tres linajes PANGO: B.1.617.1, B.1.617.2 y B.1.617.3 (Plante et al., 2021), y sus mutaciones se reparten alrededor del genoma viral: 4 mutaciones en NDT (T19R, G142D, Δ156–157), 2

mutaciones en RBD (L452R y T478K), 1 en S2 (D950N) y 1 mutación en el sitio de escisión de furina (P681R) (Korber et al., 2021).

Los linajes PANGO B.1.427 y B.1.429 pertenecientes a la variante Epsilon, aparecieron en septiembre del 2020. Se caracteriza por tener 2 mutaciones (L452R y D614G). La variante Iota de linaje PANGO B.1.526, se vio por primera vez en diciembre del 2020, con mutaciones en el gen S: E484K, D614G y A701V. Ambas variantes descubiertas en Estados Unidos (Korber et al., 2021). La variante Eta del linaje B.1.525, apareció en diciembre del 2020, en el continente africano (Nigeria), cuenta con las mutaciones E484K, D614G y Q677H. Kappa, como la variante anterior, apareció en diciembre del 2020 pero en el continente asiático (India). Tiene las mutaciones L452R, E484Q, D614G y P681R. Theta es una variante filipina, que tuvo su primer avistamiento en enero del 2021, sus mutaciones características son: E484K, N501Y, D614G y P681H. En el mismo mes, la variante brasileña Zeta de linaje P.2 hizo su primera aparición, sus mutaciones en el gen S, son dos: E484K y D614G. Las mutaciones de todas las variantes anteriores, se cree, causan un aumento en la neutralización de anticuerpos (Rothan & Byrareddy, 2020).

Omicrón es una variante del linaje PANGO B.1.1.529 que se descubrió en noviembre del 2021, en Sudáfrica. Esta variante tiene una mezcla de mutaciones que ayudan al virus a escapar del sistema inmune del huésped. Se han reportado 50 mutaciones, de ellas 34 están en la proteína S. En el gen ORF1a se presentan las siguientes sustituciones: A2710T, T3255I, K856R, I3758V, A2710T y P3395H; además de dos sustituciones en ORF1b: P314L y I1566V (Fajardo et al., 2022).

10. Vigilancia epidemiológica

Las variantes de SARS-CoV-2 han sido monitoreadas por medio de la secuenciación genómica desde una etapa temprana del brote en Wuhan. Diariamente aparecen nuevas secuencias genómicas de las variantes de SARS-CoV-2 en diversas bases de datos como GISAID y NCBI. Esta caracterización temprana y rápida de las variantes, permite monitorear una posible influencia de estas en el diagnóstico, terapia y vacunas (Janik et al, 2021 & Kadam et al, 2021). La vigilancia de las variantes es fundamental para la respuesta de las autoridades de la salud pública (CDC, 2021).

Antecedentes

1. Diagnóstico de SARS-CoV-2

1.1 Diagnóstico de SARS-CoV-2 por pruebas inmunológicas

Uno de los diagnósticos más usados al principio de la pandemia de SARS-CoV-2, fue el ensayo inmunológico. El ensayo de flujo lateral es un inmunoensayo usado para detectar SARS-CoV-2 en casos de emergencia. Esta prueba detecta antígenos de SARS-CoV-2 o anticuerpos IgG e IgM y tienen una sensibilidad del 88%. La detección de anticuerpos provee información útil sobre si el paciente estuvo en contacto con el virus o no, sin embargo, no identifica casos activos de SARS-CoV-2. Esta prueba diagnóstica tiene 77% y 100% de sensibilidad y especificidad respectivamente, para la detección de IgM. Para la detección de IgG, se tiene un 83% de sensibilidad y un 95% de especificidad (Mathuria et al., 2020).

Los inmunoensayos basados en la detección de antígenos tienen puntos en su contra; en la última epidemia de influenza se pudo comprobar que este tipo de pruebas diagnósticas tienen ciertas limitaciones, ya que por el muestreo, la variabilidad o baja carga viral, puede haber falsos negativos (Mathuria et al., 2020).

1.2 Diagnóstico de SARS-CoV-2 por pruebas moleculares

1.2.1 RT-qPCR

En infecciones respiratorias agudas, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR) es usada para detectar posibles virus de las secreciones respiratorias. La prueba diagnóstica RT-qPCR es uno de los métodos más eficaces para detectar, vigilar y estudiar coronavirus. Con la RT-qPCR, se puede identificar un blanco específico en el material genético con el uso de tintes fluorescentes. El análisis y la amplificación de los ensayos de RT-qPCR se llevan a cabo en un sistema cerrado, por lo que la probabilidad de un falso negativo, es mínima (Mathuria et al., 2020).

Esta técnica, permite analizar el resultado en tiempo real, aun si el proceso no ha terminado, lo que la convierte en una prueba diagnóstica más útil que la PCR convencional (Mathuria et al., 2020). La prueba RT-qPCR, es un ensayo denominado como el estándar de oro para el diagnóstico de SARS-CoV-2 por la Organización Mundial de la Salud, la cual lleva a cabo la detección de secuencias del genoma de

este virus, mediante la amplificación de ácidos nucleicos (OMS, 2020). De igual manera, la CDC designó a este método como su favorito para las pruebas diagnóstico de SARS-CoV-2 (Tang et al., 2020).

1.2.1.1 Principales biomarcadores en pruebas RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2

El 7 de febrero del 2020, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) publicó un documento en el cual se establecieron definiciones operacionales como respuesta a la posible llegada del virus SARS-CoV-2 a México, en él se menciona el manejo de muestras, medidas de control y de riesgo, así como un algoritmo de diagnóstico (López-Ortiz et al, 2020). En su página web, el InDRE también cuenta con un listado de pruebas moleculares RT-PCR útiles para el diagnóstico de SARS-CoV-2, los genes que detectan estos ensayos son: N, RdRp, ORF1ab, S, E, entre otros (Secretaría de Salud, 2021).

Para 2020, la OMS y el CDC diseñaron cebadores para el diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Los sitios blanco que mayormente son seleccionados por éstas y más instituciones son: el gen RdRp, E, S y N (Udugama et al., 2020). La selección de estos genes conservados como blancos para las pruebas diagnósticas RT-qPCR se pudo ver desde el inicio de la pandemia. El primer protocolo que desarrolló el CDC, amplifica tres fragmentos del gen N; este diseño es muy similar a los ensayos diagnósticos de SARS-CoV y MERS-CoV, los cuales tuvieron un desempeño satisfactorio (Holshue et al., 2020).

Chu et al. (2020), diseñaron una prueba diagnóstica RT-qPCR que amplifica segmentos de los genes ORF1ab y N. En Alemania, Corman et al. (2020), su ensayo tiene como objetivos los genes E y RdRp. La CDC de China recomienda cebadores que amplifiquen los genes ORF1ab y N. La universidad de Hong Kong desarrolló un protocolo de RT-qPCR que detecta, en primera instancia, el gen N y como ensayo confirmatorio, el gen ORF1b (Yan et al., 2020). Los blancos más comunes para la detección de SARS-CoV-2, son: el gen N (66.9%), ORF1ab (44%), E (22.3%), RdRp (16.6%), S (13.6%) y otros genes con un porcentaje menor al 1% (Yu et al., 2021).

1.2.1.1.1 Variabilidad de los biomarcadores

1.2.1.1.1.1 Mutaciones en genoma de SARS-CoV-2

La alta tasa de mutación del virus causante de la COVID-19 generó variantes con mutaciones que no fueron tomadas en cuenta al diseñar las primeras pruebas de diagnóstico que se basaron en la secuencia del virus reportado al inicio del brote (Chan et al., 2020).

Las mutaciones podrían significar una falla en el diagnóstico de la COVID-19 con el uso de pruebas moleculares. Hay diversos cambios genéticos documentados que causan el fallo de ciertos ensayos de diagnóstico comercial, un ejemplo es la mutación en el gen E (26340C>T) la cual afecta el blanco que amplifica el ensayo de Roche 23 cobas 6800/8800 (Artesi et al., 2020). Las mutaciones presentes en el gen S también afectan los resultados del ensayo de Thermo Fisher TaqPath, específicamente una delección asociada a linajes como el B.1.1.7 (Brown et al., 2020). En el caso del gen N, una mutación provoca el fallo de pruebas RT-PCR como el ensayo de Cepheid Xpert (Hasan et al., 2021).

1.2.1.1.1.2 Nivel de expresión genética

La integridad y conservación de los genes de SARS-CoV-2, no son suficientes para seleccionar un blanco; también se considera el nivel de expresión del gen que se quiera amplificar. Los genes de SARS-CoV-2 cuentan con diferentes niveles de expresión, por lo que para aumentar la sensibilidad y disminuir los resultados falsos negativos de los ensayos diagnósticos rRT-qPCR, se debe seleccionar blancos genómicos que tengan una expresión diferencial (Valadan et al., 2021).

Yu et al. en el 2020, menciona la alta expresión genética con la que cuentan los genes ORF1ab, S, M y N de SARS-CoV-2. De igual manera, en el estudio realizado por Valadan y colaboradores (2021), buscaron determinar la expresión genética de los genes RdRp, N, y E de SARS-CoV-2. Diseñaron cebadores específicos y un protocolo de rRT-qPCR para comparar el valor Ct de cada gen. Los resultados arrojaron que el nivel de expresión genética de N es superior, por lo que este gen podría ser un blanco sensible, comparado con los genes E y RdRp en la detección de SARS-CoV-2 por medio de rRT-qPCR. También se sugiere, que el diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-

qPCR, es un método viable y acertado cuando se utilizan los genes blanco N, E, y RdRp (Valadan et al., 2021).

1.2.1.2 Linajes de SARS-CoV-2 y su prevalencia para la detección del virus

1.2.1.2.1 VOCs, VOIs y VUMs

Estas variantes, presentan mutaciones que les brindan características que les permiten competir y ser los linajes prevalentes durante la pandemia (Curran et al., 2021). Se ha reportado que las VOCs tienen una carga viral mayor, asimismo, cuentan con una capacidad mejorada de evadir el sistema inmune. Toda esta evidencia, apunta a que las VOC tienen una mayor transmisibilidad (Curran et al., 2021). Un claro ejemplo es el caso de B.1.1.7 (Alpha), que reporta Curran y colaboradores (2021). Esta variante es una VOC que tiene una probabilidad de entre 45-71% de ser transmitida, mucho mayor a variantes que no son VOC.

La prevalencia de estas variantes es notoria; en casos de COVID-19 de mexicanos vacunados, las variantes clasificadas como VOC y VOI: Delta, Gamma, Mu y Alpha, todavía lograban infectar a más del 88% de casos estudiados, mientras que en personas no vacunadas, fueron detectadas las variantes Delta (89.5%) y Gamma (10.5%). Este estudio fue realizado por Galán-Huerta et al. (2022), durante los meses de abril a agosto del año 2021, e ilustra, la alta probabilidad de diagnosticar variantes VOC, VOI y VUM.

1.2.1.2.2 Prevalencia de linajes de SARS-CoV-2 en México

A pesar de que el número de variantes que brotaron con el tiempo es muy grande, unas cuantas de estas prevalecen en México (Taboada et al., 2021). Un gran número de linajes de SARS-CoV-2 se originan diariamente; sin embargo, pueden contener mutaciones que no brindan ventaja competitiva ante otros linajes. Además, pueden enfrentarse a la acción de la deriva genética, lo cual puede ocasionar que ciertos linajes se pierdan, independientemente de su aptitud. En el primer año de pandemia en México, se observó este fenómeno, en donde seis linajes representaron más del 76% de los casos de COVID-19 (Taboada et al., 2021).

El porcentaje de prevalencia no es él mismo en todo el mundo. Por ejemplo, la variante Alpha (B.1.1.7), desde su inserción en México, presentó un comportamiento en el que se incrementó la transmisibilidad de esta, y aunque en otros países presentó una

mayor incidencia, en el país no pudo desplazar otras variantes prevalentes como B.1.1.519, durante febrero y mayo del 2021 (Zárate et al., 2022).

1.2.1.2.3 Turismo en México y el intercambio de variantes de SARS-CoV-2

México tiene dos de los aeropuertos internacionales más importantes del mundo, representando un punto de entrada para nuevas variantes de SARS-CoV-2, provenientes del exterior (Taboada et al., 2020). Al principio de la pandemia, se calculó que el riesgo de que este nuevo coronavirus llegará a México era muy alto y crecería linealmente con el tiempo, con una probabilidad del casi 90% de infección después de un año. A pesar de no haber vuelos directos con la ciudad china de Wuhan, los contagios se desencadenarían por casos provenientes de otros países (Yamamoto-Elizalde et al., 2020).

Los diecisiete primeros casos de COVID-19 en México fueron analizados por Taboada et al. (2020), donde 14 casos, con historial de viaje, fueron contagiados por variantes de SARS-CoV-2 provenientes de Norteamérica y Europa. Solo 3 de los 17 casos no presentaban historial de viaje.

Un análisis filogenético de las variantes de Omicron colectadas en México y de sus parientes internacionales más cercanos, nos muestra los eventos de intercambio de variantes, en donde secuencias mexicanas pueden encontrarse alrededor del mundo. Asimismo, numerosos eventos independientes de intercambio entre México y EUA, han sucedido. Estos fenómenos pueden explicarse por medio del turismo (Cedro-Tanda et al., 2022).

1.2.1.3 Estandarización y Validación del ensayo RT-qPCR

El diseño y la optimización del ensayo RT-qPCR puede ser dificultoso, sin embargo, la ventaja de este proceso consiste en la estandarización de su protocolo, al modificar los componentes y así adaptarse para identificar virus respiratorios (van Elden et al., 2004).

Por otro lado, para determinar que un ensayo molecular para el diagnóstico de enfermedades infecciosas cumpla con los requerimientos establecidos, se debe llevar a cabo una verificación y una validación. El primer término se refiere a la confirmación por medio de evidencia objetiva de que los requerimientos han sido cumplidos; el segundo término es similar al primero, con la diferencia que este último toma en cuenta

el propósito del ensayo (Burd, 2010). Las características que el ensayo debe de cumplir, la cuales deben validarse y verificarse, son las siguientes: especificidad, rango reportable, sensibilidad analítica y precisión (Burd, 2010).

1.2.1.3.1 Especificidad

La especificidad analítica se refiere a la capacidad del ensayo de detectar solo el blanco para el que se diseñó la prueba. Microorganismos con estructura genética similar, microbiota humana u organismos que causen una enfermedad similar o bien con los que pueda existir una co-infección, deben ser probados y garantizar que no habrá una amplificación si una muestra es analizada. Para comprobar la especificidad del ensayo, se deben probar muestras con el material que pueda interferir con la prueba (Burd, 2010).

1.2.1.3.2 Rango reportable

El rango reportable son los valores de los resultados que el laboratorio define podrán ser detectados. Se usa un experimento lineal para determinar el rango reportable de un ensayo; se analizan muestras de diferentes concentraciones conocidas, por lo que se hacen diluciones 1:2, 1:5 o 1:10. Los límites del rango reportable son los resultados que arrojan las muestras analizadas de mayor y menor concentración. Para analizar estadísticamente la información, se realiza una regresión lineal (Burd, 2010).

1.2.1.3.3 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es la capacidad del ensayo de detectar concentraciones bajas de cierta sustancia en un espécimen biológico. Se conoce también como el "límite de detección" (LOD). LOD es la menor concentración que se puede detectar. Entre menos concentración pueda ser detectada, la mayor sensibilidad analítica tendrá el ensayo (Burd, 2010).

El valor de LOD debe de ser menor al límite del rango reportable de menor concentración. Este valor se determina empíricamente, al analizar diluciones seriadas de muestras con concentración conocida. Las muestras utilizadas para este experimento deben de estar bien caracterizadas. Para el análisis estadístico, se utiliza el análisis probit (Burd, 2010).

1.2.1.3.4 Precisión

La precisión es la capacidad del ensayo de entregar el mismo resultado si se analizan diferentes alícuotas de una misma muestra homogénea. La precisión está relacionada a errores causados por la aleatoriedad. No tiene un valor numérico, pero puede expresarse como alto, medio o bajo. También puede utilizarse el término "reproducibilidad" (Burd, 2010).

Para ser evaluada, debe llevarse a cabo un experimento de replicación, para observar cómo varían los resultados que se generen, realizados bajo las mismas condiciones de laboratorio. Estos experimentos deben analizar concentraciones que cubran el rango de medición del ensayo. Se utilizan muestras con concentraciones conocidas y para analizar los resultados, se puede llevar a cabo una desviación estándar (Burd, 2010).

Planteamiento del problema

En la pandemia se desarrollaron numerosas pruebas RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2, y como consecuencia de la emergencia sanitaria, éstas fueron diseñadas con la información genética disponible, la variabilidad genética del virus limitó la capacidad diagnóstica de las pruebas, que podía generar falsos negativos debido a variantes nuevas. Como cada país, en México la pandemia tuvo un desarrollo único, por lo que se requiere responder a las necesidades propias para la detección de SARS-CoV-2, tomando en cuenta la diversidad del virus, tipo de linajes circulantes, así como la selección de regiones genéticas conservadas y la persistencia de variantes en el país; por esta razón, es indispensable contar con pruebas que consideren diversidad genética del virus en el diseño, lo que podría contribuir además a una vigilancia epidemiológica mas eficiente.

Justificación

La pandemia provocada por la COVID-19 llevó a la necesidad de desarrollar pruebas diagnósticas para detectar el virus SARS-CoV-2 a nivel mundial, el ensayo RT-qPCR se estableció como el estándar de oro debido a su alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, se sabe que el desarrollo de la pandemia fue propio para cada país. Este trabajo propone el diseño de una prueba de RT-qPCR, con la capacidad de detectar las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en México. Con este fin, se seleccionaron linajes que incluyeron variantes que pueden estar en el país debido a su importancia

epidemiológica, clínica, genética, así como por su posible llegada por intercambio turístico. Así mismo, se consultaron diferentes bases de datos para recopilar las secuencias de variantes pertenecientes a los linajes seleccionados y se identificaron secuencias conservadas de los blancos moleculares elegidos. De esta manera, el diseño buscó contar con una prueba confiable para detectar las variantes de importancia para la salud en México.

Hipótesis

- El diseño *in silico* de una prueba RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2 en México permite la propuesta metodológica de su proceso.
- **Hipótesis nula:** El diseño *in silico* de una prueba RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2 en México no es factible, así como la propuesta de su proceso metodológico.

Objetivos

General:

- Diseñar *in silico* una prueba de RT-qPCR múltiple para la detección de SARS-CoV-2 en México.

Específicos:

- Seleccionar las variantes relevantes para diseñar la prueba de RT-qPCR para la detección del virus SARS-CoV-2, de acuerdo a criterios de inclusión y exclusión establecidos.
- Realizar el diseño *in silico* de cebadores y sondas para la prueba RT-qPCR múltiple para la detección de SARS-CoV-2.
- Proponer la estandarización en prueba húmeda del protocolo RT-qPCR múltiple diseñado para la detección de SARS-CoV-2.
- Proponer el diseño de la validación y verificación del ensayo RT-qPCR múltiple para la detección de SARS-CoV-2.

Material y métodos

1. Selección de secuencias

1.1 Selección de linajes de SARS-CoV-2

Después de llevar a cabo una revisión bibliográfica, con el fin de seleccionar los linajes que se consideraron en este estudio, se establecieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- 1) Linajes clasificados como VOC, VOI o VUM.
- 2) Linajes presentes en México.
- 3) Linajes presentes en países que están relacionados con México por medio del turismo.

Criterios de exclusión

- 1) Linajes extintos o no circulantes.
- 2) Linajes presentes en países no turistas.

La recaudación de la información se llevó a cabo durante el año 2021. La información de los linajes, que respondían a al menos 2 de los criterios de inclusión, fue recuperada de las plataformas Outbreak.info y Cov-lineages.org; así como información del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés), la Secretaría de Salud y la Secretaría de Turismo del Gobierno de México. Las secuencias de los genomas y genes de las variantes pertenecientes a los linajes seleccionados, fueron recuperadas de la base de datos de NCBI.

1.2 Selección de coronavirus filogenéticamente cercanos a SARS-CoV-2

Se seleccionaron dos coronavirus de murciélago filogenéticamente cercanos a SARS-CoV-2: RaTG 13 y RpYN06. Las secuencias de los genomas y genes de los coronavirus seleccionados se recuperó de la base de datos de NCBI, así como de la secuencia de referencia de SARS-CoV-2.

2. Selección de biomarcadores

2.1 Selección de biomarcadores para la detección de SARS-CoV-2

De acuerdo a la literatura consultada, para el diseño de cebadores y sondas, se seleccionaron los genes blanco: RdRp, E y N de SARS-CoV-2. La secuencia de estos genes está altamente conservada, además de contar con un nivel de expresión genética alto.

2.2 Selección de biomarcador humano como control interno

El gen humano que codifica para la RNAsa P funge como control interno dentro del ensayo. Según la literatura consultada, esta proteína es una enzima que puede encontrarse en todas las células y en todos los compartimentos celulares, por esta razón es comúnmente usado como control interno en diversos protocolos.

3. Diseño *in silico*

3.1 Alineamiento de secuencias para la ubicación de zonas conservadas

Las variantes seleccionadas según los criterios de inclusión y exclusión formaron parte de los alineamientos múltiples, además de la secuencia de referencia de SARS-CoV-2 y también la secuencia de los coronavirus de murciélago: RaTG 13 y RpYN06. Con ayuda del software MAFFT se realizaron dos tipos de alineamientos múltiples:

1. Entre la secuencia de los genomas completos
2. Entre la secuencia de los genes RdRp, E y N

Se utilizó el software bioinformático UGENE como visualizador de las secuencias alineadas.

3.2 Diseño de cebadores y sondas

Se utilizaron los softwares: Primer-BLAST, Oligo Explorer 1.1.2 y Primer3Plus. La primer herramienta se utilizó como un primer filtro para ubicar zonas amenas para el diseño de los cebadores y sondas según los alineamientos llevados a cabo; con la segunda, debido a su interfaz amigable, se seleccionó la ubicación de los blancos y se determinó el valor ΔG , auto-apareamientos y apareamientos entre cebadores; con el último software, se determinaron las temperaturas de los cebadores y sondas, ya que esta herramienta arroja temperaturas muy cercanas a la realidad. Para el diseño de los cebadores y sonda del gen humano RNasa P, que fungirán como control interno, se

utilizó la secuencia encontrada en NCBI y se utilizaron las mismas herramientas bioinformáticas anteriormente mencionadas.

3.3 Comprobación de especificidad *in silico*

Para comprobar la especificidad de los cebadores y sondas, se analizaron las secuencias con la herramienta BLASTN, la cual compara la secuencia de los cebadores y sondas con las secuencias de los genomas encontrados en la base de datos.

4. Control positivo

Se considera incluir un control positivo para usar como una muestra de concentración conocida. El plásmido deberá contener secuencias blanco consideradas en la prueba, y se basará en el plásmido pjet2.1.

5. Diseño de la fase húmeda

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica para proponer la realización experimental de la prueba RT-qPCR en su fase húmeda, constará de lo siguiente: protocolo inicial, validación de especificidad, estandarización del protocolo y determinación de la sensibilidad.

Resultados

1. Selección de linajes según criterios de exclusión e inclusión

Después de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron linajes que cumplieran con al menos dos criterios de inclusión. En el Cuadro 1 se encuentran enumerados dichos linajes de SARS-CoV-2 y los criterios cumplidos. En total, se incluyeron 27 secuencias de variantes pertenecientes a los linajes seleccionados.

2. Diseño *in silico*

2.1 Alineamiento múltiple

De los 4 alineamientos múltiples realizados, 3 de ellos por cada gen blanco y 1 de todo el genoma, 30 secuencias fueron incluidas en los alineamientos múltiples, de las cuales: 27 secuencias pertenecen a los 27 linajes de SARS-CoV-2 seleccionados y las 3 secuencias restantes pertenecen a los coronavirus: SARS-CoV-2 (secuencia de referencia), RaTG 13 y RpYN06.

Cuadro 1. Se enlistan los 27 linajes de SARS-CoV-2 que cumplieron con los criterios establecidos, presentadas con la nomenclatura de PANGO, seleccionadas para formar parte del alineamiento múltiple realizado para este trabajo. Cada columna representa la plataforma o base de datos consultada y se muestra la clasificación destinada a cada linaje. En el caso de la plataforma outbreak.com, esta tiene información sobre la clasificación y el porcentaje de casos en México que presentaron esa variante. La base de datos de PANGO lineages cuenta con información de todo el mundo sobre la presencia de linajes.

Linajes	WHO	CDC	ECDC	PHE	Secretaría de salud	Outbreak.info	PANGO lineages
	Clasificación	Clasificación	Clasificación	Clasificación	Clasificación	Clasificación	Presencia en países turistas
AV.1	VuM		VuM	Vol		Vol	<0.5%
AY.1 (Delta)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	
AY.2 (Delta)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	<0.5%
AY.3 (Delta)		VoC				VoC	<0.5%
B.1							1%
B.1.1.318	VuM		VuM	Vol		Vol	<0.5%
B.1.1.519	VuM						16%
B.1.1.7 (Alpha)	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	16%
B.1.351.2 (Beta)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	<0.5%
B.1.351.3 (Beta)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	
B.1.351 (Beta)	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	<0.5%
B.1.427 (Epsilon)	VuM	Vol	Vol	VuM	Vol	Vol	1%
B.1.429 (Epsilon)	VuM	Vol	Vol	VuM	Vol	Vol	1%
B.1.525 (Eta)	Vol	Vol	Vol	Vol	Vol	Vol	
B.1.526 (Iota)	Vol	Vol	VuM	VuM	Vol	Vol	1%
B.1.617 (Kappa)		Vol			Vol		<0.5%
B.1.617.1 (Kappa)	Vol	Vol	Vol	Vol		Vol	<0.5%
B.1.617.2 (Delta)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	8%
B.1.617.3		Vol	VuM	Vol		Vol	
B.1.621 (Mu)	VuM	Vol					2%
C.36.3	VuM			Vol		Vol	
C.37 (B.1.1.1.37) (Lamda)	Vol		VuM	Vol		Vol	1%
P.1 (B.1.1.28.1) (Gamma)	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	VoC	11%
P.1.1 (B.1.1.28.1.1) (Gamma)	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	4%
P.1.2	VoC	VoC	VoC	VoC		VoC	
P.2 (B.1.1.28.2) (Zeta)	VuM		VuM	Vol	Vol	Vol	<0.5%
P.3 (Theta)	VuM		Vol	Vol		Vol	

2.1.1 Ubicación de zonas conservadas

Se encontraron las zonas conservadas, aptas para servir como blanco del diseño de cebadores y sondas. El alineamiento múltiple de secuencias de SARS-CoV-2 y de sus parientes cercanos, demostró que las secuencias de los genes E, N y RdRp están bien conservadas, al encontrar regiones ideales para el diseño de cebadores y sondas.

2.2 Blancos elegidos, diseño de cebadores y diseño de sondas

De acuerdo a lo observado en los alineamientos múltiples, se obtuvieron cebadores y sondas para la amplificación de los genes N, E y RdRp de SARS-CoV-2; además de un

par de cebadores y sonda que son complementarios al gen humano RNAsa P, este juego se diseñó, únicamente, en base a la secuencia de este gen. Los cebadores control, diseñados para este protocolo, se alinean en un límite exón/exón. Las características de cada cebador, sonda y amplicones, son presentadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Se enlistan las características de cada uno de los cebadores y sondas diseñados.

Blanco	Cebadores y sondas	Tamaño (pb)	Tm(C)	GC%	dG (kcal/mol)	Autoalineamiento (dG) (kcal/mol)	Loops (dG) (kcal/mol)	Tamaño de amplicon (pb)
N	Sentido	17	55.4	52.9	-33.2	0	0	92
	Antisentido	18	55.6	55.6	-32.8	0	0	
	Sonda	24	60.9	41.7	-44.7	-1.2	0.43	
E	Sentido	18	54.6	55.6	-33.4	-0.43	0	150
	Antisentido	22	55.4	40.9	-37.8	0	0	
	Sonda	21	60.3	42.9	-40.1	0	0	
RdRp	Sentido	19	54.8	47.4	-34.2	0	0	117
	Antisentido	18	55.5	50	-34.7	0.78	0	
	Sonda	25	58.8	32	-43.7	-3.84	0.43	
RNAsa P	Sentido	19	54.8	42.1	-34.9	0	0	105
	Antisentido	19	54.9	42.1	-34.4	-0.6	0	
	Sonda	26	61.6	30.8	-47.1	-2.16	0	

2.3 Comprobación *in silico* de especificidad de cebadores y sondas

La secuencia de cada cebador y sonda se analizó en la plataforma BLASTN para determinar su homología con las secuencias de las bases de datos. Los resultados de la comprobación *in silico* mostraron que los cebadores y sondas diseñados, fueron específicos para SARS-CoV-2 y no mostraron complementariedad con alguna secuencia genómica de virus o bacterias causantes de enfermedades respiratorias, tampoco se encontró similitud con las secuencias de los genes humanos. Por lo que el análisis *in silico* demuestra la especificidad del diseño.

3. Diseño de la fase húmeda

3.1 Propuesta para el desarrollo experimental de la prueba diagnóstica

3.1.1 Especificidad analítica

El ensayo RT-qPCR tendrá que probarse con diferentes templates, es decir, con muestras que contengan diferentes virus y bacterias que provoquen el mismo cuadro sintomatológico. Lo que se espera, es la ausencia de amplificación, ya que solo debe detectar SARS-CoV-2. Este paso se lleva a cabo por medio de PCR.

El ensayo, puede probarse con diferentes microorganismos respiratorios, como: *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria*

meningitidis. Al igual que con otros coronavirus humanos, como: NL63, OC43, 229E, HKU1, MERS-CoV y SARS-CoV-1; los virus de la influenza también pueden ser probados: influenza A (pdm09 H1N1, H3N2).

3.1.2 PCR's individuales y su estandarización

Para la estandarización de las concentraciones, temperaturas y tiempos que requiere cada par de cebadores y su sonda, en un ensayo de RT-qPCR, se debe probar cada uno de los pares y sondas por separado, es decir, en un ensayo RT-qPCR simple. De esta manera, usando un valor de referencia (Cuadro 3) (Cuadro 4), y moviendo el valor para alejarlo del original, se crea un gradiente de valores que se evaluarán. Cada reacción debe hacerse por triplicado.

Los gradientes que se tienen que llevar a cabo, tomando condiciones de partida, son: gradiente de temperatura de alineamiento, gradiente de concentración de cloruro de magnesio, gradiente de concentración de cebadores, gradiente de concentración de sondas, gradiente de concentración de DNA polimerasa y gradiente de concentración de dNTPs (Cuadro 5).

Ya que se haya diseñado una RT-qPCR simple con cada uno de los juegos de cebadores y sondas, es momento de realizar una RT-qPCR duplex; se deben de probar cada uno de los juegos junto con los

Cuadro 3. Reacción de partida. Se proponen las siguientes concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción.

Reacción de partida	
Concentraciones finales	
Cebadores	10 µM
dNTPs	200 µM
Mg	1.5 mM
Taq	1U
RNA molde	500 ng
RT	1U
Sonda	10 µM
Buffer	1X

Cuadro 4. Protocolo de partida. De acuerdo con las características mostradas en la reacción de partida, se propone el siguiente protocolo de amplificación.

Protocolo de partida			
	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
RT	55 °C	20 min	X1
Desnaturalización	95 °C	3 min	X1
Amplificación	95 °C	30 seg	x45-50
	55 °C	15 seg	
	72 °C	10 seg	
Cooling	40 °C	30 seg	X1

Cuadro 5. Gradientes que deben de llevarse a cabo siguiendo las concentraciones y temperaturas de partida.

	Rango
Temperatura de alineamiento	52°C-58°C, con intervalos de 1 °C
Concentración de cloruro de magnesio	0.5 mM-2.5 mM, con intervalos de 0.5 mM
Concentración de cebadores	4 µM-16 µM, con intervalos de 2 µM
Concentración de sondas	4 µM-16 µM, con intervalos de 2 µM
Concentración de DNA polimerasa	0.4 U-1.6 U, con intervalos de 0.2 U
Concentración de dNTPs	140 µM-260 µM, con intervalos de 20 µM

cebadores y sonda control (los diseñados para la amplificación del gen humano RNAsa P). De igual manera, se debe estandarizar cada componente de la reacción para que el ensayo funcione de manera óptima.

Una RT-qPCR múltiple es el último paso de la estandarización. Todos los juegos de cebadores y sondas se incluirán en la misma reacción usando el valor de concentración de cada reactivo que coincida con haber logrado una amplificación óptima de cada blanco individual; cada uno de los blancos debe amplificarse satisfactoriamente para que este ensayo sea el final. A partir de aquí, el ensayo completo deberá ser evaluado para determinar si su desempeño es el indicado.

3.2 Propuesta para la estandarización experimental y sensibilidad

3.2.1 Rango reportable

Para determinar el rango reportable, se propone trabajar por triplicados de muestras del control positivo (plásmido), con diluciones base 10. Los resultados del valor Ct deben analizarse estadísticamente con una regresión lineal, para así obtener el rango del valor Ct y la mínima y máxima concentración que puede detectar el ensayo RT-qPCR.

3.2.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad del ensayo se adquiere al medir el LOD. El valor de LOD se determina con diluciones base 10 triplicadas, la concentración debe ser conocida. Se propone el análisis estadístico llamado probit para analizar los resultados del valor Ct.

3.2.3 Precisión o reproducibilidad

Para justificar que el ensayo cumple con este factor, el ensayo debe realizarse con muestra de pacientes con SARS-CoV-2 detectado, o con plásmido que contengan genes clonados de SARS-CoV-2 a diferentes concentraciones (cubriendo el rango detectable) y por triplicados. Para el análisis estadístico, se recomienda una desviación estándar.

4. Controles

Como control negativo externo, se puede utilizar agua estéril. El control positivo debe ser un transcrito de los genes blanco de SARS-CoV-2 a amplificar, insertado en un plásmido. Para la validación del ensayo, de igual manera se puede hacer uso del plásmido como templete, ya que se necesita de un molde de concentración conocida.

Discusión

El software MAFFT es una herramienta bioinformática que ha sido utilizada por diversos autores en sus diseños de ensayo RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2; el alineamiento múltiple que llevaron a cabo Dharavath y colaboradores (2020), fue realizado con la herramienta MAFFT.

La alineación múltiple de secuencias, se llevó a cabo con secuencias de SARS-CoV-2 y con secuencias de coronavirus relacionados a SARS-CoV-2. En el trabajo de Dharavath y colaboradores (2020), realizaron un alineamiento múltiple con 93 secuencias de SARS-CoV-2, 6 secuencias de coronavirus humanos y con más de 27,000 secuencias de virus relacionados a SARS-CoV-2.

El análisis de los genes blanco coincide con lo reportado previamente (Guan et al., 2020; Li et al., 2020; Tang et al., 2020) y justifica el haberlos elegido para este diseño. Estos tres genes mencionados son normalmente seleccionados como el blanco de las pruebas moleculares RT-qPCR y se han convertido en los objetivos estándar de estos ensayos diagnósticos, ya que son genes altamente conservados en todos los sarbecovirus (Guan et al., 2020; Li et al., 2020; Tang et al., 2020).

La selección de estos genes conservados como blancos para las pruebas diagnósticas rRT-qPCR se pudo ver desde el inicio de la pandemia. El primer protocolo que desarrolló la CDC amplifica tres fragmentos del gen N; este diseño es muy similar a los ensayos diagnósticos de SARS-CoV-2 y MERS-CoV, los cuales tuvieron un desempeño satisfactorio (Holshue et al., 2020).

Chu et al. (2020), diseñaron una prueba diagnóstica rRT-qPCR que amplifica segmentos de los genes ORF1ab y N. En Alemania, Corman et al. (2020), su ensayo tienen como objetivos los genes E y RdRp. La CDC de China recomienda cebadores que amplifiquen los genes ORF1ab y N. La universidad de Hong Kong desarrolló un protocolo de rRT-qPCR que detecta, en primera instancia, el gen N y como ensayo confirmatorio, el gen ORF1b (Yan et al., 2020).

New England Biolabs diseñó un juego de cebadores para la amplificación del gen humano que codifica para la proteína RNasa P, difieren del juego diseñado por el CDC al no estar diseñados para aparearse con un límite entre exón/exón, esto podría provocar la amplificación de DNA inexacto por la contaminación de DNA genómico. Por esta razón, se recomienda el diseño de cebadores que puedan amplificar un límite entre exón/exón (New England Biolabs, 2022 & Thermo Fisher Scientific, 2022). El juego de cebadores diseñados en este estudio para el gen humano, fueron diseñados de igual forma que New England Biolabs.

Para el diseño de cebadores y sondas, de este trabajo, se utilizaron tres herramientas bioinformáticas: Primer 3 Plus, Primer-BLAST y Oligo analyzer. Primer3 Plus, ha sido empleada en diversos trabajos con el fin de diseñar cebadores y sondas para ensayos RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2 (Dharavath et al., 2020; Noor et al., 2021; Tombuloglu et al., 2021).

La segunda herramienta conocida como Primer-BLAST; fue utilizado por los autores Dharavath et al. (2020) y Noor et al. (2021), para el reconocimiento de zonas que podrían ser aptas para el diseño de cebadores y sondas, para un ensayo rRT-qPCR que detecte el virus SARS-CoV-2.

El éxito del ensayo rRT-qPCR depende de los cebadores y sondas, por lo que se tiene que tomar en cuenta ciertos criterios para que el funcionamiento de estos sea el mejor; Rodríguez et al. (2015) menciona que el contenido GC de los cebadores y sondas tiene

que estar en un rango del 30% y el 80%, los diseños presentados en este trabajo se encuentran dentro de este rango (Rodríguez et al., 2015).

La temperatura de alineación ideal para los cebadores está entre los 50 y 60 °C, además, la diferencia de temperatura entre los cebadores "sentido" y "anti-sentido" no debe ser de más de 2 °C (Rodríguez et al., 2015). En este trabajo, todos los cebadores tienen una temperatura de alineación que ronda los 54 y 55 °C.

La temperatura de alineación de las sondas, debe ser mayor a la de los cebadores para asegurar que estos se unan fuertemente a su secuencia blanco, durante la fase de alineación (Rodríguez et al., 2015). La temperatura de las sondas diseñadas para cada uno de los juegos de cebadores, está entre los 58 y 61 °C.

Por otra parte, el ensayo RT-qPCR será múltiple y requiere que todos los pares de cebadores compartan una temperatura similar (Rodríguez et al., 2015); en este trabajo, todos los cebadores cumplen con este factor. Wang & Seed (2007), recomiendan que un cebador no contenga más de 6 nucleótidos iguales y continuos. Ninguno de los cebadores y sondas aquí presentados cuentan con esta característica.

El tamaño de los cebadores y las sondas debe rondar entre los 15 y 30 pares de bases (Rodríguez et al., 2015), factor cumplido por todos los cebadores y sondas diseñados. Los fragmentos amplificados por cada par de cebadores deben tener un tamaño de entre 50-150 pares de bases para una alta eficiencia de la reacción (Rodríguez et al., 2015). El tamaño de los amplicones generados por los cebadores aquí presentados, se encuentra dentro del rango, al ser el más pequeño de 92 pares de bases y el más grande de 156 pares de bases.

Para asegurar un fuerte apareamiento de los cebadores y el DNA molde, Rodríguez et al. (2015), aconseja que en el extremo 3' se encuentre al menos una guanina o citosina. El grupo de cebadores y sonda que tiene como objetivo el gen E cuenta con una guanina y una citosina al final del extremo 3', al igual que el par de cebadores y sonda que amplifica al control interno (RNasa P), que cuentan con al menos una guanina o citosina. En cada grupo de cebadores y sonda diseñados en este trabajo, al menos un cebador o sonda cuenta con una base nitrogenada, en el extremo 3', que asegure el apareamiento de estos.

Con el fin de incrementar la especificidad, se debe evitar que los cebadores tengan alineaciones no específicas: entre los pares, entre los mismos cebadores por autocomplementariedad o bien, la formación de horquillas. Para evitar que este factor afecte el desempeño de los cebadores, se debe evitar la complementariedad de más de 4 pb (pares de bases) (Quellhorst & Rulli, 2008).

El juego de cebadores para el gen N no presenta autocomplementariedad, ni formación de horquillas, solo alineación entre el par de cebadores que no supera las 4 pb. La sonda dirigida a este gen, presenta alineaciones no específicas que, igualmente, no superan las 4 pb. El cebador "sentido" para el gen E, presenta autocomplementariedad no mayor a 4 pb, mientras que el "antisentido" y la sonda, no muestra ninguno. Los cebadores y sondas diseñados para RdRp, tampoco presentan una mayor autocomplementariedad a 4 pb.

Después de la elección del blanco a amplificar y el diseño de cebadores y sondas, siguiendo el flujo del procedimiento que recomienda Rodríguez et al. (2015), el siguiente paso es la validación de los cebadores y sondas. Como punto de partida, se debe elaborar una validación *in silico* de la especificidad de estos. Por ejemplo, La FDA recomienda, para el diseño de cebadores para el diagnóstico de SARS-CoV-2, un análisis *in silico* de los cebadores y sondas, comparándolos con flora respiratoria y otros patógenos virales, como mínimo (Anahtar et al., 2021).

Es muy importante que los cebadores no presenten complementariedad con patógenos que causen síntomas iguales o similares a SARS-CoV-2, o, patógenos que se encuentren en los mismos lugares anatómicos que este. También se debe evitar la homología con microorganismos comensales (Anahtar et al., 2021).

BLAST es un algoritmo que permite la búsqueda de secuencias similares en una base de datos. Este algoritmo es el preferido para llevar a cabo la comprobación de la especificidad de los cebadores y sondas (Rodríguez et al., 2015; Wang & Seed, 2007), por lo que fue elegido en este trabajo para cumplir con este punto.

BLAST es utilizado por múltiples autores para hacer la validación *in silico* de los cebadores y sondas diseñados para un ensayo de detección del virus SARS-CoV-2; Dharavath y colaboradores (2020), hacen uso del algoritmo BLAST para la validación *in silico* de los cebadores y sondas diseñados, para comprobar su especificidad. Gadkar

et al. (2021), de igual manera, utiliza este software para validar los cebadores de su ensayo triplex RT-qPCR. Miyata & Ouchi (2020), confirman especificidad con BLAST.

Los resultados de la validación *in silico* por medio del algoritmo BLAST, permite observar la especificidad de los cebadores y sondas aquí descritos, al no presentar homología con otros tipos de coronavirus humanos u otro tipo de virus respiratorios.

Las temperaturas y ciclos que se mencionan en este estudio, están basadas en diferentes protocolos de RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Tal y como recomienda Espinosa-Asuar, (2014). Los protocolos del Instituto Pasteur, de Berlín, de Alemania y de la CDC, fueron revisados para diseñar el protocolo de este trabajo.

La desnaturalización, es un paso que se efectúa de 92 a 95 °C, por 2 a 5 minutos (Grunenwald, 2003). En todos los protocolos revisados de RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2, la temperatura seleccionada para este paso es de 95 °C, la misma escogida para el paso de desnaturalización de este trabajo. El tiempo seleccionado es de 3 minutos, el mismo utilizado por Corman, et al. (2020).

Para la amplificación, se recomienda una primera fase de desnaturalización, de entre 90 y 98 °C, por 10 segundos a 1 minuto (Grunenwald, 2003). En los protocolos revisados, esta primera fase es de 95 °C por 15 segundos. La alineación de los cebadores y sondas, se llevará a cabo a la temperatura de alineación con la que cuentan, por 30 segundos. Este paso deberá repetirse de 45 a 50 veces, definido por los protocolos.

La concentración de los reactivos tendrá que estandarizarse, como se discutirá más adelante, sin embargo, se propone una concentración inicial, basada en los protocolos mencionados. Se recomienda agregar a la reacción, 5 µl de muestra, al igual que el protocolo del Instituto Pasteur. La concentración estándar de dNTPs recomendada por Espinosa-Asuar (2014), es de 200µM, formado por partes iguales de los 4 dinucleótidos.

La concentración de Magnesio recomendada, es de 1.5 mM, al igual que propone Espinosa-Asuar (2014). La enzima tendrá una concentración de 1U (Espinosa-Asuar, 2014). Y la concentración inicial de cebadores y sondas, será de 10 µM, de la misma forma que el protocolo del Instituto Pasteur y Espinosa-Asuar (2014).

Una vez terminado el diseño y la validación *in silico* de los cebadores y sondas, la optimización de condiciones del ensayo RT-qPCR puede llevarse a cabo (Rodríguez et al., 2015). Para realizar este tipo de validación se puede realizar una PCR en tiempo real y analizar el valor Ct, o, una PCR y analizar la amplificación con electroforesis (Rodríguez et al., 2015 & Wang & Seed, 2007). En este trabajo, se menciona la realización de este paso para encontrar las concentraciones necesarias de cada componente de la reacción, así como temperaturas y tiempos.

Para diseñar un experimento en el que se debe investigar la influencia de una serie de factores hacia una variable, se puede usar un método llamado "un factor por vez"; en un solo experimento, un solo factor es probado. Los demás factores son modificados después, de igual forma, en experimentos individuales (Boleda, et al., 1996). Este enfoque es retomado en este trabajo para diseñar los experimentos de optimización.

Para llevar a cabo la optimización de las condiciones, en este estudio, se recomienda realizar una PCR simple. Así, se puede montar la técnica con condiciones estándares (las recomendadas en este estudio), para después hacer las modificaciones necesarias (Espinosa-Asuar, 2014).

Para verificar que las concentraciones, los tiempos y temperaturas establecidos para la PCR simple, fueron exitosos, se puede realizar una electroforesis con la muestra procesada y checar los resultados en el gel de agarosa. Los factores que se deben de observar, son los siguientes: presencia de banda en el gel, tamaño de banda, bandas inespecíficas, y presencia de manchas (Grunenwald, 2003).

Si las temperaturas iniciales no brindan resultados satisfactorios, se da lugar a la modificación de temperaturas de alineamiento (Espinosa-Asuar, 2014). Para optimizar los cebadores diseñados por Kalita et al. (2021), para un ensayo diagnóstico RT-qPCR múltiple para SARS-CoV-2, realiza ensayos PCR, en donde hace un gradiente de temperatura con cada par de cebadores, basado en la temperatura de alineación de cada uno.

De igual forma, Park y colaboradores (2020), verificaron sus cebadores con un gradiente de temperatura en PCR para estandarizar su protocolo RT-qPCR de detección de SARS-CoV-2. Noor et al. (2021) sigue la misma metodología para establecer las temperaturas utilizadas en el protocolo RT-qPCR diseñado.

La concentración de magnesio es un factor relevante en la reacción. Esta, afecta de manera negativa diferentes factores cuando la concentración no está optimizada. Para obtener la concentración adecuada para cada juego de cebadores, se debe realizar una rampa de magnesio, la cual consiste en probar un rango de diferentes concentraciones de este reactivo (Espinosa-Asuar, 2014 & Grunenwald, 2003).

Uno de los factores para considerar el éxito del desempeño del ensayo RT-qPCR múltiple en tiempo real, es la concentración de los cebadores y sondas (Rodríguez et al., 2015). Además de su diseño correcto, discutido anteriormente, el uso de una concentración adecuada es de suma importancia para una amplificación satisfactoria (Grunenwald, 2003).

Al igual y cómo se señala en este trabajo, Noor et al. (2021) prueba los tres juegos de cebadores diseñados para un ensayo RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2, individualmente y en diferentes combinaciones para optimizar sus concentraciones. De forma similar, para optimizar las concentraciones de cebadores, Zhao et al. (2021), utilizaron una serie de distintas concentraciones para determinar cuál es la concentración óptima para cada uno de sus cebadores.

Otro ingrediente imprescindible en una reacción PCR de cualquier tipo, son los dinucleótidos (dNTPs). De forma similar al magnesio, la concentración de este reactivo puede ocasionar que la reacción no suceda de manera satisfactoria, así se encuentre en mayor o menor concentración (Espinosa-Asuar, 2014 & Grunenwald, 2003).

Los dNTPs deben probarse en diferentes concentraciones, para encontrar la cantidad adecuada. Hay que tomar en cuenta que es muy común que se añadan los dinucleótidos en una cantidad mayor a la requerida, por lo que se debe determinar la menor concentración a la que la reacción resultara exitosa (Grunenwald, 2003).

La enzima que más se utiliza en las reacciones de PCR, es la Taq DNA polimerasa. Su mejor desempeño es a 72 °C, temperatura que es normalmente usada en la mayoría de los protocolos. La concentración de esta enzima, oscila entre 1 U y 2.5 U por 100 µl, sin embargo, como en el caso de todos los reactivos, la concentración requiere de optimización de acuerdo a las características de la reacción (Grunenwald, 2003).

Para la estandarización de la RT-qPCR múltiple, se recomienda realizar experimentos de la misma forma que Tombuloglu et al. (2021): en primera instancia, un ensayo

simple con cada uno de los juegos de cebadores y sonda; después, realiza dos ensayos duplex en el que combina los cebadores y sonda que amplifica para el gen RdRp y para el gen humano, y de igual manera, los cebadores para E y el control interno; por último, realiza un ensayo múltiple en el que mezcla los tres juegos de cebadores y sonda, para amplificar dos genes virales (RdRp y E) y el control interno que es un gen humano (RNAsa P).

Después de determinar la concentración de los cebadores y sondas, se puede llevar a cabo la validación del ensayo utilizando secuencias validadas. En EUA, se siguen las especificaciones que propone la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Burd, 2010). Por consiguiente, dentro del diseño de la prueba RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 realizado para el presente trabajo, se incluyen los pasos necesarios para cumplir con dichas especificaciones.

Para determinar que un ensayo molecular para el diagnóstico de enfermedades infecciosas cumpla con los requerimientos establecidos, se debe llevar a cabo una verificación y una validación. La propuesta de este ensayo, toma en cuenta las características que el ensayo debe de cumplir y, que deben validarse y verificarse: rango reportable, sensibilidad analítica, precisión, y especificidad.

Para determinar el rango reportable en este trabajo, se siguen las especificaciones que propone Burd (2010), además, diversos diseños de ensayo RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2, también siguen estos pasos: Tombuloglu et al. (2021), hace una dilución serial 1:10 de templates y el resultado del valor Ct se grafica, contra la concentración de la muestra; Pabbaraju et al. (2021), calcularon el rango reportable con diferentes concentraciones de muestra y una regresión lineal para calcular los valores; el protocolo llamado "Validación de ensayos de SARS-coronavirus-2" (VALCOR, por sus siglas en inglés), recomienda las diluciones seriadas 1:10 para determinar el rango reportable (Arbyn et al., 2022).

Dentro del diseño del presente trabajo, las especificaciones propuestas por Burd (2010) para encontrar el valor de LOD, son consideradas. En los siguientes trabajos se sigue una metodología similar: Chung et al. (2021), diluyeron serialmente (concentración 1:10) muestras de cultivo de virus e hicieron triplicados para encontrar el valor de LOD; Tombuloglu et al. (2021), preparó una dilución 1:10 de RNA para encontrar el valor de

LOD para los genes RdRp y E; Nguyen y colaboradores (2022), utilizaron el análisis estadístico probit para definir el valor de LOD de su diseño de RT-PCR múltiple; En el diseño de Pabbaraju et al. (2021), la sensibilidad analítica fue determinada al probar diluciones 1:10 por triplicados. También, llevaron a cabo un análisis probit para determinar el valor de LOD; el protocolo llamado "Validación de ensayos de SARS-coronavirus-2" (VALCOR, por sus siglas en inglés), recomienda las diluciones seriadas 1:10 para determinar LOD (Arbyn et al., 2022).

Para este trabajo, se recomiendan las especificaciones de Burd (2010) para poder medir la precisión del ensayo, también, en diferentes diseños de ensayos RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2, podemos observar similitudes: Chung et al. (2021), utiliza como muestras, plásmidos que contienen clones de los genes blanco (RdRp y E), estas fueron diluidas serialmente con una concentración 1:10; Nguyen et al., (2022), utilizaron concentraciones distintas, donde cada una fue probada por triplicados; Pabbaraju et al. (2021), diluyeron serialmente muestras de SARS-CoV-2.

En este trabajo se considera comprobar la especificidad analítica del ensayo diseñado, y se considera diferentes templetas, que pueden utilizarse para comprobar este punto. En diferentes trabajos, detallan los templetas usados en su diseño: Chung et al. (2021), comprobó la especificidad del ensayo con 23 virus: coronavirus humano 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV, virus de la influenza A/H1N1pdm09, A/H3N2, B, adenovirus tipo 5, rinovirus, virus de la parainfluenza 1/2/3, virus sincitial respiratorio A/B, metapneumovirus, bocavirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, enterovirus, virus de la varicela zoster, y el virus hanta.

Corman et. al. (2020), probó su ensayo con otros coronavirus humanos: (HCoV)229E, NL63, OC43, HKU1 y MERS-CoV, en duplicado. Pabbaraju et al. (2021) utilizaron: coronavirus humanos (NL63, OC43, 229E, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-1), influenza A (pdm09 H1N1, H3N2), influenza B, virus sincitial respiratorio (A y B), virus de la parainfluenza (1, 2, 3, 4a, 4b), rinovirus, enterovirus, adenovirus, bocavirus, metapneumovirus humano, cytomegalovirus, virus del herpes (1 y 2), *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*.

El ensayo rRT-qPCR, debe contar con controles negativos y positivos, tal y como se describe en el presente trabajo. El control negativo es normalmente agua de nivel molecular, por otro lado, el control positivo son transcritos de los blancos del ensayo insertados en plásmidos para su clonación (Burd, 2010; Li et al., 2020).

Para evaluar el kit de Favaro y colaboradores (2021) utilizaron plásmidos con genes de SARS-CoV-2 insertados, para clonarlos y usarlos como templete para las pruebas. Miyata & Ouchi (2020), de igual forma, hacen uso de plásmidos para el desarrollo de su prueba rRT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2.

Conclusiones

- La selección de linajes para el alineamiento múltiple de secuencias permitió incluir linajes encontrados en México o que podrían llegar al país por medio del turismo, por lo que el ensayo diseñado es específico para México.
- La selección de linajes presenta una variedad de estos que se encuentran filogenéticamente lejanos, sin embargo presentan secuencias conservadas entre sí, por lo que las zonas seleccionadas como blanco pueden ser potencialmente capaces de detectar cualquier variante de SARS-CoV-2 que se origine a través del tiempo.
- Seleccionar linajes de acuerdo a los criterios creados ayuda a realizar un diseño *in silico* a pequeña escala pero con la información necesaria para realizar el diseño de un ensayo RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2.
- Los cebadores y sondas diseñados en el presente ensayo RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2, cumplen con las características predilectas recomendadas para que funcionen de manera óptima.
- Los cebadores y sondas diseñados en el presente ensayo RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2, son específicos para el virus ya que el análisis *in silico* llevado a cabo en este trabajo no demuestra posible apareamiento con otros microorganismos que provoquen alguna enfermedad respiratoria.

Referencias

1. Alessandrini, F., Caucci, S., Onofri, V., Melchionda, F., Tagliabracci, A., Bagnarelli, P., Di Sante, L., Turchi, C., & Menzo, S. (2020). Evaluation of the Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel by massive parallel sequencing. *Genes*, 11(8), 929.

2. Alyami, M. H., Alyami, H. S., & Warraich, A. (2020). Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and novel coronavirus disease-2019 (COVID-19): From causes to preventions in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(11), 1481-1491.
3. Anahtar, M. N., Shaw, B. M., Slater, D., Byrne, E. H., Botti-Lodovico, Y., Adams, G., Schaffner, S. F., Eversley, J., McGrath, G. E. G., Gogakos, T., Lennerz, J., Marble, H. D., Ritterhouse, L. L., Batten, J. M., Georgantas, N. Z., Pellerin, R., Signorelli, S., Thierauf, J., Kembal, M., Happi, C., Grant, D. S., Ndiaye, D., Siddle, K. J., Mehta, S. B., Harris, J. B., Ryan, E. T., Pierce, V. M., LaRocque, R. C., Lemieux, J. E., Sabeti, P. C., Rosenberg, E. S., Branda, J. A. & Turbett, S. E. (2021). Development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2: a guide and case study in setting up an emergency-use, laboratory-developed molecular microbiological assay. *J Clin Pathol*, 74, 496–503.
4. Arbyn, M., Dhillon, S.K., Martinelli, M., Simoens, C., Cuypers, L., Bode, J., Ranst, M. V., Corbisier, P., Bonde, J. & Cocuzza, C. (2022). VALCOR: a protocol for the validation of SARS-corona virus-2 assays. *Arch Public Health*, 80(98).
5. Artesi, M., Bontems, S., Göbbels, P., Franckh, M., Maes, P., Boreux, R., Meex, C., Melin, P., Hayette, M. P., Bours, V. & Durkin, K. (2020). A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual-target diagnostic assay. *J Clin Microbiol*, 58(10), 1-8.
6. Banerjee, A., Mossman, K. & Grandvaux, N. (2021). Molecular Determinants of SARS-CoV-2 Variants. *Trends Microbiol*, 29(10), 871-873.
7. Boleda, M. D., Briones, P., Farrés, J., Tyfield, L. & Pi, R. (1996). Experimental design: a useful tool for PCR optimization. *BioTechniques*, 21, 134-140.
8. Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T. Y., Perry, B. W., Castoe, T. A., Rambaut, A., Robertson, D. L. (2020) Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol*, 5, 1408–1417.
9. Bracquemond, D. & Muriaux, D. (2021). Betacoronavirus assembly: clues and perspectives for elucidating SARS-CoV-2 particle formation and egress. *mBio*, 12, e02371-21.

10. Brook, C. E. & Dobson, A. P. (2015). Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol*, 23(3), 172-80.
11. Brown, K. A., Gubbay, J., Hopkins, J., Patel, S., Buchan, S. A., Daneman, N. & Goneau, L. W. (2020). S-gene target failure as a marker of variant B.1.1.7 among SARS-CoV-2 Isolates in the Greater Toronto Area. *JAMA*, 325(20), 2115-2116.
12. Burd, E. M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 23(3), 550-576.
13. CDC. (2020). Research use only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR primers and probes. Abril, 28, 2022, de CDC Sitio web: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>.
14. CDC. (2021). SARS-CoV-2 variant classifications and definitions. Junio 30, 2021, de Centers for Disease Control and Prevention Sitio web: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>.
15. Cedro-Tanda, A., Gómez-Romero, L., de Anda-Jauregui, G., Garnica-López, D., Alfaro-Mora, Y., Sánchez-Xochipa, S., García-García, E. F., Mendoza-Vargas, A., Frías-Jiménez, E. J., Moreno, B., Campos-Romero, A., Moreno-Camacho. J. L., Alcantar-Fernández, J., Ortiz-Ramírez, J., Benitez-González, M., Trejo-González, R., Aguirre-Chavarría, D., Núñez-Martínez, M. E., Uribe-Figueroa, L., Angulo, O., Ruiz, R., Hidalgo-Miranda, A. & Herrera, L. A. (2022). Early genomic, epidemiological, and clinical description of the SARS-CoV-2 Omicron variant in Mexico City. *Viruses*, 14(3), 545.
16. Chafekar, A. & Fielding, B. C. (2018) MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2), 93.
17. Chambers, J. P., Yu, J., Valdes, J. J. & Arulanandam, B. P. (2020). SARS-CoV-2, early entry events. *Journal of Pathogens*, 2020, 1-11.
18. Chan J. F. W., Yip, C. C.Y., To, K. K. W., Tang, T. H. C., Wong, S. C. Y., Leung, K. H. Fung, A. Y. F., Ng, A. C. K., Zou, Z., Tsoi, H. W., Choi, G. K. Y., Tam, A. R., Cheng, V. C. C., Chan, K. H., Tsang, O. T. Y. & Yuen, K. Y. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-rdrp/hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(5).

19. Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M. & Poon, L. L. M. (2020). Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*. 66(4), 549-555.
20. Chung, Y. S., Lee, N. J., Woo, S. H., Kim, J. M., Kim, H. M., Jo, H. J., Park, Y. E. & Han, M. G. (2021). Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea. *Sci Rep*, 11, 14817.
21. 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., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. & 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.
22. Cui, J., Han, N., Streicker, D., Li, G., Tang, X., Shi, Z., Hu, Z., Zhao, G., Fontanet, A., Guan, Y., Wang, L., Jones, G., Field, H. E., Daszak, P., & Zhang, S. (2007). Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerging infectious diseases*, 13(10), 1526–1532.
23. Curran, J., Dol, J., Boulos, L., Somerville, M., McCulloch, H., MacDonald, M., LeBlanc, J., Barrett, L., Hatchette, T., Comeau, J., Reynolds, B., Shin, D., Gallant, A., Wong, H., Crowther, D. & Yu, Z. (2021). Transmission characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern. Rapid Scoping Review, MedRxiv. Preprint.
24. Dharavath, B., Yadav, N., Desai, S., Sunder, R., Mishra, R., Ketkar, M., Bhanshe, P., Gupta, A., Redhu, A. K., Patkar, N., Duttbe, S., Gupta, S. & Dutt, A. (2020). A one-step, one-tube real-time RT-PCR based assay with an automated analysis for detection of SARS-CoV-2. *Heliyon*, 6(7), e04405.
25. Espinosa-Asuar, L.. (2014). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (517-540). México: INECC-SEMARNAT.

26. Fajardo, L. P. A., Navarrete-Martínez, J. A., Marcillo-Ypanaqué, S. A. & García-Arellano, A. A. (2022). Variantes del Sars-Cov-2: características genómicas. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(1), 1744.
27. Favaro, M., Mattina, W., Pistoia, E.S., Gaziano, R, Francesco, P. D., Middleton, S., D'Angelo, S., Altarozzi T. & Fontana, C. (2021). A new qualitative RT-PCR assay detecting SARS-CoV-2. *Sci Rep*, 11, 18955.
28. Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M. & Sironi, M. (2017) Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol*, 25(1), 35-48.
29. Gadkar, V. J., Goldfarb, D. M., Young, V., Watson, N., Al-Rawahi, G. N., Srigley, J. A. & Tilley, P. (2021). Development and validation of a new triplex real-time quantitative reverse Transcriptase-PCR assay for the clinical detection of SARS-CoV-2. *Molecular and Cellular Probes*, 58, 101744.
30. Galán-Huerta, K. A., Flores-Treviño, S., Salas-Treviño, D., Bocanegra-Ibarias, P., Rivas-Estilla, A. M., Pérez-Alba, E., Lozano-Sepúlveda, S. A., Arellanos-Soto, D. & Camacho-Ortiz, A. (2022). Prevalence of SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest in COVID-19 breakthrough infections in a hospital in Monterrey, Mexico. *Viruses*, 14(1), 154.
31. Graham, R., Donaldson, E. & Baric, R. (2013). A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 11, 836–848.
32. Grunewald, H. (2003). Optimization of polymerase chain reactions. En PCR protocols (89-99). USA: Humana Press.
33. Guan, W. D., Chen, L. P., Ye, F., Ye, D., Wu, S. G., Zhou, H. X., He, J. Y., Yang, C. G., Zeng, Z. Q., Wang, Y. T., Li, R. F., Du, Q. L., Liang, X. L., Ma, Q. H. & Yang, Z. F. (2020). High-throughput sequencing for confirmation of suspected 2019-nCoV infection identified by fluorescence quantitative polymerase chain reaction. *Chin Med J*, 133(11),1385-1386.
34. Hasan, M. R., Sundararaju, S., Manickam, C., Mirza, F., Al-Hail, H., Lorenz, S. & Tang, P. (2021). A novel point mutation in the N gene of SARS-CoV-2 may affect the detection of the virus by reverse transcription-quantitative PCR. *J Clin Microbiol*, 59(4), 1-3.

35. Holshue, M. L., DeBolt, C., Lindquist, S., Lofy, K. H., Wiesman, J., Bruce, H., Spitters, C., Ericson, K., Wilkerson, S., Tural, A., Diaz, G., Cohn, A., Fox, L., Patel, A., Gerber, S. I., Kim, L., Tong, S., Lu, X., Lindstrom, S., Pallansch, M. A., Weldon, W. C., Biggs, H. M., Uyeki, T. M. & Pillai, S. K. (2020). First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 929-936.
36. Hui, D. S., Azhar, E. I., Memish, Z. A., & Zumla, A. (2020). Human Coronavirus Infections—Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS), and SARS-CoV-2. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1-17.
37. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23, 3–20.
38. Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Majsterek, I. & Bijak, M. (2021). The emerging concern and interest SARS-CoV-2 variants. *Pathogens*, 10(6), 633.
39. Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A. & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, 61, 180-202.
40. Kalita, M. J., Dutta, K., Hazarika, G., Dutta, R., Kalita, S., Das, P. P., Sarma, M. P., Banu, S., Idris, M. G., Talukdar, A. J., Dutta, S., Sharma, A., & Medhi, S. (2021). In-house reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 with increased sensitivity. *Scientific reports*, 11(1), 17878.
41. Khan, M., Adil, S. F., Alkhatlan, H. Z., Tahir, M. N., Saif, S., Khan, M., & Khan, S. T. (2020). COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far. *Molecules*, 26(1), 1-25.
42. Kirtipal, N., Bharadwaj, S. & Kang, S. G. (2020). From SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol*, 85, 104502. Khan, M., Adil, S. F., Alkhatlan, H. Z., Tahir, M. N., Saif, S., Khan, M., & Khan, S. T. (2020). COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far. *Molecules*, 26(1), 1-25.
43. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D.,

- Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., Moon-Walker, A., Whelan, S. P., LaBranche, C. C., Sapphire, E. O. & 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.
44. Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., Tong, Y. G., Shi, Y. X., Ni, X. B., Liao, Y. S., Li, W. J., Jiang, B. G., Wei, W., Yuan, T. T., Zheng, K., Cui, X. M., Li, J., Pei, G. Q., Qiang, X., Cheung, W. Y. M., Li, L. F., Sun, F. F., Qin, S., Huang, J. C., Leung, G. L., Holmes, E. C., Hu, Y. L., Guan, Y. & Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583, 282–285.
45. Li, D., Zhang, J., & Li, J. (2020). Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*, 10(16), 7150–7162.
46. López-Ortiz, E., López-Ortiz, G., Mendiola-Pastrana, I. R., Mazón-Ramírez, J. J. & Díaz-Quiñonez, J. A. (2020). From the handling of an outbreak by an unknown pathogen in Wuhan to the preparedness and response in the face of the emergence of COVID-19 in Mexico. *Gaceta Médica de México*, 156, 132-137.
47. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W. J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E. C., Gao, G. F., Wu, G., Chen, W., Shi, W. & Tan, W. (2020). Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395 (10224), 565-574.
48. MacLean, O. A., Lytras, S., Weaver, S., Singer, J. B., Boni, M. F., Lemey, P., Kosakovsky-Pond, S. L. & Robertson, D. L. (2021) Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *PLoS Biol*, 19(3), e3001115.
49. Mathuria, J. P., Yadav, R. & Rajkumar. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*, 13, 901-905.
50. Menachery, V., Yount, B., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., Graham, R. L., Scobey, T., Ge, X. Y., Donaldson, E. F., Randell, S. H., Lanzavecchia, A., Marasco, W. A., Shi, Z. L. & Baric, R. S. (2015) A SARS-like

cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med*, 21, 1508–1513.

51. Miyata, I. & Ouchi, K. (2020). Real-time RT-PCR detection method for SARS-CoV-2. *Kawasaki Med J*, 46, 97-101.
52. Morens, D., Folkers, G. & Fauci, A. (2009) What is a pandemic?. *J Infect Dis*, 200(7), 1018-1021.
53. New England Biolabs. (2022). Luna® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit. Abril 28, 2022, de New England Biolabs Sitio web: <https://international.neb.com/products/e3019-luna-sars-cov-2-rt-qpcr-multiplex-assay-kit#Product%20Information>.
54. Nguyen, L. T., Nguyen, P. M., Dinh, D. V., Pham, H. N., Bui, A. T., Vo, C. V., Nguyen, B. H., Bui, H. D., Hoang, C. X., Ngo, N. M. V., Dang, T. T., Do, A. N., Vu, D. D., Nguyen, L. T., Dinh, T. H. T., Ho, S. A., Hoang, L. V., Hoang, S. X. & Do, Q. (2022). Establishment of an in-house real-time RT-PCR assay for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 using the first World Health Organization international standard in a resource-limited country. *J Clin Lab Anal*, 36, e24355.
55. Noor, F. A., Safain, K. S., Hossain, W., Arafath, K., Mannoor, K. & Kabir, M. (2021). Development and performance evaluation of the first in-house multiplex rRT-PCR assay in Bangladesh for highly sensitive detection of SARS-CoV-2. *Journal of Virological Methods*, 293, 114147.
56. OMS (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2: Orientaciones provisionales . Mayo 24, 2022, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>.
57. Oróstica, K. Y., Contreras, S., Mohr, S. B., Dehning, J., Bauer, S., Medina-Ortiz, D., Iftekhhar, E. N., Mujica, K., Covarrubias, P. C., Ulloa, S., Castillo, A. E., Verdugo, R. A., Fernández, J., Olivera-Nappa, A. & Priesemann, V. (2021). Mutational signatures and transmissibility of SARS-CoV-2 Gamma and Lambda variants. *arXiv preprint arXiv:2108.10018*.
58. Pabbaraju, K., Wong, A. A., Douesnard, M., Ma, R., Gill, K., Dieu, P., Fonseca, K., Zelyas, N. & Tipples, G. A. (2021). Development and validation of RT-PCR assays

for testing for SARS-CoV-2. *Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada*, 6.1, 16-22.

59. PANGO Network. (2020). What are Pango lineages?. Junio 29, 2021, de The PangoLineage Nomenclature Sitio web: <https://www.pango.network/how-does-the-system-work/what-are-pango-lineages/>.
60. Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental & molecular medicine*, 52(6), 963–977.
61. Plante, J.A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., Lokugamage, K. G., Zhang, X., Muruato, A. E., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., Mirchandani, D., Scharton, D., Bilello, J. P., Ku, Z., An, Z., Kalveram, B., Freiberg, A. N., Menachery, V. D., Xie, X., Plante, K. S., Weaver, S. C. & Shi, P. Y. (2021) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, 592, 116–121.
62. Pollett, S., Conte, M. A., Sanborn, M., Jarman, R. G., Lidl, G. M., Modjarrad, K. & Maljkovic-Berry, I. (2021) A comparative recombination analysis of human coronaviruses and implications for the SARS-CoV-2 pandemic. *Sci Rep*, 11, 17365.
63. Quellhorst, G., & Rulli, S. (2008). A systematic guideline for developing the best real-time PCR primers What we have learned from designing assays for more than 14,000 genes. *SABiosciences Corporation*.
64. Rambaut, A. (2020). Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Marzo, 10, 2022, de Virological Sitio Web: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>.
65. Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, A., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L. & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*, 5, 1403–1407.
66. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J. & Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. En *PCR primer design* (44-69). USA: Humana Press.

67. Rodríguez-Maldonado, A. P., Vázquez-Pérez, J. A., Cedro-Tanda, A., Taboada, B., Boukadida, C., Wong-Arámbula, C., Nuñez-García, T. E., Cruz-Ortiz, N., Barrera-Badillo, G., Hernández-Rivas, L., López-Martínez, I., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., Alcaraz, N., Peñaloza-Figueroa, F., Gonzalez-Barrera, D., Rangel-DeLeon, D., Herrera-Montalvo, L. A., Mejía-Nepomuceno, F., Hernández-Terán, A., Mújica-Sánchez, M., Becerril-Vargas, E., Martínez-Orozco, J. A., Pérez-Padilla, R., Salas-Hernández, J., Sanchez-Flores, A., Isa, P., Matías-Florentino, M., Ávila-Ríos, S., Muñoz-Medina, J. E., Grajales-Muñiz, C., Salas-Lais, A. G., Santos Coy-Arechavaleta, A., Hidalgo-Miranda, A., Arias, C. F. & Ramírez-González, J. E. (2021). Emergence and spread of the potential variant of interest (VOI) B. 1.1. 519 of SARS-CoV-2 predominantly present in Mexico. *Archives of virology*, 166(11), 3173-3177.
68. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G. & Berisio, R. (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5),1267.
69. Rothan, H. A. & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*, 109, 102433.
70. Saha, I., Ghosh, N., Pradhan, A., Sharma, N., Maity, D. & Mitra, K. (2021). Whole genome analysis of more than 10000 SARS-CoV-2 virus unveils global genetic diversity and target region of NSP6. *Briefings in Bioinformatics*, 22(2), 1106-1121.
71. Secretaría de Salud. (2021). Listado de pruebas moleculares útiles por RT PCR para SARS CoV 2. Julio 27, 2021, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/documentos/listado-de-pruebas-moleculares-por-rt-pcr-monoplexado-sars-cov-2?state=published>.
72. Shahrajabian, M. H., Sun, W. & Cheng, Q. (2021). Product of natural evolution (SARS, MERS, and SARS-CoV-2); deadly diseases, from SARS to SARS-CoV-2. *Hum Vaccin Immunother*, 17(1), 62-83.
73. Taboada, B., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Ramos-Cervantes, P., Escalera-Zamudio, M., Boukadida, C, Sanchez-Flores, A., Iša, 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., Grajales-Muñiz, C., Borja-Aburto, V. H., Barrera-Badillo, G., López, S., Hernández-Rivas, L., Perez-Padilla, R., López-Martínez, I., Ávila-Ríos, S., Ruiz-Palacios, G., Ramírez-González, J. E. & Arias, C. F. (2020). Genomic analysis of early SARS-CoV-2 variants introduced in Mexico. *J Virol*, 94:e01056-20.
74. Taboada, B., Zárate, S., Iša, P., Boukadida, C., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., Ramírez-González, J. E., Comas-García, A., Grajales-Muñiz, C., Rincón-Rubio, A., Matías-Florentino, M., Sanchez-Flores, A., Mendieta-Condado, E., Verleyen, J., Barrera-Badillo, G., Hernández-Rivas, L., Mejía-Nepomuceno, F., Martínez-Orozco, J. A., Becerril-Vargas, E., López, S., López-Martínez, I., Ávila-Ríos, S. & Arias, C. F. (2021). Genetic analysis of SARS-CoV-2 variants in Mexico during the first year of the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 13(11), 2161.
75. Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H. & Stratton, C.W. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol*, 58(6):e00512-20.
76. Thermo Fisher Scientific. (2022). Basic Principles of RT-qPCR. Abril 28, 2022, de Thermo Fisher Scientific Sitio web: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/basic-principles-rt-qpcr.html>.
77. Tombuloglu, H., Sabit, H., Al-Suhaimi, E., Al-Jindan, R., Alkharsah, K. R. (2021) Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. *PLOS ONE*, 16(4), e0250942.
78. Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. & Chan, W. C. (2020). Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. *ACS nano*.
79. Valadan, R., Golchin, S., Alizadeh-Navaei, R., Haghshenas, M., Zargari, M., Mousavi, T., & Ghamati, M. (2021). Relative sensitivity of common target genes for the detection of SARS-CoV-2 in Real Time-PCR. *Research Square*. preprint.
80. van Elden, L. J., van Loon, A. M., van Alphen, F., Hendriksen, K. A., Hoepelman, A. I., van Kraaij, M. G., Oosterheert, J. J., Schipper, P., Schuurman, R. & Nijhuis, M. (2004). Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from

- patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 189(4), 652-7.
81. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*, 19, 155–170.
 82. Wang, X. & Seed, B. (2007). High-throughput primer and probe design. En Real-time PCR (122-135). Reino Unido: Taylor & Francis Group.
 83. Wang, M., Zhao, R., Gao, L., Gao, X., Wang, D. & Cao, J. (2020). SARS-CoV-2: structure, biology and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 587269.
 84. Wang, R., Zhang, Q., Ge, J., Ren, W., Zhang, R., Lan, J., Ju, B., Su, B., Yu, F., Chen, P., Liao, H., Feng, Y., Li, X., Shi, X., Zhang, Z., Zhang, F., Ding, Q., Zhang, T., Wang, X. & Zhang, L. (2021). Analysis of SARS-CoV-2 variant mutations reveals neutralization escape mechanisms and the ability to use ACE2 receptors from additional species. *Immunity*, 54(7),1611-1621.e5.
 85. WHO. (2022). Tracking SARS-CoV-2 variants. Marzo 3, 2022, de World Health Organization Sitio web: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
 86. Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., Bai, R., Teng, J. L., Tsang, C. C., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K. H. & Yuen, K. Y. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol.*, 86(7):3995-4008.
 87. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y., Wang, W., Song, Z., Hu, Y., Tao, Z., Tian, J., Pei, Yuan, M., Zhang, Y., Dai, F., Liu, Y., Wang, Q., Zheng, J., Xu, L., Holmes, E. & Zhang, Y. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579, 265-269.
 88. Yamamoto-Elizalde, A. Y., Hernández-Lemus, E. & de Anda-Jáuregui, G. (2020). Diffusion processes in multilayer transportation networks: the flight of the Coronavirus. *Revista Mexicana de Física*, 66(4), 516-524.

89. Yan, Y., Chang, L. & Wang, L. (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): current status, challenges and countermeasures. *Rev. Med. Virol.*, 30, e2106.
90. Yu, Y., Li, Z., Li, Y., Yu, L., Jia, W., Ye, F. & Li, S. C. (2020). CovProfile: profiling the viral genome and gene expressions of SARS-COV-2. *bioRxiv*. Preprint.
91. Yu, C. Y., Chan, K. G., Yean, C. Y. & Ang, G. Y. (2021). Nucleic acid-based diagnostic tests for the detection SARS-CoV-2: an update. *Diagnostics*. 11(1), 53.
92. Zárate, S., Muñoz-Medina, J. E., Iša, P., Sanchez-Flores, A., Boukadida, C., Herrera-Estrella, A., Mojica, N. S., Rosales-Rivera, M., Gómez-Gil, B., Salas-Lais, A. G., Santacruz-Tinoco, C. E., Montoya-Fuentes, H., Alvarado-Yaah, J. E., Molina-Salinas, G. M., Espinoza-Ayala, G. E., Enciso-Moreno, J. A., Gutiérrez-Ríos, R. M., Loza, A., Moreno-Contreras, J., García-López, R., Rivera-Gutierrez, X., Comas-García, A., Wong-Chew, R. M., Jiménez-Corona, M., del Angel, R. M., Vazquez-Perez, J. A., Matías-Florentino, M., Pérez-García, M., Ávila-Ríos, S., Castelán-Sánchez, H. G., Delaye, L., Martínez-Castilla, L. P., Escalera-Zamudio, M., López, S. & Arias, C. F. (2022). The Alpha variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 failed to become dominant in Mexico. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e02240-21.
93. Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y. Y., Lu, H., Duduit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G., & Liu, W. (2021). An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Horticulture research*, 8(1), 179.
94. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G. Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., Zhao, K., Chen, Q. J., Deng, F., Liu, L. L., Yan, B., Zhan, F. X., Wang, Y. Y., Xiao G. F. & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579, 270–273.
95. Zhou, H., Ji, J., Chen, X., Bi, Y., Li, J., Wang, Q., Hu, T., Song, H., Zhao, R., Chen, Y., Cui, M., Zhang, Y., Hughes, A. C., Holmes, E. C. & Shi, W. (2021) Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell*, 184(17):4380-4391.

96. Zimmerman, R. A., Gröhs-Ferrareze, P. A., Cadebiani, F. A., Wambier, C. G., do Nascimento-Fonseca, D., Roberto de Souza, A., Goren, A., Rotta, L. N., Ren, Z. & Thompson, C. L. (2021). Comparative genomics and characterization of SARS-CoV-2 P.1 (Gamma) Variant of Concern (VOC) from Amazonas, Brazil. *MedRxiv*.