



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA  
UNAN - MANAGUA



**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua**  
**Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud**  
**Escuela de Salud Pública**  
**CIES UNAN-MANAGUA**

**Epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua,  
marzo 2020 - septiembre 2022**

**Informe final de tesis para optar al título de  
Máster en epidemiología**

**Lic. Gerald Nicolás Vásquez Alemán.**  
**Bioanalista Clínico**

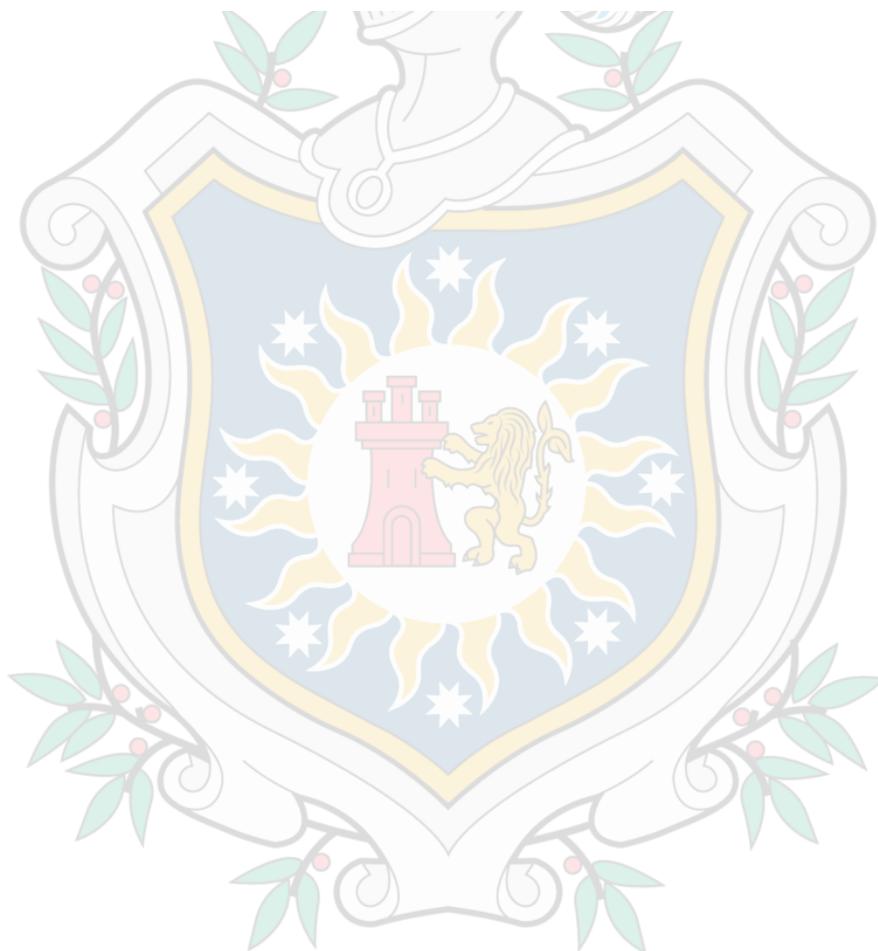
**Tutor. MSc. MPH. Francisco Mayorga Marín**  
**Docente Investigador**

**Managua, Nicaragua 2024**

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....                                | 3  |
| DEDICATORIA.....                            | 4  |
| AGRADECIMIENTOS.....                        | 5  |
| CARTA AVAL DEL TUTOR.....                   | 6  |
| I. INTRODUCCIÓN.....                        | 7  |
| II. ANTECEDENTES.....                       | 8  |
| III. JUSTIFICACIÓN.....                     | 10 |
| IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....         | 11 |
| V. OBJETIVOS.....                           | 12 |
| VI. MARCO TEÓRICO.....                      | 13 |
| VII. DISEÑO METODOLÓGICO.....               | 37 |
| Enfoque de investigación:.....              | 37 |
| Tipo de Estudio:.....                       | 37 |
| Área de Estudio:.....                       | 37 |
| Universo:.....                              | 37 |
| Muestra:.....                               | 37 |
| Unidad de Análisis:.....                    | 38 |
| Criterios de selección:.....                | 38 |
| Variables de estudio:.....                  | 38 |
| Fuentes de información:.....                | 39 |
| Técnicas de recolección de datos:.....      | 39 |
| Instrumento de recolección de datos:.....   | 39 |
| Procesamiento de la información:.....       | 40 |
| Consideraciones Éticas.....                 | 41 |
| VIII. RESULTADOS.....                       | 47 |
| IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 65 |
| XII. BIBLIOGRAFÍA.....                      | 79 |
| ANEXOS.....                                 | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| ANEXO 2: FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA VIGILANCIA DE VIRUS RESPIRATORIOS .....   | 99  |
| ANEXO 3: DISTRIBUCIÓN DE VARIANTES IDENTIFICADAS EN 1069 GENOMAS DEL SARS-COV-2 POR SEXO Y ESTADO DE HOSPITALIZACIÓN DE LOS PACIENTES.....                               | 100 |
| ANEXO 4: DISTRIBUCIÓN DE LA EDAD DE LOS PACIENTES SEGÚN LAS VARIANTES IDENTIFICADAS .....  | 103 |
| ANEXO 5: 30 MUTACIONES IDENTIFICADAS MÁS FRECUENTEMENTE MEDIANTE SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN LAS VARIANTE DEL SARS COV 2 EN 735 PACIENTES CON DATO DE HOSPITALIZACIÓN..... | 104 |
| ANEXO 6: CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS   | 105 |



## RESUMEN

**Objetivos:** Se realizó el presente trabajo de investigación con el objetivo general de analizar la epidemiología molecular y evolutiva del SARS-CoV-2 en Nicaragua desde marzo 2020 hasta septiembre 2022 mediante técnicas de secuenciación genómica.

**Material y métodos:** Se realizó un estudio con el objetivo de analizar la epidemiología molecular y evolutiva del SARS-CoV-2 en Nicaragua entre marzo 2020 y septiembre 2022. Se secuenciaron 1069 muestras de pacientes con COVID 19 de todo el territorio Nacional mediante las tecnologías de Illumina y Oxford Nanopore Technologies. Se realizaron análisis descriptivos y modelos de regresión logística para determinar asociaciones entre las características del virus y el riesgo de hospitalización.

**Resultados:** Las variantes identificadas más frecuente fueron Omicron, Delta (21.32%) y 19B (21.2%), Las variantes menos comunes fueron 21C (Epsilon) y 21H (Mu)). Se identificaron mutaciones en las regiones ORFs y S del genoma del SARS CoV-2, incluso la mutación S:D614G. Se encontraron diferencias significativas en la edad de las personas infectadas con las distintas variantes del SARS CoV 2. Al determinar asociaciones, se encontró una asociación negativa entre el aumento de la edad y el riesgo de ser infectado con la variante 19B. También se encontró una asociación positiva entre el aumento de la edad y el riesgo de ser infectado con las variantes 20B y Delta.

**Conclusiones:** Se identificaron Diferentes variantes circulando en diferentes periodos en Nicaragua. Se identificaron mutaciones de importancia epidemiológica, especialmente la mutación S:D614G. La edad fué un factor predisponente para el riesgo de infección de ciertas variantes. El riesgo de hospitalización aumentó por la infección de ciertas variantes.

**Palabras clave:** SARS CoV-2, COVID-19, secuenciación, RT-PCR, [almngerald@gmail.com](mailto:almngerald@gmail.com)

## DEDICATORIA

A todas las personas en Nicaragua que son parte de esta investigación aportando sus muestras y experiencias. Aunque sus identidades permanecen desconocidas para mí, su participación ha sido fundamental para profundizar nuestra comprensión de la epidemiología del SARS-CoV-2 en Nicaragua.

Su contribución no sólo ha enriquecido este trabajo, sino que también ha ayudado a profundizar nuestro entendimiento sobre la epidemiología del SARS-CoV-2.

Esta dedicatoria se extiende a cada individuo y familia que ha sido afectado por la pandemia de COVID-19. Su fortaleza y resiliencia continúan siendo una fuente de inspiración y nos recuerdan la importancia de la solidaridad y la cooperación en tiempos de desafíos.

A través de esta investigación, espero honrar no solo su participación, sino también el espíritu de comunidad y la determinación colectiva que ha caracterizado nuestra respuesta a esta crisis de salud global.

Gerald Vásquez Alemán



## AGRADECIMIENTOS

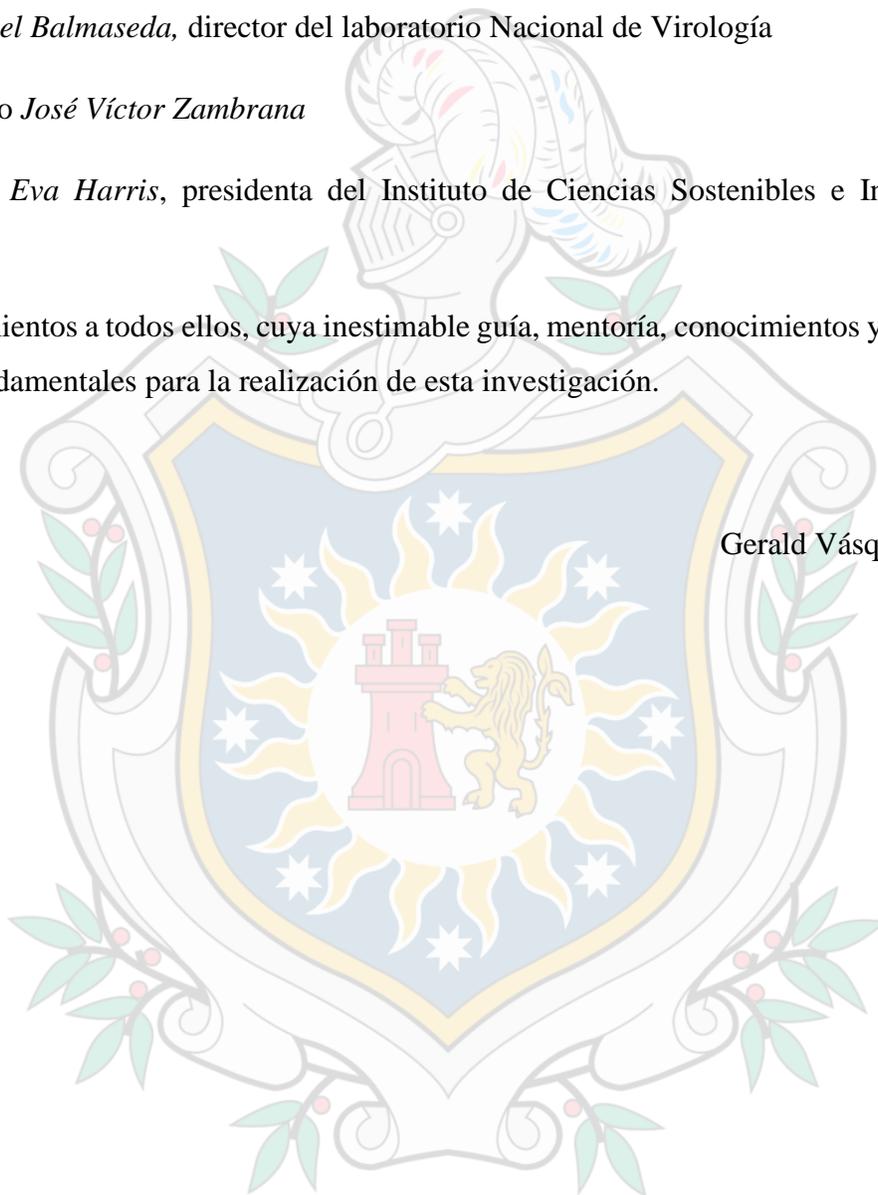
*Al Dr. Ángel Balmaseda*, director del laboratorio Nacional de Virología

A mi amigo *José Víctor Zambrana*

A la *Dra. Eva Harris*, presidenta del Instituto de Ciencias Sostenibles e Investigadora Principal

Agradecimientos a todos ellos, cuya inestimable guía, mentoría, conocimientos y motivación fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

Gerald Vásquez Alemán



## CARTA AVAL DEL TUTOR



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS DE LA SALUD  
CIES/UNAN-Managua**



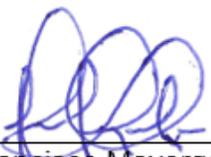
### CARTA AVAL DEL TUTOR

Por este medio hago constar que luego de haber acompañado en las diferentes etapas del proceso de elaboración de tesis, el informe final de investigación de tesis se encuentra conforme a lo que establece la guía metodológica para elaborar tesis de posgrado del CIES-UNAN Managua. Así como el cumplimiento del reglamento del sistema de estudios de posgrado y educación continua SEPEC- UNAN-MANAGUA. Aprobado por el Consejo Universitario en sesión ordinaria No. 21-2011, del 07 de octubre 2011. De acuerdo al capítulo II sección primera, Artículo 97, inciso D y título II, Artículo 107. Inciso G. los cuales hacen referencia de la aprobación del tutor o director de tesis como requisito para proceder con el acto de defensa.

A continuación, se detallan los datos generales de la tesis:

- Nombre del programa de Maestría: Maestría en Epidemiología
- Sede y cohorte: 2021-2023
- Nombre del Maestrando: Gerald Nicolás Vásquez Alemán
- Nombre del tutor: M.Sc. Francisco José Mayorga Marín
- Título de la tesis: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y EVOLUTIVA DEL SARS COV 2 EN NICARAGUA, MARZO 2020 - SEPTIEMBRE 2022

Dado en la ciudad de Managua, Nicaragua, a los 18 días del mes de enero del año 2024.

Atte.   
MSc. MPH. Francisco Mayorga Marín  
Salubrista-Epidemiólogo  
Docente Investigador CIES-UNAN- Managua

## I. INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019, China reportaba los primeros casos de una curiosa enfermedad respiratoria asociada a un coronavirus desde un mercado de mariscos y animales salvajes en un mercado de la ciudad de Wuhan (Wu et al., 2020). Esta enfermedad se propagó rápidamente por el mundo provocando millones de contagios y muertes. La secuenciación genómica permitió la identificación del SARS-CoV-2 pocas semanas después del primer brote, algo que tradicionalmente tomaba meses (Álvarez-Díaz et al., 2020)

El 18 de marzo del 2020, en Nicaragua, el Ministerio de Salud (MINSa) reportó el primer caso confirmado por laboratorio de infección por el SARS CoV 2, y después de este momento, el SARS CoV 2 se propagó por todo el país. En plena era genómica, el estudio genético y evolutivo del SARS CoV 2 se volvió una necesidad, países como Reino Unido, Estados Unidos, Brasil, Sudáfrica, entre otros, estaban a la vanguardia al inicio de la pandemia y con el paso del tiempo otros países implementaron técnicas de secuenciación.

Hasta septiembre del 2022 se han reportado a nivel global al menos 8 olas masivas de contagio provocados por los cambios evolutivos del SARS CoV 2. Gracias a las nuevas tecnologías se ha logrado combinar la genómica con la epidemiología de las enfermedades infecciosas, permitiendo llegar a escudriñar características moleculares del SARS CoV 2 que son de importancia epidemiológica. El estudio de los cambios moleculares es necesario para estimar el curso de las pandemias y epidemias, aplicar medidas de control, establecer asociaciones con los cambios evolutivos de los virus, seleccionar vacunas más eficaces, etc.

En Nicaragua se realiza el estudio molecular de las enfermedades infecciosas mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde la década de los 90s y esta tecnología se ha ido modernizando poco a poco, sin embargo, hasta el 2020 la tecnología de secuenciación no había sido implementada en el país y se hacía cada vez más necesario el estudio genético y evolutivo de los microorganismos, principalmente el SARS COV 2. Basado en esto, la presente investigación busca analizar la epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el período marzo 2020 - septiembre 2022.

## II. ANTECEDENTES

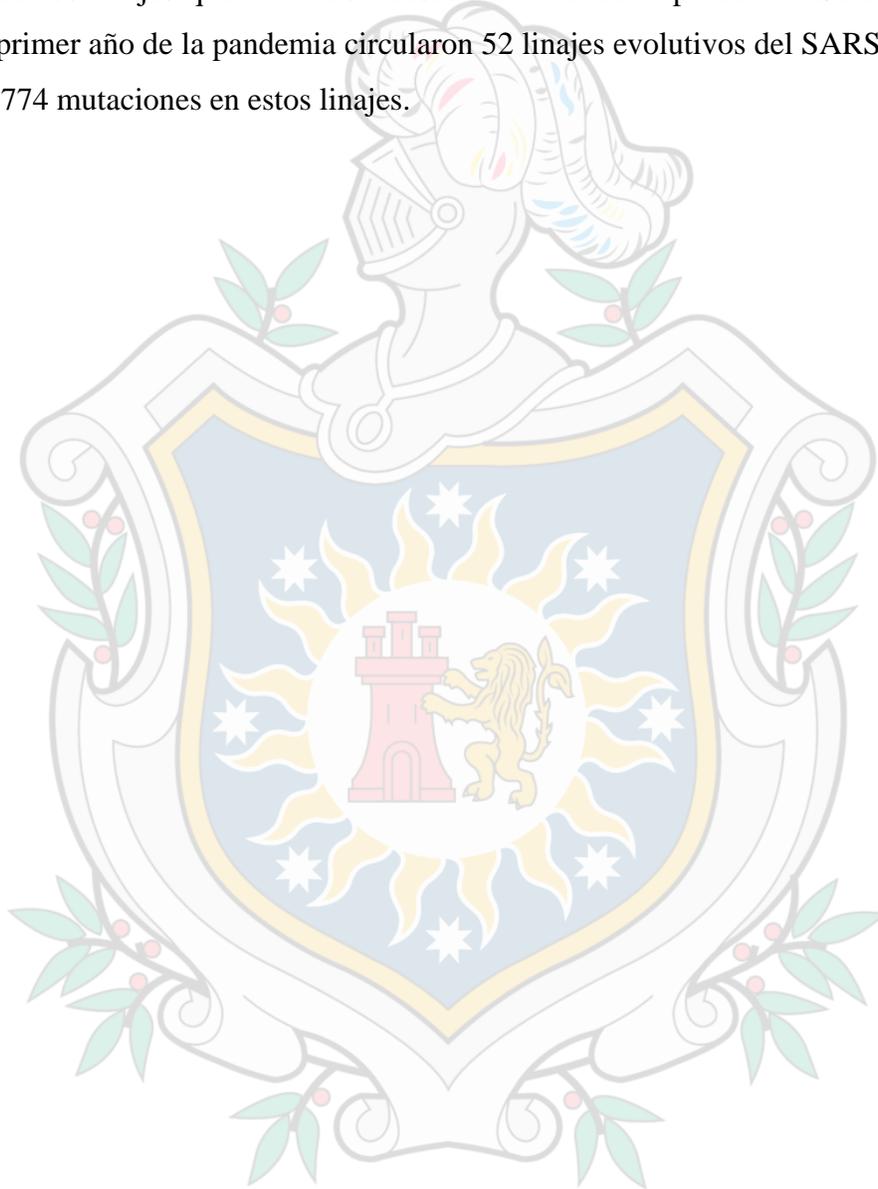
Okoh et al., (2022) Sudáfrica, en 2022, publicó una investigación que buscó describir la epidemiología y la diversidad genética de los linajes evolutivos de SARS-CoV-2 que circularon en África hasta momento de su investigación, analizando 5229 genomas completos recolectados en 33 países africanos de la base de datos GISAID. Casi una quinta parte (144/782, 18,4%) de los linajes Pango que se encuentran en todo el mundo circularon en África desde 2020, con cinco linajes diferentes dominando a lo largo del tiempo: B.1, B.1.1, B.1.5, B.1.351 y B.1.1.206.

Mishra et al. (2021), durante el período del 31 de enero al 15 de mayo de 2021, en Inglaterra, buscó analizar las características epidemiológicas de los linajes del SARS CoV diferentes al B.1.1.7 (Alpha). Se utilizó un método de vigilancia molecular y genómica para identificar las características moleculares del SARS CoV 2. Se encontró en este período un aumento diversos linajes a causa de la importación y transmisión comunitaria. Hubo un estilo de competencia entre estos linajes resultando el B.1.617.2 (Delta) el linaje dominante en Abril y Mayo, con una considerable tasa de transmisión comunitaria

Molina-Mora et al. (2021), Costa Rica, en agosto del 2021, realizó un estudio de tipo descriptivo que busca analizar la variabilidad genética del SARS CoV 2 mediante vigilancia genómica. Se analizaron 185 secuencias nucleotídicas, 52 desde el inicio de la pandemia y 133 del pico epidemiológico del segundo trimestre del 2021. Las variantes B.1 y B.1.1 predominaron en este periodo. En total se identificaron 283 variaciones nucleotídicas. La mutación T11171 de la proteína S incrementó durante la última ola analizada desde mayo de 2020 (Molina-Mora et al., 2021).

Tamim et al. (2021), Reino Unido, en Octubre del 2021, publicó una investigación en donde se utilizó la capacidad adquirida de secuenciación mediante la tecnología de Oxford Nanopore Technologies (ONT) para implementar una vigilancia genómica en Pakistán. Mediante esta técnica de secuenciación se identificaron múltiples linajes co-circulando durante el pico de la segunda ola de contagios. (Nov 2020 - Feb 2021) con virus originalmente trazados en Estados Unidos, Reino Unido, Arabia Saudita y Singapur. Los linajes identificados fueron: B.1.1.250, B.1.261 B.1 y B.6.

Castañeda et al., (2021), Colombia, en el 2021, publicó una investigación en la que se planteaba como objetivo describir la evolución y epidemiología de SARS Cov 2 un año después del inicio de la pandemia en el país. Se describió la dinámica de la incidencia del SARS CoV 2 durante el tiempo, así como la dinámica de los cambios moleculares y la evolución de los linajes que circularon desde el inicio de la pandemia. Se encontró que durante el primer año de la pandemia circularon 52 linajes evolutivos del SARS CoV 2 y se detectaron 774 mutaciones en estos linajes.



### **III. JUSTIFICACIÓN**

La pandemia provocada por el SARS CoV 2 ha causado millones de infecciones y muertes. Durante la pandemia, se han desarrollado una serie de herramientas bioinformáticas que permiten potenciar el estudio molecular y evolutivo del SARS CoV 2. Describir el escenario evolutivo es de vital importancia, esto aporta a la comprensión de la situación epidemiológica y ayuda a formular ideas y estrategias para futuras olas de contagio.

En Nicaragua, hasta el 2020, no se contaba con tecnologías que permiten realizar análisis moleculares, evolutivos y filogenéticos de microorganismos, aportando negativamente a la epidemiología del país. Es importante conocer el momento en que se introducen los nuevos linajes y cuáles son las características moleculares de los mismos. El SARS CoV 2 seguirá su dinámica evolutiva, vigilar sus cambios permitirá inferir el curso epidemiológico de la pandemia en el país una vez emergen nuevas variantes.

La presente investigación busca analizar el curso de la pandemia en Nicaragua desde el punto de vista viral, caracterizando el genoma del SARS CoV 2 y describiendo su dinámica evolutiva. Esta investigación se realiza en primera instancia porque en el país no se han realizado estudios que analicen la epidemiología molecular de este virus por la carencia de tecnologías de secuenciación. De manera indirecta, se resalta la importancia de implementar estudios moleculares y evolutivos de microorganismos infecciosos en las pandemias y epidemias. Los resultados de esta investigación serán relevantes para estudiantes de áreas de la salud, personal de salud, epidemiólogos, salubristas y tomadores decisiones al aportar información que permite construir un panorama claro del curso de la pandemia y exponer las características moleculares del SARS CoV 2, además, los resultados de esta investigación pueden dar una pauta para la formulación de estrategias que permitan sobrellevar de mejor manera los efectos de cada brote.

Por lo anterior, se presenta esta investigación con el objetivo de analizar la epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el período Marzo 2020 - Septiembre 2022.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los virus ARN poseen una tasa de mutación considerablemente alta. El SARS CoV 2 es un virus ARN con una serie de proteínas no estructurales que tienden a mutar con el tiempo, convirtiendo al SARS CoV 2 en un virus con una tasa de mutación alta, estas características sugieren vigilar los cambios en el genoma del SARS CoV 2. Los países que tenían la capacidad de secuenciación al inicio de la pandemia, lograron realizar análisis para evaluar la evolución del virus, además, hacían públicas sus secuencias y resultados, mejorando de esta manera la capacidad de combatir la pandemia infiriendo las nuevas olas de contagio.

Nicaragua, no posee una tradición en la implementación de estudios genómicos virales en manejo de las epidemias, el estudio, monitoreo y control de los brotes se realiza haciendo usos de las herramientas de la epidemiología clásica. En el 2021, Nicaragua implementó con éxito un sistema de secuenciación genómica y análisis bioinformático, pero de la mano de este paso surge la necesidad de generar, a partir de la secuenciación, información para investigar la epidemiología molecular y dinámica evolutiva del virus causante de la COVID 19. En base a este planteamiento se hace la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo es la epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el período Marzo 2020 - Septiembre 2022?

Además se realizan las siguientes preguntas directrices:

1. ¿Cuáles son las características genéticas, evolutivas y moleculares de los linajes del SARS CoV 2 en secuencias nucleotídicas y aminoacídicas?
2. ¿Cómo es el comportamiento de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el período Marzo 2020 a Septiembre 2022?
3. ¿Cómo es la distribución espacial del SARS CoV 2 y sus linajes evolutivos en Nicaragua?
4. ¿Cómo se relacionan las variantes del SARS CoV 2 con las características demográficas de las personas a quienes se les tomó muestra para secuenciación?

## V. OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el período Marzo 2020 - Septiembre 2022

### Objetivos específicos

1. Describir características evolutivas, genéticas y moleculares de los linajes del SARS CoV 2 basado secuencias nucleotídicas y aminoácidas.
2. Conocer el comportamiento de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el tiempo
3. Identificar la distribución espacial del SARS CoV 2 y sus linajes evolutivos.
4. Estimar la asociación entre las variantes del SARS CoV 2 y las características demográficas de las personas a quienes se les tomó una muestra para secuenciación.

## VI. MARCO TEÓRICO

### 1. Conceptos generales en el estudio de la evolución viral

#### 1.1. Replicación viral

Los virus son organismos, mayoritariamente patógenos, intracelulares obligatorios, que no poseen ningún mecanismo para replicarse por sí mismos. Siempre necesitan de los mecanismos celulares y metabólicos de su huésped para poder replicarse (Goulding, 2013). Dentro de la diversidad viral, existen diferentes mecanismos de replicación que van en dependencia de características estructurales de cada virus, sin embargo, Goulding (2013) afirma que la replicación viral puede explicarse en seis pasos básicos:

- **Unión:** Cuando un virus logra infectar a un huésped las proteínas virales de la cápside o de la envoltura lipídica interactúan con los receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, permitiéndole unirse a ella.
- **Penetración:** Cuando la partícula viral se une al receptor celular se pueden inducir cambios conformacionales en las proteínas de la cápside o en la cubierta lipídica, lo que resulta en la fusión de las membranas víricas y celular.
- **Eliminación de la cápside.** La cápsida es eliminada y degradada por enzimas virales o del hospedador, liberando el genoma del virus.
- **Replicación.** Una vez el virus alcanza el núcleo celular, el genoma viral se replica y puede ser transcrito o traducido, para realizar síntesis de proteínas.
- **Ensamblaje.** Las proteínas del virus son empaquetadas junto con los nuevos genomas para originar viriones que estarán listos para dejar la célula infectada.
- **Liberación de viriones.** Existen dos métodos de liberación viral: lisis o gemación. La primera resulta en la muerte de la célula infectada para dar salida a los nuevos viriones. En la segunda los virus salen lentamente adquiriendo su membrana lipídica de la membrana de la célula infectada.

#### 1.2. Variabilidad genética viral

Los virus ARN poseen una tasa de mutación alta en comparación a los virus ADN. Esto hace que los mecanismos para la variabilidad genética sean explotados por los virus ampliamente para su supervivencia. La variabilidad genética hace referencia a la diversidad de variantes que pueden existir en los virus cuando estos van cambiando en el tiempo. Existen familias de virus que poseen una variabilidad genética alta, como el virus de la influenza, que año tras año se diversifica, provocando brotes o epidemias estacionales.

La diversidad o variabilidad genética es una característica esencial en las poblaciones virales con ARN como genoma, propiciando que estas especies evolucionen en un entorno en constante cambio con presiones de selección cambiantes. Los virus tienen capacidades evolutivas extremas que les han permitido adaptarse para parasitar a todos los grupos conocidos de organismos y, en muchos casos, adaptarse rápidamente a numerosas especies huésped dentro de un reino (Schneider & Roossinck, 2001). Los mecanismos que provocan variabilidad genética en los virus se pueden clasificar en: mutación, delección y reordenamiento.

### 1.3. Mutaciones

Una mutación viral es un cambio que existe en el genoma de los virus a causa de la diversificación del mismo. Por lo general, las mutaciones se dan por errores en la producción de nuevos virus en la célula humana. La mutación es el mecanismo más relevante para la generación de diversidad genética y es la fuente de poder principal para la evolución de cualquier organismo. En los virus ARN existe carencia de la falta de actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores de las ARN polimerasas ARN dependientes (Sanjuán et al., 2010). Esta carencia lleva a una tasa de error del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido copiado, mientras que las tasas que presentan las ADN polimerasas se estiman en el orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  (Vignuzzi et al., 2005)

Estas elevadas tasas de mutación conducen a la generación de un gran número de variantes virales en el transcurso de una infección. Muchos de estos cambios son sinónimos (también conocido como mutaciones), por lo que no presentan impacto directo a nivel de la secuencia aminoacídica. Sin embargo, estas mutaciones pueden afectar la estructura secundaria del ARN viral. (Le Guillou-Guillemette et al., 2007)

Deleciones: Una deleción no es más que un tipo de mutación genética en la cual se pierde material genético del genoma viral, desde un solo par de nucleótidos de ADN hasta todo un fragmento de cromosoma. Es un proceso completamente contrario a las mutaciones por sustitución, pero que al igual, provocan importantes tasas de error.

#### 1.4. La epidemiología molecular y genómica

Epidemiología genómica y epidemiología molecular son dos términos muy utilizados en las últimas dos décadas y más aún durante los últimos dos años en el contexto de la pandemia por la COVID 19. Ambos términos están relacionados pero a la vez poseen cada uno su propia definición. En el primero de los casos, basándose en la definición de la Asociación Internacional de Epidemiología, la epidemiología molecular se puede conceptualizarse como la aplicación de principios epidemiológicos para estudiar los mecanismos moleculares, bioquímicos, celulares y genéticos que subyacen a la fisiopatología, etiología y prevención de enfermedades humanas y sus consecuencias, así como su detección temprana, tratamiento o pronóstico (Porta, 2008; Rodríguez-Morales et al., 2020). La epidemiología molecular estudia los componentes moleculares en general influyen en aspectos epidemiológicos.

Por su parte la epidemiología genómica (o también epidemiología evolutiva), según la definición de los centros de control de enfermedades de los Estados Unidos, se define como el uso de datos genómicos de patógenos para determinar la distribución y propagación de una enfermedad infecciosa en una población específica y la aplicación de esta información para controlar problemas de salud.

Por lo tanto, en el contexto de la pandemia de COVID 19, la epidemiología molecular y genómica o evolutiva hace referencia al estudio de las características moleculares del SARS CoV 2 (como las proteínas que lo conforman) y los cambios que acumula el virus en su genoma a lo en el transcurso del tiempo que dicta su evolución y cómo estos elementos influyen en el curso de la pandemia y en la salud de la población.

## 2. Generalidades de la secuenciación Genómica

El término “secuenciación genómica” se refiere a una serie de procedimientos utilizados para determinar el orden o la secuencia de los nucleótidos en cada uno de los genes presentes en

el genoma del virus. Los nucleótidos son moléculas orgánicas que forman el bloque estructural de los ácidos nucleicos, como ARN o ADN (Citosina, Adenina, Guanina, Timina) (Indu et al., 2014)

El ADN o ARN viral contiene las instrucciones para la síntesis de las proteínas que conforman al virus, conocer estas instrucciones es útil para identificar los cambios en los virus y las consecuencias de estos cambios a nivel epidemiológico.

### 2.1. Antecedentes de la secuenciación genómica

Watson y Crick descubrieron la estructura tridimensional de ADN en 1953, lo que contribuyó a una introducción teórica tanto para la replicación del ADN como para la codificación de proteínas en ácidos nucleicos. Sin embargo, la capacidad de "leer" o secuenciar el ADN no se desarrolló durante algún tiempo. (Heather & Chain, 2016)

En 1965 Robert Holley y colegas fueron capaces de producir la primera secuencia completa de ácido nucleico, la de ARNt de alanina de *Saccharomyces cerevisiae* (Holley et al., 1965). Paralelamente, Fred Sanger y sus colegas desarrollaron una técnica relacionada basada en la detección de fragmentos producidos en una PCR marcados radiactivamente.

Fue también mediante el uso de este método de fraccionamiento 2-D que el laboratorio de Walter Fiers fue capaz de producir la primera secuencia completa del gen codificador de proteínas en 1972, el de la proteína de la cubierta del bacteriófago MS2 (Jou et al., 1972), seguido de cuatro años más tarde por su genoma completo (Fiers et al., 1976).

Después de estos eventos se lograron realizar experimentos que mejoraron la técnica, se desarrollaron secuenciadores, se secuenciaron genes de otros microorganismos y hasta se realizaron experimentos para secuenciar genes humanos (Ansorge et al., 1986, 1987; Chidgeavadze et al., 1984, p. 3; Prober et al., 1987; Smith et al., 1985), sin embargo fue hasta en el 2003 que la tecnología de secuenciación Sanger dió un salto importante, al finalizar con éxito el proyecto del genoma humano, con la secuenciación completa de un genoma humano (después de 13 años de investigación). Los costos de este proyecto ascendieron hasta los 2,700 millones de dólares. (National Human Genome Research Institute, n.d.)

## 2.2. Secuenciación de nueva Generación (NGS)

Desde que se documentó por primera vez, la tecnología de secuenciación Sanger ha sido la prueba estándar para la secuenciación del ADN y la identificación de variantes. Su precisión y relativamente sencillo análisis de datos permitieron su uso en el diagnóstico de enfermedades monogénicas y análisis de genomas microbiológicos; sin embargo, su alto costo limita el uso de esta tecnología, además en enfermedades o genomas que poseen heterogeneidad genética, donde se requiere la secuenciación de múltiples genes, el proceso de secuenciación se hace largo y tedioso. (Md. et al., 2015)

En 2008, se secuenció un genoma humano durante un período de 5 meses por aproximadamente 1,5 millones de dólares, mucho más rápido y menos costoso que la secuenciación del proyecto del Genoma humano, que llevó 13 años. Este logro inició el desarrollo y evolución de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés. (Voelkerding et al., 2009)

La secuenciación de nueva generación (NGS) son un grupo de tecnologías desarrolladas para la secuenciación de gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base (Lander, 2011).

La secuenciación de nueva generación consiste en secuenciar miles de segmentos cortos de una región de un genoma, o de un genoma completo en algunos casos de manera paralela, y finalmente ensamblar todos los segmentos mediante mecanismo bioinformáticos y de esta manera acceder a la región del genoma o genoma secuenciado

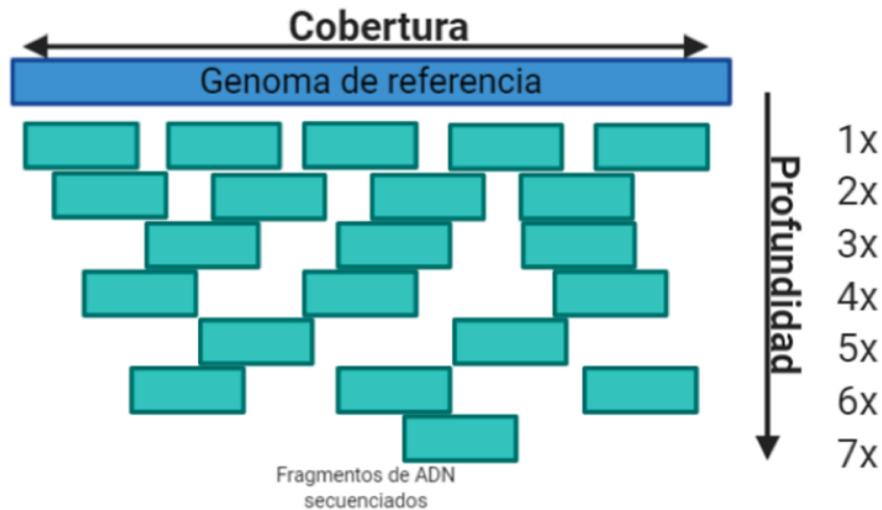


Figura 1: Cobertura y profundidad en la secuenciación de nueva generación. (Rubio et al., 2020)

En la NGS, la cobertura se refiere al porcentaje de bases del genoma de referencia que están siendo secuenciadas una cantidad determinada de veces, por su parte la profundidad se refiere al número de segmentos que pueden secuenciarse de una misma región específica del genoma. (Ver figura 1)

### 2.3. Tecnología de secuenciación illumina

La tecnología de secuenciación illumina es una tecnología de secuenciación de nueva generación que se caracteriza por la ejecución de los siguientes procesos:

- a. Amplificación de fragmentos de ADN para la generación de un clúster (colonias del mismo fragmento) se realiza mediante el método de PCR en puente.
- b. La detección de bases nitrogenadas en la secuenciación mediante etiquetas fluorescentes.

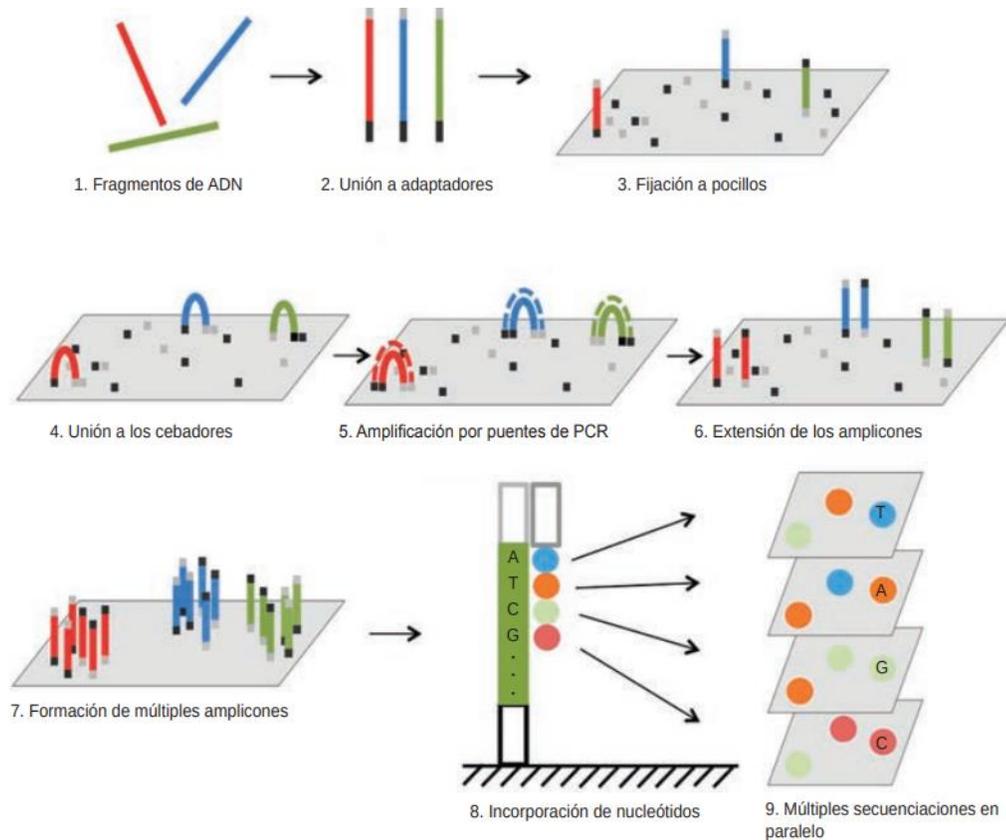


Figura 2: Esquema de la secuenciación con tecnología illumina. (Ball & Pinedo-Donelli, 2020)

### Generación del clúster en la secuenciación illumina

Los fragmentos de ADN se colocan sobre una superficie sólida de vidrio separada por carriles. Cada carril está completamente recubierto por oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de cada fragmento que se va a secuenciar, por lo que permiten que cada fragmento se pueda anclar a la celda de flujo. Una vez anclados los segmentos, la polimerasa inicia el proceso de copia en la hebra de ADN y genera una hebra reversa complementaria. La hebra original es entonces retirada; mientras que la hebra reversa, a través de una secuencia terminal, se pliega y se ancla a su respectiva secuencia complementaria de oligonucleótido, y así queda en forma de puente. Posteriormente, la polimerasa genera una hebra complementaria idéntica a la original, que resulta en dos hebras clonadas del segmento inicial. Este proceso se repite masivamente hasta formar millones de copias de cada

fragmento

### Secuenciación

Una vez concluido el proceso de clonación, se retiran todas las hebras reversas y quedan únicamente las hebras idénticas a las originales. En este punto, en la placa se introducen nucleótidos modificados con etiquetas fluorescentes específicas para cada tipo. Los nucleótidos utilizados presentan una modificación química (terminadores reversibles) que evita la unión de más de un nucleótido marcado en cada sitio de reacción, de tal manera que se puede ubicar el que corresponde a cada punto en la secuencia y se disminuye el riesgo de errores en la secuenciación. Cada vez que una base se adhiere emite una fluorescencia propia que permite su identificación. La etiqueta debe ser removida antes de la colocación del siguiente nucleótido para evitar que dos bases emitan señal a la vez. Al finalizar la primera lectura, el fragmento resultante es retirado. Este paso se repite simultáneamente con todas las hebras del mismo clúster de forma paralela hasta completar la secuenciación (Goodwin et al., 2016; Morozova & Marra, 2008; Rubio et al., 2020).

#### 2.4. Tecnología de Oxford Nanopore (ONT)

La tecnología de Oxford Nanopore se basa en el uso de unas moléculas llamadas nanoporos. Los nanoporos fueron propuestos por primera vez en 1996 por David Deamer y Daniel Branton (Kasianowicz et al., 1996). Estos autores propusieron que un campo eléctrico puede impulsar moléculas de ADN y ARN monocatenario a través de un canal iónico de 2,6 nm de diámetro en una membrana de bicapa lipídica y que la hebra de ADN puede interrumpir parcialmente la corriente eléctrica al pasar por el canal. Estos canales son los nanoporos propuestos para un tipo de secuenciación.

No fue hasta el 2014 que la empresa Oxford Nanopore Technologies ONT, desarrolló la técnica de secuenciación utilizando los nanoporos propuestos por David Deamer y Daniel Branton en 1996, desarrollando esta tecnología a nivel comercial por primera vez (Infante et al., 2020).

La Tecnología de secuenciación de oxford nanopore consiste en hacer pasar una de las hebras del ADN a través del poro de una proteína sintética con un diámetro interior de 1 nanómetro.

Esta proteína está colocada en una membrana de polímero resistente a la electricidad. Cuando el ADN pasa a través del poro se crea una alteración característica en la corriente eléctrica que permite identificar la secuencia de nucleótidos. (Laver et al., 2015)

La secuenciación de ADN por nanoporos alcanza una exactitud superior al 99.99% en secuencias consenso, a pesar de tener una tasa de error superior a otras plataformas de secuenciación más establecidas (Oxford Nanopore Technologies, 2020)

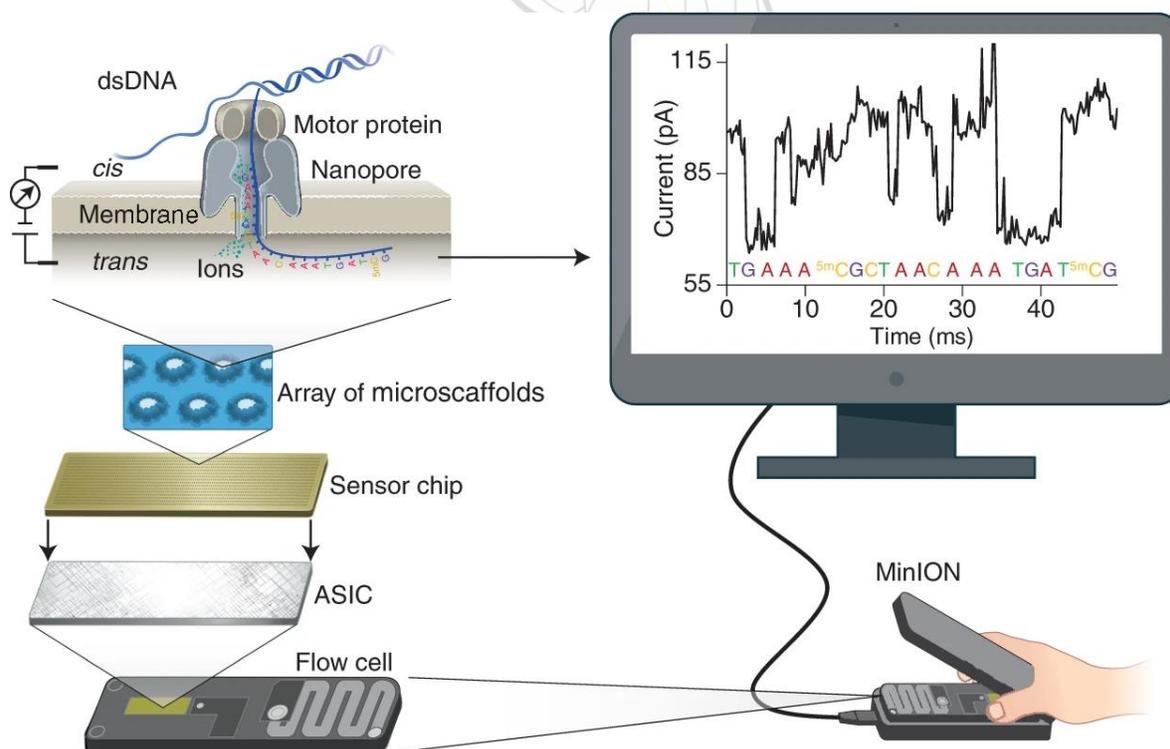


Figura 3: Principio de la tecnología de secuenciación ONT. (Wang et al., 2021)

Una celda de flujo MinION (o flowcell) contiene 512 canales con 4 nanoporos en cada canal, para un total de 2048 nanoporos utilizados para secuenciar ADN o ARN. Estos canales se insertan en una membrana de polímero resistente a la electricidad soportada por una serie de microandamios conectados a un chip sensor. Cada canal se asocia con un electrodo separado en el chip del sensor y es controlado y medido individualmente por el circuito de integración específico de la aplicación (ASIC). La corriente iónica pasa a través del nanoporo porque se aplica un voltaje constante a través de la membrana, donde el lado trans está cargado positivamente. Bajo el control de una proteína motora, una molécula de ADN de doble

cadena (dsDNA) (o un dúplex híbrido de ARN-ADN) se desenrolla primero, luego el ADN de una sola cadena o el ARN con carga negativa se mueve a través del nanoporo, impulsado por el voltaje. A medida que los nucleótidos pasan a través del nanoporo, se mide un cambio de corriente característico y se usa para determinar el tipo de nucleótido correspondiente a ~450 bases por segundo (Wang et al., 2021).

## 2.5. Métodos bioinformáticos en la secuenciación Genómica

La bioinformática se ha convertido en una de las ramas de las ciencias que más protagonismo ha tenido en los últimos dos años, pues está siendo ampliamente utilizada para realizar la epidemiología genómica del SARS CoV. La bioinformática es una disciplina que se encarga de procesar grandes cantidades de datos de origen biológico mediante técnicas informáticas. En la genómica, se encarga de procesar los datos crudos que resultan de los secuenciadores después de los procesos de amplificación y secuenciación de genomas, además de analizar los genomas en busca de cambios genéticos en alguna región de interés.

### Alineamiento de genomas

Es una técnica en bioinformática que se utiliza para comparar dos o más genomas y busca representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados. Las secuencias alineadas se escriben con las letras (representando aminoácidos o nucleótidos) en filas de una matriz en las que, si es necesario, se insertan espacios para que las zonas con idéntica o similar estructura se alineen.



Figura 4: Representación de un alineamiento de genomas, partiendo de una región en común entre tres genomas (hudsonalpha Institute for Biotechnology, 2021).

#### Ensamblaje de genomas

En la secuenciación de nueva generación (NGS) se generan miles de lecturas de una misma región del genoma a lo largo del mismo, es decir a lo largo de todo un genoma miles de fragmentos de secuencias . Estos miles de fragmentos requieren ser ordenados

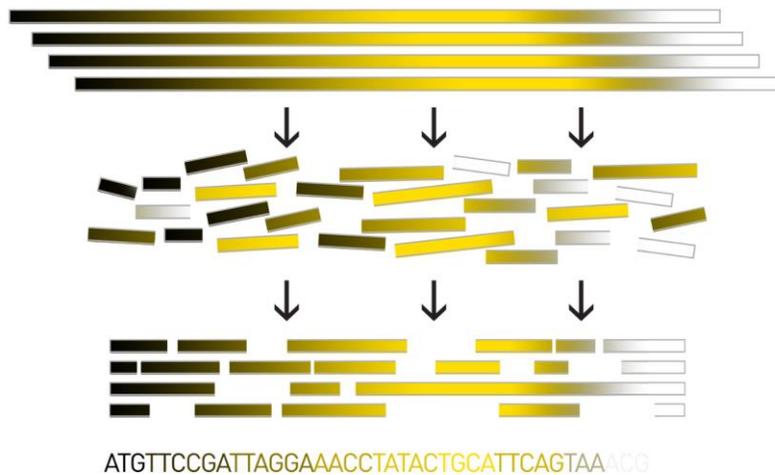


Figura 5: Representación de ensamblaje de genomas (hudsonalpha Institute for Biotechnology, 2021).

El ensamblaje del genoma parte de una secuencia de referencia, una vez realizada una secuenciación de tipo NGS, cada uno de los fragmentos de secuencia generados se alinea a la región correspondiente al genoma de referencia, para finalmente formar una secuencia consenso. Entre mayor sea el número de fragmentos cortos, mayor será la calidad de la secuencia consenso.

Los softwares usados para el ensamblaje de genomas por lo general son incluidos con los secuenciadores adquiridos de manera comercial, sin embargo existen softwares de libre acceso como minimap, miniasm, ngsShoRT.

#### Análisis de mutaciones

Consiste en realizar el análisis de una o más secuencias en la búsqueda de cambios en el genoma. Existen softwares que permiten visualizar los genomas. Con estos softwares se logra revisar todo un genoma en búsqueda de algún cambio genético con respecto a un genoma de referencia.

Cuando las mutaciones son conocidas, es conocida la ubicación de este en el genoma, de esta manera los programas permiten ir hasta la ubicación del genoma y verificar la existencia de algún cambio o mutación. Los softwares más comúnmente usados son: MEGA, AliView, BioEdit y Clustal.

#### Construcción de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos son esquemas que buscan sintetizar la información de las descendencias y las cercanías genéticas entre diferentes especies. Charles Darwin fue uno de los pioneros en la construcción de árboles filogenéticos y actualmente son parte importante en el campo de la epidemiología genómica molecular.

El patrón de ramificación en un árbol filogenético refleja cómo las especies u otros grupos evolucionaron a partir de una serie de ancestros comunes. En los árboles, dos especies están más relacionadas si tienen un ancestro común más reciente y menos relacionadas si tienen un ancestro común menos reciente. Los árboles filogenéticos pueden dibujarse en varios estilos equivalentes. Rotar un árbol alrededor de sus puntos de ramificación no cambia la

información que contiene.

Existen varios métodos en la construcción de árboles filogenéticos, todos se basan en métodos estadísticos para estimar las relaciones entre las especies. Los métodos más utilizados son: Máxima parsimonia, Máxima verosimilitud y métodos con enfoques bayesianos.

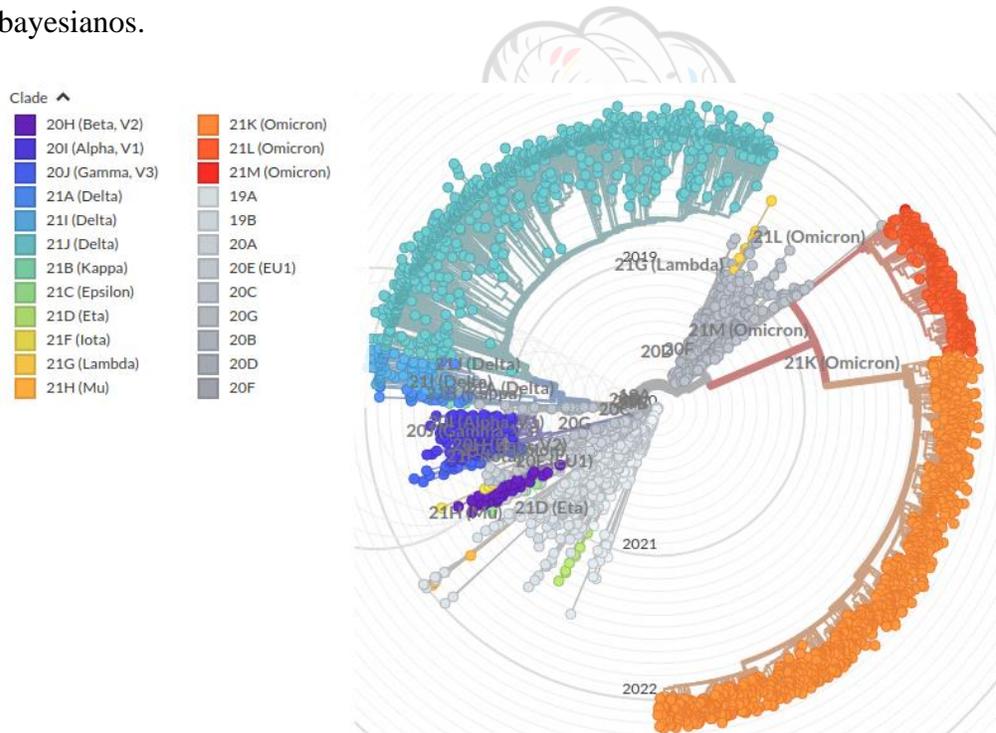


Figura 6: Árbol filogenético radial del historial evolutivo del SARS CoV 2 hasta Marzo 2022 (The Nexstrain Team, 2021)

## 2.6. Artic Network en la vigilancia genómica del SARS CoV 2

El proyecto Artic Network surge de una asociación entre la Universidad de Edimburgo, la Universidad de Birmingham, la Universidad de Cambridge, KU Leuven, la Universidad de Oxford, el Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson y la Universidad de California en Los Ángeles. El proyecto consiste en crear la capacidad de generación de secuencias de manera rápida y portátil implementable en ubicaciones remotas y con recursos limitados, dirigido a una amplia gama de enfermedades virales emergentes como Ébola, Influenza y SARS CoV 2). (Artic Network, 2020)

Para el SARS CoV 2, el proyecto desarrolló una serie de varios protocolos de bajo costo y de acceso libre para la secuenciación del genoma del SARS CoV 2 bajo la tecnología de Oxfor Nanopore Technologies y un protocolo para la tecnología de secuenciación Illumina.

Dentro de estas protocolos se incluye un protocolo de PCR para la amplificación de todo el genoma del SARS CoV 2, un protocolo de secuenciación, un protocolo para el procesamiento bioinformático de las secuencias crudas, el protocolo bioinformático incluye una serie de pipelines para establecer un entorno bioinformático basado en python, el demultiplexado de secuencias crudas y ensamblaje del genoma para la creación de una secuencia consenso. (Artic Network, 2020)

### 2.7. Nextstrain y Pangolín

Nextstrain y pangolin son dos plataformas basadas en la web utilizadas en la vigilancia genómica del SARS CoV 2, principalmente para asignar una nomenclatura a los linajes evolutivos del SARS CoV 2. En ambas plataformas se cargan las secuencias nucleóticas, y se realiza el análisis online. Las plataformas brindan los resultados que son descargables para análisis epidemiológicos.

#### NextStrain

Nextstrain es un proyecto de código abierto para aprovechar el potencial científico y de salud pública de los datos genómicos de distintos patógenos. El proyecto brinda una vista actualizada continuamente de los datos disponibles públicamente junto con potentes herramientas de análisis y visualización para uso de la comunidad. El objetivo principal es ayudar a la comprensión epidemiológica y mejorar la respuesta a los brotes. (The Nexstrain Team, 2021)

Nextstrain se encuentra disponible en línea y consta de componentes de conservación, análisis y visualización de datos a través de scripts de Python, los que mantienen una base de datos de secuencias disponibles y metadatos relacionados, obtenidos de repositorios públicos como NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)) y ViPR ([www.viprbrc.org](http://www.viprbrc.org)), así como repositorios de GitHub y otras fuentes de datos genómicos. Nextstrain aprovecha un conjunto de herramientas realiza análisis filodinámicos, incluido el submuestreo, la alineación, la inferencia filogenética, la datación temporal de los nodos ancestrales y la reconstrucción geográfica de rasgos discretos, incluida la inferencia de los eventos de transmisión más probables. (Hadfield et al., 2018).

Nextstrain hace uso de una nomenclatura que le da nombre a los diferentes clados que surgen del SARS CoV 2 (Ver figura 6) y realiza una distribución mundial de los clados. Esta información está disponible a todas las personas de manera pública. La visualización de datos y aplicación está disponible a través de nextstrain.org.

La nomenclatura Nexstrain nombra a los clados emergentes con números y letras, según el año, el orden y las características del clado, por ejemplo: 20H, 20B, 19A, 21L.

### Pangolín

En abril de 2020, Rambaut et al.( 2020), propusieron y desarrollaron un sistema de nomenclatura dinámica para nombrar y rastrear los linajes de transmisión global del SARS-CoV-2 . Esto se denomina nomenclatura Pango (Rambaut et al., 2021) y complementa otros dos sistemas de nomenclatura del SARS-CoV-2 (NextStrain y GISAID) que se centran en "clados" filogenéticos más amplios y que incorporan criterios de prevalencia y persistencia mínimas.

El sistema de nomenclatura del linaje Pango es jerárquico y de escala fina y está diseñado para capturar la vanguardia de la transmisión pandémica. Cada linaje Pango tiene como objetivo definir un grupo filogenético epidemiológicamente relevante, por ejemplo, una introducción en un área geográfica distinta con evidencia de transmisión posterior (Rambaut et al. 2020). Los linajes Pango son particularmente adecuados para las investigaciones de brotes a escala nacional o regional. La plataforma pangolín se encuentra disponible en <https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html>. La nomenclatura pango nombra a las variantes y variantes con números y letras, por ejemplo: B.1.1.7, B.1.52, P2

## **3. Características genéticas y moleculares del SARS CoV 2.**

### **3.1. El SARS CoV 2**

El SARS CoV 2 (Coronavirus tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo), del inglés severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, es un virus ARN monocatenario de cadena positiva, perteneciente a la familia coronaviridae, género Betacoronavirus, subgénero Sarbecovirus y a la especie de los virus SARS-CoV, subespecie SARS-CoV 2 (National Center for Biotechnology Information, 2020b). Se descubrió y aisló por primera vez en la capital de la provincia china de Hubei, Wuhan y es causante de la enfermedad COVID-19 (inicialmente 2019-nCov), la cual se propagó mundialmente causando una pandemia de

grandes escalas.

La secuencia genética del SARS CoV 2 se aisló de un paciente con neumonía en la ciudad de Wuhan, que laboraba en un mercado de wuhan donde se realizaba comercio de animales exóticos. La secuenciación se realizó con la tecnología NGS MiniSeq (Illumina). (National Center for Biotechnology Information, 2020a; Wu et al., 2020)

### 3.2. Origen del SARS CoV 2

El 30 de diciembre de 2019, las autoridades sanitarias de la ciudad de Wuhan informaron sobre la aparición de veintisiete personas diagnosticadas de síndrome respiratorio agudo grave de origen desconocido; la mayor parte de los casos estaban relacionados con el Mercado Mayorista de Mariscos del Sur de China ubicado en la ciudad. El 7 de enero de 2020 las autoridades chinas declararon que habían descubierto que la causa de la enfermedad era un nuevo virus de la familia de los coronavirus que fue nombrado provisionalmente como 2019-nCoV (coronavirus de Wuhan). El 10 de enero se anunció que se había aislado y se publicaría el primer genoma secuenciado del nuevo coronavirus.

Hasta la fecha, la comunidad científica no ha logrado determinar de manera consensuada el origen del SARS CoV 2. Existen diversas hipótesis sobre su origen. Una de las hipótesis más aceptada es la del origen zoonótico del SARS CoV 2, esta hipótesis se fundamenta en un estudio que, Wu et al. (2020) formularon, donde se sugiere que, presumiendo el origen del SARS CoV 2 el 17 de noviembre de 2019, se pudo haber efectuado el primer contacto entre el SARS-CoV-2 y un individuo humano por infección zoonótica. La fecha ha sido estimada asumiendo un período máximo de incubación de 24 días. Esto supone que el virus se transmitió de manera silente hasta la detección oficial del primer caso confirmado.

Un análisis de la primer secuencia del SARS Cov 2, sugiere un emparentamiento genético entre el SARS CoV 2 y coronavirus de murciélagos, sugiriendo al murciélago como un potencial huésped intermedio en el salto de estos coronavirus hacia los humanos. Wu et al. (2020) mostraron una estrecha relación genética entre el SARS CoV 2 y betacoronavirus de murciélagos. Por su parte, otro análisis filogenético reafirma esta hipótesis, pero añade que el salto del SARS CoV 2 hacia los humanos incluye a otros mamíferos como el pangolín,

ampliando la lista de posibles mamíferos reservorios que pudieron estar involucrados. Este análisis no excluye al murciélago (Gómez-Carballa et al., 2020).

### 3.3. Estructura del SARS CoV 2

El estudio de la estructura del SARS CoV 2 sobresale para el estudio del cambio de la estructura y su impacto en la inmunidad. Es muy estudiado que los cambios adaptativos del SARS CoV 2 y las mutaciones provocan una alteración a la estructura del SARS CoV 2. Estas alteraciones juegan un rol importante en la evasión de la inmunidad del SARS CoV 2 (Beyer & Forero, 2022; Thorne et al., 2022)

El genoma viral contiene la información que codifica la estructura del SARS CoV 2. El genoma contiene las siguientes regiones:

- Gen ORF1a
- Gen ORF1b
- Gen S (Spike)
- Gen E (Envoltura)
- Gen M (Membrana)
- Gen N (Nucleocápside)

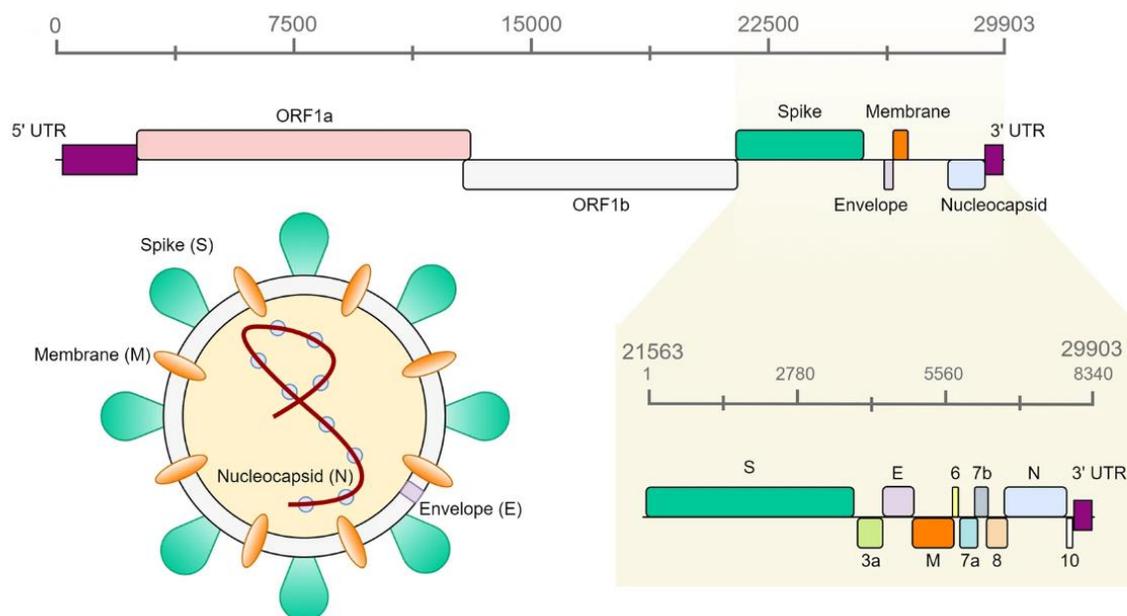


Figura 8: Organización genética de SARS-CoV-2. Esquema del genoma RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) de SARS-CoV-2. Hacia el extremo 5', se codifica el gen de la replicasa viral por medio de ORF 1a y ORF 1b para la traducción de las poliproteínas pp1a y pp1ab. Hacia el extremo 3', se codifican los genes de las 4 proteínas estructurales principales (S), (E), (M) y (N) y las de las proteínas accesorias (D. Singh & Yi, 2021)

#### 4. Historial evolutivo del SARS-CoV-2

##### 4.1. Definiciones claves de la nomenclatura de los linajes del SARS CoV 2

Los virus cambian a lo largo del tiempo, estos cambios son más frecuentes en virus ARNs, como el SARS CoV 2. No existe una metodología consensuada para nombrar a las variantes virales. En vista a esto, la OMS instó a llamar a las variantes por las letras del alfabeto griego. La clasificación de la OMS es utilizada como referencia, aún así las nomenclaturas Nextstrain y Pangolín son utilizadas de igual manera, principalmente en investigación.

A continuación se presenta una tabla de equivalencia con las tres nomenclaturas, extraídas de la página oficial de la OMS dedicada a la divulgación de la información de las variantes del SARS CoV 2.

Tabla 1: Equivalencia de las nomenclaturas de la OMS, Nextstrain y Pangolín (Organización Mundial de la Salud, 2022)

| Clasificación OMS | Nomenclatura pango | Nomenclatura Nextstrain | Lugar de primera identificación | Designación                               |
|-------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|---|
| Alpha             | B.1.1.7            | 20I(V1)                 | Reino Unido<br>Sep-2020         | VOC =<br>18/12/2020                       |
| Beta              | B.1.355            | 20H(V2)                 | Sur Africa<br>Mayo 2020         | VOC =<br>18/12/2020                       |
| Delta             | B.1.617.2          | 21A, 21I, 21J           | India<br>Oct-2020               | VOI =<br>04/04/2021<br>VOC =<br>1/05/2021 |
| Gamma             | P.1                | 20J (V3)                | Brazil<br>Nov- 2020             | VOC =<br>11/01/2021                       |
| Epilson           | B.1.427<br>B.1.429 | 21C                     | EE.UU<br>Mar-2020               | VOI =<br>17/03/2021                       |
| Zeta              | P.2                | 20B                     | Brazil<br>Abr-2020              | VOI =<br>17/03/2021                       |
| Eta               | B.1.525            | 21D                     | Varios Países<br><br>Dic-2020   | VOI =<br>17/03/2021                       |
| Theta             | p.3                | 21E                     | Filipinas<br>Ene-2021           | VOI =<br>24/03/2021                       |
| Iota              | B.1.526            | 21F                     | EE.UU<br>NOV-2020               | VOI =<br>24/03/2021                       |
| Kappa             | B.1.617.1          | 21B                     | India<br>Oct-2020               | VOI=<br>04/04/2021                        |
| Lambda            | C.37               | 21G                     | Perú<br>Dic-2020                | VOI =<br>14/06/2021                       |
| Mu                | B.1.621            | 21H                     | Colombia                        | VOI =                                     |

|   |           |     |                           |  |
|---|-----------|-----|---------------------------|--|
|   |           |     |                           | 30/08/2021                                 |
| Omicrón   | B.1.1.529 | 21K | Varios Países<br>Nov-2021 | VUM =<br>24/11/2021<br>VOC =<br>26/11/2021 |
| VOC = Variantes de preocupación (de las siglas “Variant of Concern”)<br>VOI = Variante de interés (de las siglas Variant of Interest)<br>VUM = Variante bajo seguimiento (de las siglas “Variant Under Monitoring”) |           |     |                           |  |

#### 4.2. Variantes de Interés

Las variantes de interés designadas con las iniciales VOI (del inglés variants of interest) son variantes del SARS CoV 2 que poseen marcadores o características genéticas específicos, a los que se ha asociado a cambios en la unión al receptor, una menor neutralización por los anticuerpos generados contra una infección anterior o la vacunación, una menor eficacia de los tratamientos, el posible impacto del diagnóstico, o el aumento pronosticado en la transmisibilidad o gravedad de la enfermedad.

Las variantes de interés tienen la característica de no cambiar la situación epidemiológica de la COVID 19 en un área determinada o a nivel internacional, a pesar de la evidencia demostrada en los cambios del genoma viral y en la disminución de la inmunidad o cambios en la transmisibilidad

una variante de interés podría requerir una o más medidas de salud pública adecuadas, incluida una mejor vigilancia secuencial, una mejor caracterización de laboratorio o investigaciones epidemiológicas para evaluar con qué facilidad se propaga el virus a otras personas, la gravedad de la enfermedad, la eficacia de los tratamientos y si las vacunas aprobadas o autorizadas actualmente ofrecen protección.

A lo largo de la pandemia, se pueden listar las siguientes variantes de interés: Epsilon, Eta, Lambda, Mu, Iota, Kappa, Theta, Zeta.

### 4.3. Variantes de Preocupación

Son variantes del SARS CoV para las cuales existe evidencia de una mayor transmisibilidad, casos más graves de enfermedad (por ejemplo, mayor cantidad de hospitalizaciones o muertes), reducción significativa en la neutralización por los anticuerpos generados durante una infección anterior o la vacunación, menor efectividad de los tratamientos o las vacunas, o fallas de detección de diagnóstico.

Las variantes de preocupación tienen la capacidad de cambiar rápida o paulatinamente la situación epidemiológica de un país o región.

Las variantes de preocupación pueden poseer los siguientes atributos:

- Evidencia del impacto sobre el diagnóstico, los tratamientos o las vacunas
  - Interferencia generalizada con los objetivos de las pruebas de diagnóstico
  - Evidencia de susceptibilidad sustancialmente menor a una o más clases de tratamientos
  - Evidencia de neutralización significativamente menor por los anticuerpos generados durante una infección previa o la vacunación
  - Evidencia de una menor protección inducida por la vacuna ante enfermedades graves
- Evidencia de mayor transmisibilidad
- Evidencia de mayor gravedad de la enfermedad

Las variantes de preocupación pueden requerir una o más acciones de salud pública como la notificación por la OMS para regulaciones de movilidad internacional, esfuerzos para frenar la propagación, incremento de pruebas, investigación de la eficacia de las vacunas, entre otras. Con base en las características de la variante, las consideraciones adicionales pueden incluir la elaboración de nuevos diagnósticos o la modificación de las vacunas o tratamientos.

### 4.4. Mutaciones de importancia epidemiológica

Para fines de vigilancia, es importante monitorear algunas mutaciones desarrolladas por las variantes. Las mutaciones vigiladas con mayor frecuencia son aquellas que se presentan en

la proteína S y en las regiones ORF. Los cambios en la proteína S han sido relacionados con un aumento en la transmisibilidad viral, evasión de la inmunidad por vacunas y aumento de la probabilidad de provocar enfermedad severa y hospitalización.

Mutaciones de la proteína S expresadas por la variante Delta

Sustituciones de la proteína S en DELTA: DT19R, (V70F\*), T95I, G142D, E156-, F157-, R158G, (A222V), (W258L), (K417N\*), L452R, T478K, D614G, P681R, D950N.

Sustituciones de la proteína S en Omicrón: A67V, del69-70, T95I, del142-144, Y145D, del211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Características:

- Mayor transmisibilidad
- Reducción en la neutralización por sueros postvacunación

##### **5. Distribución y propagación del SARS CoV 2 y sus linajes evolutivos**

Hasta Abril del 2022, el SARS CoV 2 se ha propagado a 226 países. (Worldometer, 2022) No existe una tendencia definida en la propagación del SARS CoV 2, pero los análisis espaciales y geo-filogenéticos muestran que la mayoría de las nuevas variantes son identificadas en países con grandes volúmenes de población (Como India, EE.UU y Brazil) (J. Singh et al., 2021) y en países con bajas tasas de vacunación (como Sudáfrica).

La plataforma para el seguimiento y vigilancia genómica del SARS Cov 2, GISAID, ha mostrado cómo en algunos continentes existe una mayor capacidad de divergencia genética por el SARS CoV 2, mostrando una correlación entre las altas tasas de mutaciones entre la diversificación genética del SARS CoV 2 y algunos territorios. (GISAID, 2022)

Otra característica que se puede inferir visualizando la propagación de las variantes en el mundo mediante la plataforma GISAID, es que las nuevas variantes inician a propagarse en los mismos países, países que tienen en común no solamente poblaciones grandes, si no

también la capacidad de movilizar a las poblaciones dentro y fuera de los territorios. (Parralucres et al., 2022)

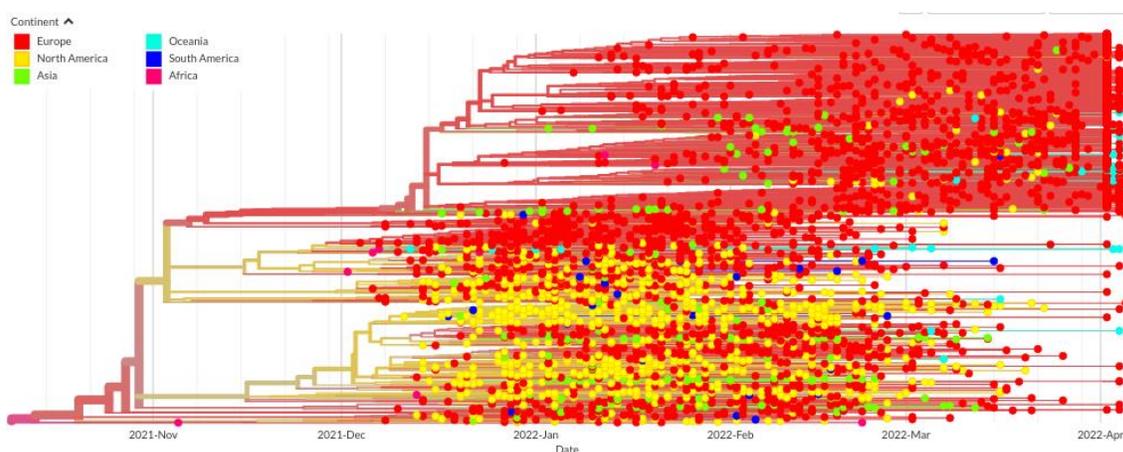


Figura 9: Árbol filodinámico de Omicron (GISAID, 2022)

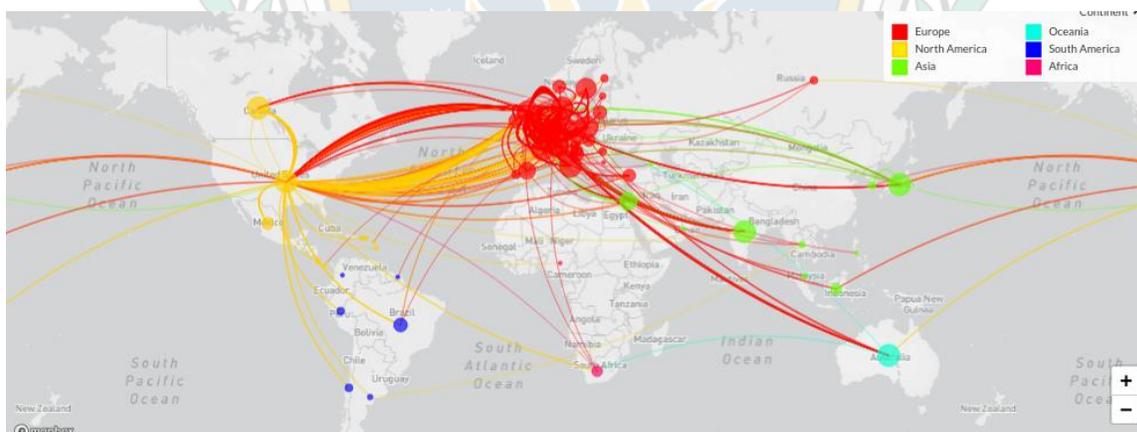


Figura 10: Dinámica de la propagación de la variante omicrón. (GISAID, 2022)

Las figuras 1 y 2 muestran la dinámica de la propagación de la variante Omicrón. Esta variante fue identificada por primera vez en Botswana, Hong Kong y Sudáfrica y desde estos países se propagó de manera significativa hacia Norteamérica, y de inmediato a Europa. Si bien se sabe que la propagación de Omicrón fue significativamente rápida, América latina fue de los últimos territorios donde se identificó. Por su parte los patrones de comportamiento son similares entre los diferentes países independientemente del momento en que ingresó una

variante. La variante Delta, por ejemplo, se comportó de manera similar en todos los países desde un punto de vista epidemiológico, de igual manera la variante Omicrón.

## **6. Las variantes y su correlación con características biológicas de los infectados**

Desde que inició la pandemia se ha generado una gran cantidad de datos que, durante el curso del tiempo se han analizado y publicado. Muchos resultados de investigaciones resultaron estar equivocados por sesgos provocados por el hecho de analizar datos de una enfermedad emergente. Muchos investigadores intentaron definir la correlación entre adquirir una determinada variante con la edad, o el sexo o alguna otra característica, sin embargo los resultados fueron variados. En los picos epidémicos, se identificó que los hombres tenían más probabilidades de contraer COVID-19 por la variante circulante, de ser hospitalizado y de morir por COVID-19 (Peckham et al., 2020), además de un mayor riesgo de tener cargas virales más altas (Acer et al., 2022), sin embargo los autores también definen el contexto de las investigaciones, en algunas zonas del mundo, los hombres se infectaron más por una determinada variante, pero eran quienes más se exponían (Muurlink & Taylor-Robinson, 2020, p. 19).

Las correlación entre una variante con algunas características biológicas tienen de alguna trascendencia biológica, pero más trascendencia social. La mayoría de las correlaciones identificadas tienen un trasfondo social. (Flor et al., 2022)

## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

### **Enfoque de investigación:**

Cuantitativo: En la investigación se realizaron mediciones objetivas y análisis estadístico a partir de datos recopilados, mediante el uso de técnicas informáticas para análisis estadístico.

### **Tipo de Estudio:**

Descriptivo de corte transversal: En la investigación se buscó puntualizar las características de la población diana para el estudio. Además, la investigación se centra en determinar el “qué”, “cuándo” y “dónde”.

Analítico: El último objetivo del estudio se enfoca en determinar las relaciones entre variables específicas mediante modelos estadísticos para establecer inferencias.

### **Área de Estudio:**

Departamentos de Nicaragua

### **Universo:**

1069 Secuencias del SARS CoV 2 obtenidas entre Marzo del 2020 y Septiembre 2022 de diversas zonas del territorio Nacional, mediante la vigilancia Nacional del SARS CoV 2, de una cohorte pediátrica del distrito II de Managua y de una cohorte de hogares del distrito II de Managua.

### **Muestra:**

Por el alcance del estudio (A nivel Nacional) y por la naturaleza del muestreo, se incluyeron todas las secuencias obtenidas de la secuenciación genómica, por esta razón no se calculó la muestra.

### **Unidad de Análisis:**

Secuencias nucleotídicas del SARS CoV 2 obtenidas mediante secuenciación genómica a partir de hisopados respiratorios de pacientes con COVID-19, obtenidos en los diferentes departamentos de Nicaragua entre marzo del 2020 y septiembre 2022

### **Criterios de selección:**

Criterios de inclusión: Secuencias nucleotídicas del SARS CoV 2, obtenidas mediante las técnicas de secuenciación de Oxford Nanopore Technologies (ONT) y secuenciación Illumina, entre el período marzo 2020 y septiembre 2022, con resultados de las plataformas bioinformáticas para la vigilancia genómicas del SARS CoV 2: NextClade y/o Pangolín

Criterios de exclusión: Secuencias que no pasaron los controles de calidad de las plataforma Nexstrain y que consecuentemente no pudieron ser clasificadas como variante del SARS CoV 2.

### **VARIABLES DE ESTUDIO:**

**Objetivo 1.** Determinar características evolutivas, genéticas y moleculares de los linajes del SARS CoV 2 basado secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

- Variante
- Sublinaje
- Mutaciones
- Número de mutaciones

**Objetivo 2.** Describir el comportamiento de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el tiempo

- Fecha de aparición
- Frecuencia de Variantes
- Frecuencia de sublinajes

**Objetivo 3.** Identificar la distribución espacial del SARS CoV 2 y sus linajes evolutivos.

- Variantes circulantes
- Sublinaje Circulante
- Procedencia de la muestra

**Objetivo 4:** Estimar la asociación entre las variantes del SARS CoV 2 y las características demográficas de las personas a quienes se les tomó una muestra para secuenciación.

- Sexo
- Edad
- Variantes

**Fuentes de información:**

Base de datos de vigilancia genómica del SARS CoV 2 del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), la cual está a cargo del personal del laboratorio de biología molecular.

**Técnicas de recolección de datos:**

Revisión de bases de bases de datos de los resultados de secuenciación del SARS CoV 2.

**Instrumento de recolección de datos:**

**Fichas epidemiológicas para la vigilancia IRAs e IRAG:** Las muestras biológicas (hisopados respiratorios) fueron enviadas desde las diversas unidades de SALUD del territorio nacional hacia los SILAIS, cada muestra iba acompañada con una ficha epidemiológica donde se recolectó información del paciente y de la muestra tomada. Esta información se digitó en tablas de MS excel para su resguardo por el personal del área de informática en el CNDR.

**Protocolos de trabajo para la secuenciación del SARS CoV 2:** Los procesos analíticos de laboratorios se registran en un protocolo físicos de trabajo. En estos protocolos se registra la

fecha del procesamiento, el procedimiento realizado, reactivos utilizados, observaciones, resultados obtenidos y analistas que realizan el proceso analítico.

**Tablas de datos de Microsoft Excel para el registro de resultados de estudios moleculares por laboratorio:** Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de secuenciación y biología molecular. Los resultados fueron almacenados en una base de datos en MS Excel en resguardo del personal del laboratorio. El personal del área de informática brindó información faltante (SILAIS, Fecha de inicio de síntomas, Fecha de toma de la muestra). Además, el resultado de qRT-PCR para el diagnóstico de PCR y el cálculo del porcentaje de positividad es almacenado en tablas de MS Excel.

#### **Procesamiento de la información:**

La información para el análisis proviene de la base de datos que contiene los resultados de los análisis moleculares del SARS CoV 2 e información de las muestras analizadas.

El análisis estadístico, construcción de tablas y gráficos se realizó mediante programación con el lenguaje python3.9, un lenguaje de programación multipropósito que permite realizar transformación de estructuras de datos, análisis estadísticos y construcción de gráficos. Además del lenguaje base de python3.9 se hizo uso de las siguientes librerías especializadas:

Pandas (para transformación de estructuras de datos y asignación de cualidades a las variables para el análisis)

Matplotlib (Para construcción básica de gráficos y asignación de atributos a los diferentes gráficos)

Seaborn (para la construcción de gráficos con características particulares)

GeoPandas (Para la transformación y manipulación de datos geográficos)

Datetime (Para la manipulación y control de formatos de las fechas)

Se utilizó el entorno de desarrollo integrado (IDE) “Spyder” versión 4., al utilizar este IDE fue posible acceder a una variedad de herramientas y funciones integradas diseñadas para hacer que la escritura, la prueba y la depuración de código de programación durante el análisis

fueran más eficientes y efectivas, además de permitir visualizar de manera gráfica los gráficos y tablas durante el análisis. Finalmente, el uso de este IDE hizo posible acceder a un notebook donde se guardaba todo el código de programación, lo que permitió revisar, y mejorar los análisis realizados cuando era necesario.

Se tuvo acceso al porcentaje diario de casos positivos. Con estos datos se construyó una curva con el porcentaje de casos positivos con el fin de visualizar la dinámica de la positividad del SARS CoV 2 durante la pandemia.

Para el análisis de correlaciones y cálculo de los Odd Ratios (OR) se utilizó el lenguaje de programación “R” y el IDE RStudio. Para este propósito se construyeron modelos de regresión logística univariada y multivariada para estimar asociaciones (Thulin, 2021). A partir de los resultados de las regresiones logísticas se estimaron los OR, intervalos de confianza y valor de p. Para graficar los resultados, se construyeron gráficos de forest plots, donde la línea vertical paralela al eje y, (en el valor 1 del eje x) representa el valor de referencia o punto neutro (Este valor es igual a 1). Los puntos en el gráfico representan los OR para cada variante, y los segmentos que se extienden desde cada punto indican los intervalos de confianza correspondientes.

### **Sesgos y control**

Para el diseño de la presente investigación no se diseñó una estrategia de muestreo debido a que los datos provienen de la vigilancia nacional del MINSA, por esta razón existe una influencia potencial del sesgo de muestreo y selección de la vigilancia nacional en la investigación. La manera que se realizaba el muestreo por parte del Ministerio de Salud pudo cambiar debido a los cambios de la situación epidemiológica del país, lo que puede introducir sesgos en la representación de la muestra en la presente investigación.

### **Consideraciones Éticas**

Los Hisopados respiratorios utilizados en este estudio son procedentes de la vigilancia nacional del SARS CoV 2 del Ministerio de Salud . Los hisopados y datos de las cohortes

son parte de la vigilancia del SARS CoV 2, para investigaciones sobre la vigilancia epidemiológica del país, no se requiere consentimiento informado. Al realizar las pruebas de laboratorios y el análisis de datos no se tuvo acceso a información personal de los pacientes.

Este estudio fué sometido a valoración por el comité de ética del instituto de Ciencias Sostenibles, además, se obtuvo la aprobación para el uso y publicación de los resultados por parte de las autoridades del CNDR. Finalmente, el comité de ética del Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud (CIES) revisó el protocolo de investigación y aprobó llevar a cabo la investigación.

Este estudio se condujo bajo estrictos principios éticos, respetando en todo momento la dignidad, derechos y bienestar de los individuos cuyos datos fueron analizados. A continuación, se detallan las medidas adoptadas para asegurar la ética y la integridad en la realización de esta investigación:

- **Confidencialidad y Privacidad:** Se garantiza la confidencialidad y privacidad de la información de los participantes mediante la des-identificación de los datos previo al análisis de las muestras mediante laboratorio y análisis de la información. No se tuvo acceso a información personal que permitiera identificar a los individuos.
- **Inclusividad y No Discriminación:** La investigación se desarrolló bajo un enfoque inclusivo, asegurando la representatividad de los análisis y evitando cualquier forma de discriminación o exclusión basada en la procedencia de las muestras o cualquier otra información demográfica analizada.
- **Objetividad y Honradez:** Todos los resultados presentados son reflejo fiel de los datos analizados, no habiendo alteración con el fin de sesgar las conclusiones del estudio. La interpretación de los datos se realizó de manera objetiva y transparente.
- **Permiso y Consentimiento:** Se obtuvieron todos los permisos y consentimientos necesarios para acceder y utilizar la información para fines de investigación.
- **Transparencia y Reproducibilidad:** El diseño metodológico y los métodos de análisis son detallados de forma transparente para permitir la validación y reproducción de los resultados por parte de la comunidad científica.

## **Trabajo de campo**

Recolección de la muestra: La recolección de la muestra y llenado del formulario fue realizado por el personal de las unidades de salud de los diferentes SILAIS de Nicaragua.

Las muestras utilizadas para el análisis en el laboratorio fueron hisopados respiratorios. Estos fueron tomados en unidades de salud primaria y en hospitales para posteriormente enviarlo a sus SILAIS correspondientes. De cada uno de los SILAIS las muestras fueron transportadas junto a las fichas epidemiológicas hacia el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en Managua para análisis de PCR. Las muestras provenientes de la cohorte pediátrica fueron tomadas por el personal del laboratorio del Centro de Salud Sócrates Flores Vivas y enviadas cumpliendo con la cadena de frío del CNDR.

## **Análisis de laboratorio**

**PCR de diagnóstico:** En el laboratorio todos los hisopados que llegan al CNDR fueron procesados mediante qRT-PCR. Los hisopados fueron alicuotados e inactivados en un área para este fin, en cabina de bioseguridad tipo II. Una vez inactivada la muestra, fue trasladada al laboratorio de PCR de virus respiratorios, donde, en primera instancia, se realizó la extracción del ARN viral. Posteriormente se realizó un PCR en tiempo real bajo un protocolo de PCR Multiplex estandarizado por el instituto de virología del Hospital Universitario de Charité (Corman et al., 2020), bajo la plataforma ABI 7500 Fast PCR platform (Applied Biosystems, Foster, CA, EE.UU) para su posterior validación. Durante todo el proceso analítico, las muestras y ARN viral fueron manipulados en cabinas de bioseguridad tipo II y con todos los equipos de protección personal requeridos. Las muestras positivas por PCR con ct entre 18-30 fueron elegidas para ser secuenciadas.

Después de confirmar los casos positivos de SARS CoV por PCR en tiempo real, algunas muestras fueron elegidas para ser enviadas al hospital Monte Sinaí, Nueva York, EE.UU, para ser secuenciadas bajo la tecnología Illumina. Realizada la secuenciación, las secuencias consenso fueron enviadas a Nicaragua para el análisis bioinformático.

**Generación de amplicones del genoma viral por PCR:** La secuenciación en Nicaragua, inició en el mes de junio del 2021. Durante el período comprendido entre Junio 2021 y Julio

2022, para la secuenciación se utilizó el protocolo de acceso libre de la red ARTIC (ARTIC Network, 2020). El ARN viral previamente extraído fue sometido a un proceso de cDNA (ADN complementario), que permite generar una secuencia complementaria a la hebra de ADN mediante retrotranscripción.

Después de obtener el producto de la retrotranscripción se realizó un PCR. El método de la red ARTIC provee un PCR para amplificar todo el genoma del SARS CoV 2, con 98 primers divididos en un pool de primers A que amplifica de 5' a 3' la cadena de ADN principal, y un pool B de primers que amplifican la cadena complementaria de 3' a 5'. Después de realizar el PCR, se llevó a cabo una electroforesis para discriminar aquellas muestras que presentaban bandas de 400 pares de bases (pb).

A partir de agosto del 2022, debido a los múltiples cambios y mutaciones que han surgido en el genoma del SARS CoV 2, se realizó una actualización hacia el protocolo comercial “midnight”. Este protocolo fue utilizado para secuenciar muestras a partir de esta fecha con un PCR más sensible y específico a las variantes Delta y Omicrón, y permitió generar amplicones de hasta 1200 pb (Oxford Nanopore Technologies, 2021).

**Preparación de la librería:** Después de realizar el PCR de amplificación del genoma, las muestras que amplifican segmentos de 400 pb o 1200 pb según el protocolo, fueron elegidas para realizar una librería de muestras, para su posterior secuenciación. En este proceso se realizaron una serie de procedimientos de laboratorio basados en métodos de biología molecular con el objetivo de normalizar la concentración de ADN de las muestras (amplicones generados en el PCR), además, durante la preparación de la librería se añadieron marcadores moleculares a cada una de los amplicones de ADN de cada muestra, estos marcadores moleculares son secuencias nucleotídicas sintéticas cortas que permiten la identificación de cada amplicón secuenciado. a cada muestra se le añadió un marcador específico que permitió identificarla.

El protocolo de secuenciación de la red ARTIC utiliza un método de adición de los marcadores basados en ligación. Con este método se utilizó una enzima “ligasa” que a temperaturas específicas en un termociclador y en un tiempo de 30 minutos aproximadamente, facilitó la unión molecular entre los amplicones de ADN de las muestras y los adaptadores (marcadores

moleculares), posteriormente se realizó una purificación para remover el exceso de adaptadores y después se procedió a realizar una ligación de otro adaptador que une la cadena complementaria con la cadena principal.

Con el protocolo de secuenciación midnight se utilizó un método de adición de los adaptadores basado en tagmentación y unión mediante transposomas. Con este método se expusieron los amplicones generados durante el PCR (1200 pb) a perlas que contienen transposomas que recortan los amplicones y a la vez añaden adaptadores mediante una enzima transposasa. Este método resulta ser más rápido (5 minutos a temperatura idónea de 25 grados) y no requiere la unión de un segundo adaptador.

Una vez culminada la unión de los adaptadores, los amplicones de cada muestra marcados con su respectivo adaptador se unieron en un vial y se realizó una limpieza a partir de perlas magnéticas y buffers de purificación. Al final de este proceso, se midió la concentración de la librería por un método fluorométrico. La secuenciación con el método de la red ártic requiere una concentración de ADN de 0.6 a 1.1 ng/uL. El método Midnight requiere una concentración de 73 a 100 ng/ul.

La librería final se colocó en una flowcell, un dispositivo que contiene nanoporos por donde se secuencian los amplicones marcados. La flowcell se colocó en el dispositivo MinION, que es el dispositivo que se encarga de poner en marcha la secuenciación. Este dispositivo es conectado a una computadora y controlado por el software “Minknow”.

**Análisis Bioinformático:** Con el software MinKnow la información fue almacenada en una computadora, además se procesó la información producida por el secuenciador, el secuenciador genera archivos en formato “fast5”, estos archivos contienen la información cruda de la secuenciación en un formato binario. Durante el proceso, en tiempo real y en segundo plano, el software “Guppy” realizó la transformación de los archivos binarios fast5 a archivos en formato “fastq”, estos archivos en formato fastq contienen las secuencias de los fragmentos secuenciados (miles de secuencias cortas por cada muestra), así como información de control de calidad, las secuencias de primers utilizados e información de nucleótidos sintéticos (adaptadores) utilizados para identificar cada una de las muestras. Los archivos fastq fueron almacenados en la computadora donde se realizó la secuenciación y

clasificados con el nombre de cada adaptador o marcador (barcode01, barcode02, etc). Cada marcador identifica a una muestra específica.

Para obtener una secuencia definitiva, se realizó una serie de procedimientos bioinformáticos que permitieron recortar y eliminar las secuencias de primers y adaptadores de las secuencias que poseen los fragmentos del genoma viral y finalmente ensamblar todos los fragmentos mediante una estimación estadística para generar una secuencia consenso.

Cada uno de los protocolos de secuenciación utilizados posee su protocolo bioinformático. Ambos protocolos bioinformáticos fueron ejecutados en el sistema operativo GNU-Linux, distribución Ubuntu 20.04. El protocolo de la red artic: “artic-ncov2019” es un protocolo basado python y C++ y contempla realizar un paso de demultiplexado de las lecturas obtenidas con el software “Porechop” (Wick, 2017/2022), en este paso se eliminaron los adaptadores y se generó un archivo fastq para cada una de las muestras sin los adaptadores. El ensamblaje del genoma para la obtención de las secuencias consensos fue realizado con el software medaka (Nanoporetech, 2017/2022), la secuencia consenso es la secuencia definitiva del genoma secuenciado. En el protocolo midnight se utilizó el workflow bioinformático “wf-artic” de la plataforma “epitome” desarrollado por la empresa Oxford Nanopore Technologies (*ARTIC SARS-CoV-2 Workflow*, 2021/2023)

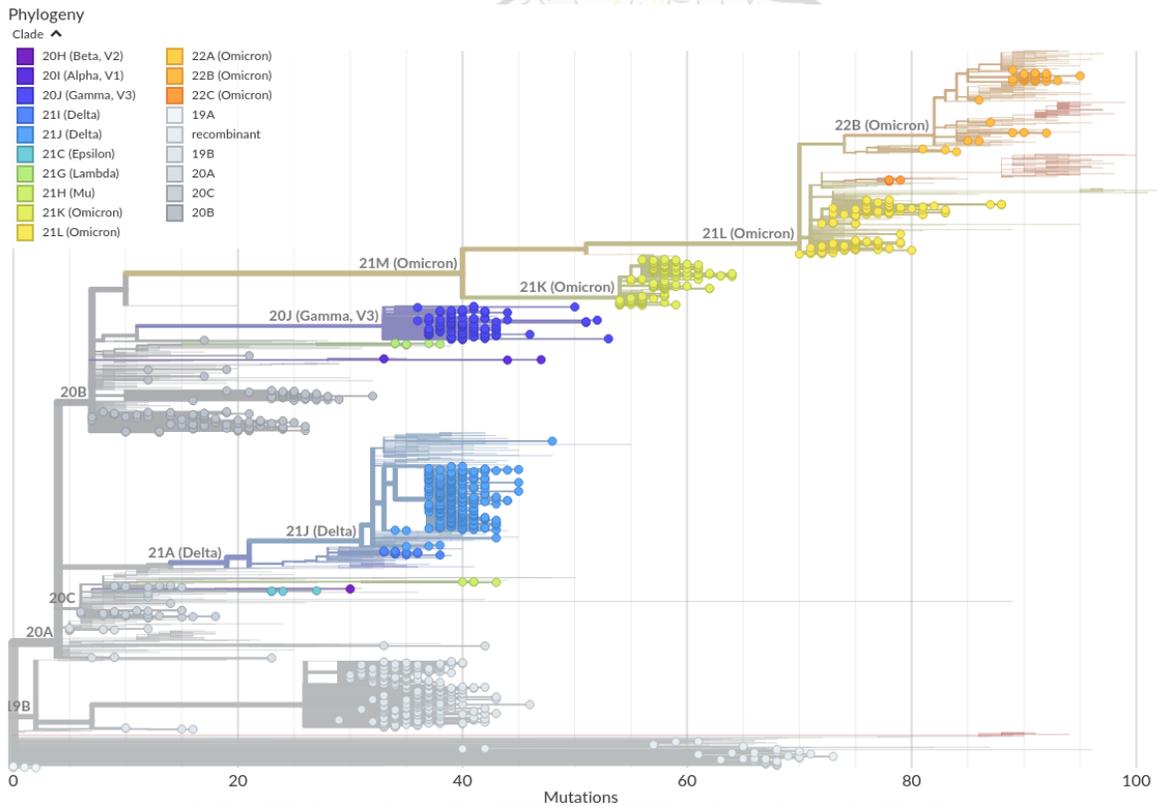
El análisis molecular de las secuencias fue realizado mediante las plataformas de acceso libre online Nextstrain y pangolin.

**Control de calidad de la secuenciación:** El control de calidad se realizó durante la secuenciación de manera automática por el software MInknow. EL software filtró y conservó todas aquellas secuencias que contenían un Qscore de phred  $\geq 8$ . El Qscore de phred es una medida de calidad de la secuenciación que dicta la precisión de cada base secuenciada. un qscore de 8 indicará una precisión por debajo del 90% de que la base sea correctamente nombrada.

## VIII. RESULTADOS

**Objetivo 1:** Determinar características evolutivas, genéticas y moleculares de los linajes del SARS CoV 2 mediante secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

**Figura 1:** Árbol filogenético de las variantes del SARS CoV 2 circulantes en Nicaragua, entre Marzo 2020 y Septiembre 2022.

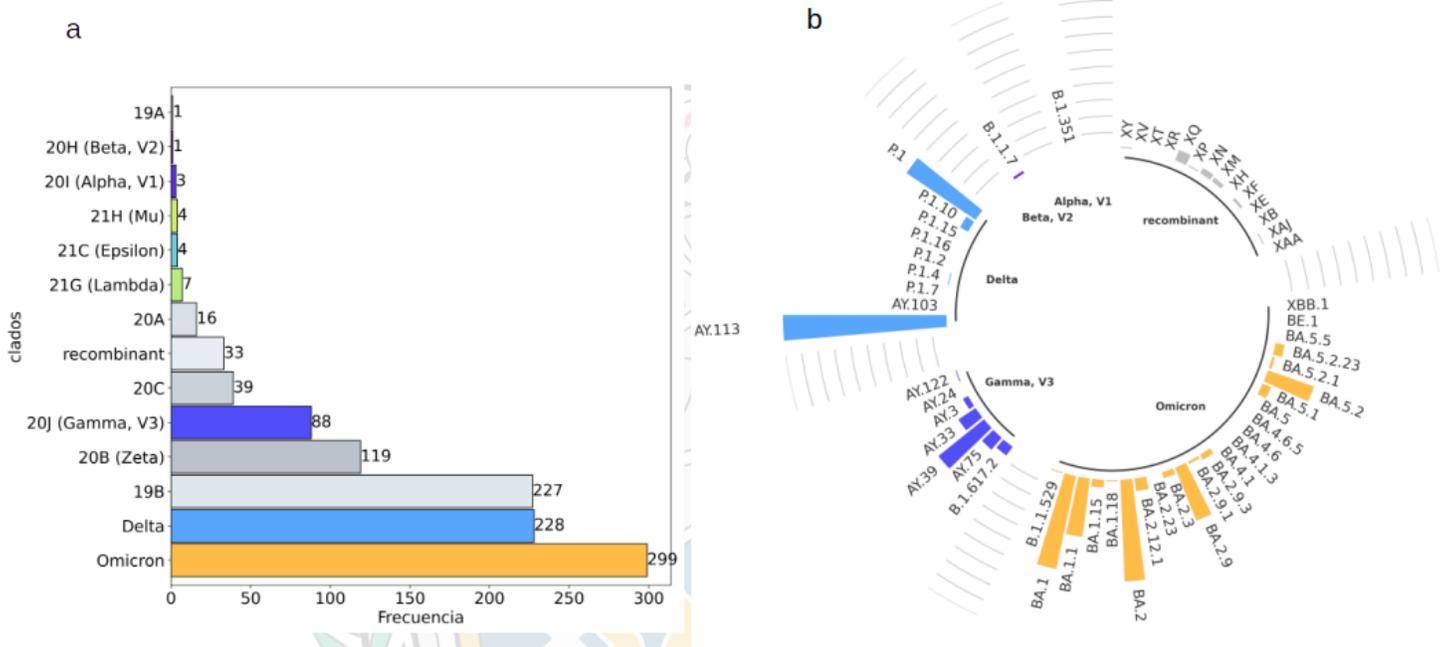


Fuente: Secuencias nucleotídicas del SARS CoV 2

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis filogenético realizado con la herramienta Nextclade de la plataforma web Nextstrain. El árbol filogenético muestra una diversidad de variantes del SARS CoV 2. Las variantes identificadas fueron: 20H (Beta V2), 20(Alpha, V1), 20J (Gamma, V3), 21I(Delta), 21J(Delta), 21C (Epsilon), 21G (Lambda), 21H (Mu), 21K (Omicron), 21L (Omicron), 22A (Omicron), 22B (Omicron), 22C (Omicron), 19A,

variantes recombinantes, 20A, 20C y 20B. Se puede observar que las variantes que más se alejan de la raíz poseen un mayor número de mutaciones.

**Figura 2:** Frecuencia de las variantes identificadas



a: Frecuencia de las variantes identificadas según la clasificación Nexstrain

b: Frecuencia de las variantes identificadas según la clasificación Pangolin

En la figura 2, el segmento “a” muestra la frecuencia de las variantes encontradas en el análisis evolutivo, en orden descendente, Omicron, Delta, 19B, 20B(Zeta) y 20J (Gamma, V3) son las variantes identificadas con mayor frecuencia en las secuencias.

Además, se logró determinar cada variante con la nomenclatura Pangolín (ver segmento “b” de la figura 2). La variante Omicrón se destaca por presentar una gran diversidad de sublinajes, lo que la convierte en la variante con mayor diversidad de acuerdo a la nomenclatura pangolín. Dentro de Omicron, el sublinaje más frecuente identificado fue BA.1 y sus consecuentes diversificaciones (BA.1.1, BA.1.15, BA.1.18), seguido se encontraron las subvariedades de BA.2 y de BA.5, en menos frecuencia se identificaron las variedades de BA.4 además de XBB.1 y BE.

Seguido se encuentra la variante Delta, que si bien presenta 9 sublinajes los más predominantes son el sublinaje AY.113 y el sublinaje P.1.

La variante Gamma V3 presentó algunos sublinajes, pero en menor frecuencia que los sublinajes de Omicron y Delta. Los sublinajes de Gamma V3 identificados fueron AY.3, AY.75 y B.1.617.2.

Las variantes recombinantes estuvieron presentes, pero no fueron tan frecuentes. Entre ellas, la más frecuente fue la variante XQ con menos de 10 casos identificados.

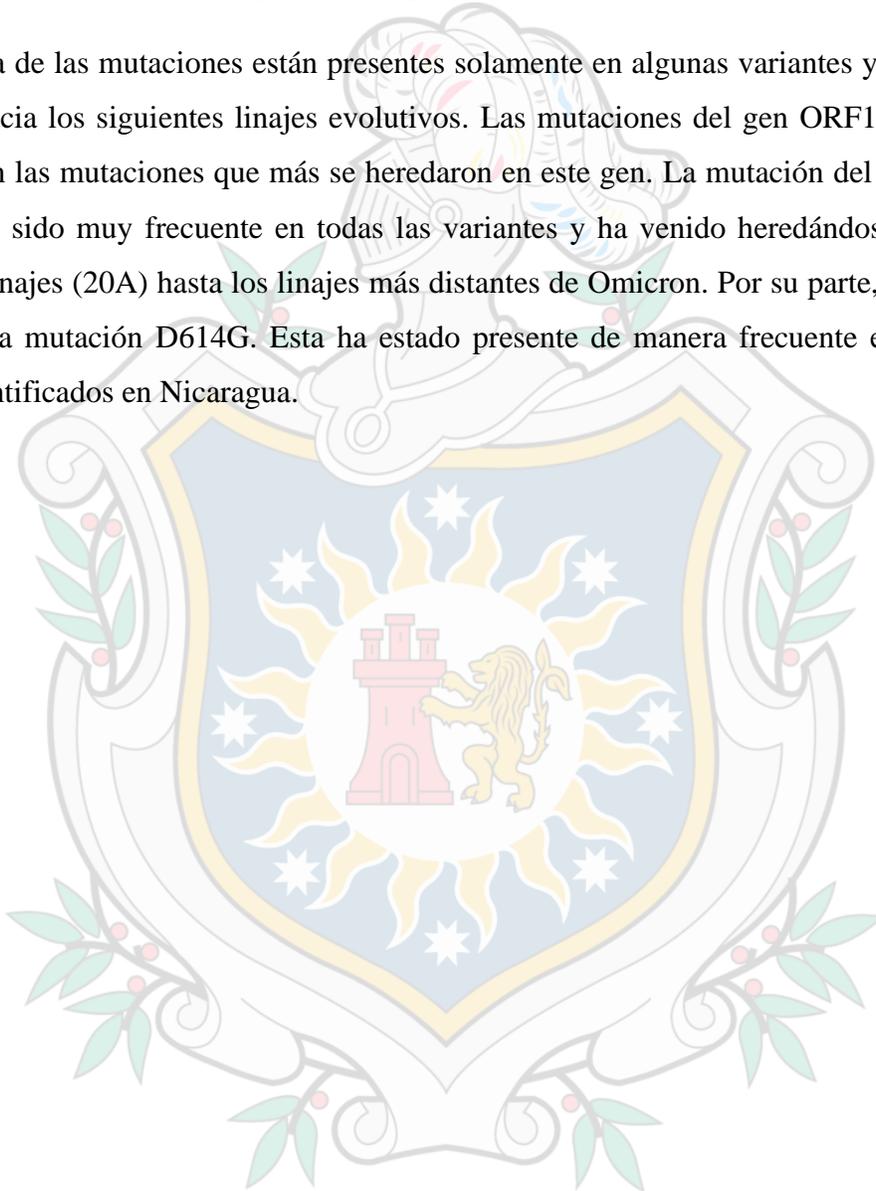
No se encontró diversificación de las variantes Alpha y Beta.





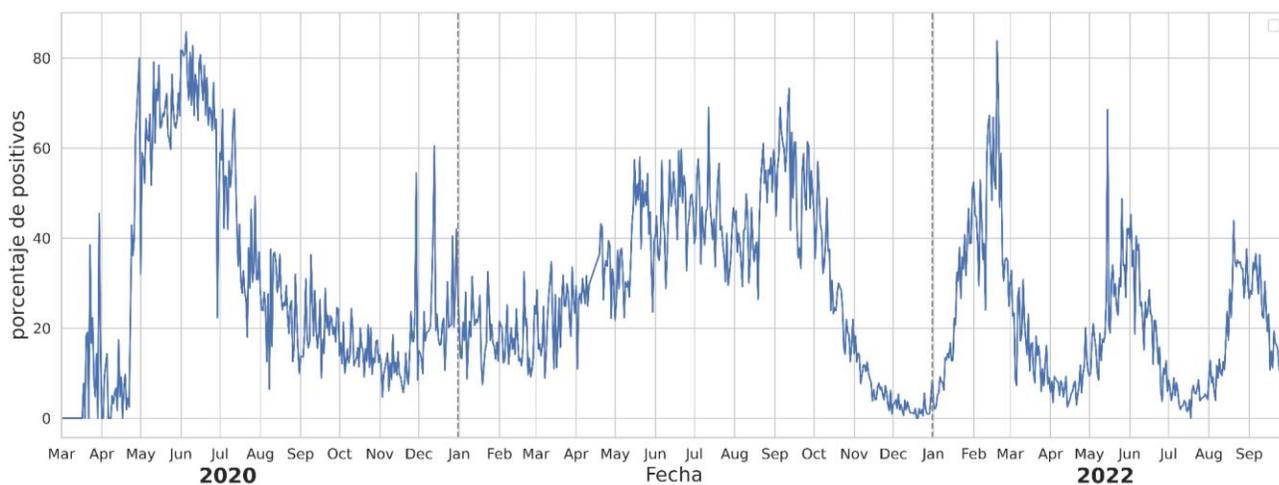
Se determinaron las mutaciones en el genoma del SARS CoV 2 y se determinó la frecuencia de las mutaciones más frecuentes y se clasificaron en tres grupos. Un primer grupo que contiene las 50 mutaciones más frecuentes del gen ORF1a, un segundo grupo que contiene las 50 mutaciones más frecuentes del gen ORF1b y un tercer grupo que contiene las 50 mutaciones más frecuentes del genS (ver figura 3)

La mayoría de las mutaciones están presentes solamente en algunas variantes y no todas se heredan hacia los siguientes linajes evolutivos. Las mutaciones del gen ORF1a, T2967I y T3255I son las mutaciones que más se heredaron en este gen. La mutación del gen ORF1b P1342S ha sido muy frecuente en todas las variantes y ha venido heredándose desde los primeros linajes (20A) hasta los linajes más distantes de Omicron. Por su parte, en el gen S sobresale la mutación D614G. Esta ha estado presente de manera frecuente en todos los linajes identificados en Nicaragua.



**Objetivo 2:** Describir el comportamiento de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua durante el tiempo

**Figura 4:** Curva de tendencia del porcentaje de casos positivos del SARS CoV 2 por RT-PCR en Nicaragua en el período Marzo 2020 - Septiembre 2022 .



Fuente: Base de datos del porcentaje de positividad del SARS CoV 2 del CNDR

La gráfica número 4 muestra la tendencia de los casos positivos representados en porcentaje en Nicaragua a partir del mes de marzo del 2020 hasta septiembre del 2022. En el 2020 hubo incremento del porcentaje de los casos desde finales de marzo. Desde esa fecha hasta mediados de abril hubo un aumento del porcentaje de positividad aunque por un periodo corto de tiempo, esta positividad rondó el 40%. Posteriormente, finalizando el mes de abril hubo un incremento abrupto del porcentaje de positividad que llegó hasta el 80%. Este pico se mantuvo desde mayo e inició a descender en agosto del 2020. Entre septiembre y octubre se observa un pequeño incremento en el porcentaje de la positividad que desciende paulatinamente hasta alcanzar el mes de diciembre.

Es en Diciembre del 2020 que otro nuevo pico empieza a emerger y desciende durante el mes de Febrero del 2021, sin embargo, a partir del mes de marzo inicia el ascenso de un nuevo pico que alcanza su punto más alto durante los meses de Junio, Julio e inicia a descender al mes de agosto. Desde mediados de agosto inicia un nuevo incremento del porcentaje de casos positivos que alcanza su pico durante el mes de Septiembre e inicia a disminuir de manera

considerable a partir del mes de octubre, alcanzando niveles de porcentaje de positividad más bajos en el mes de Diciembre.

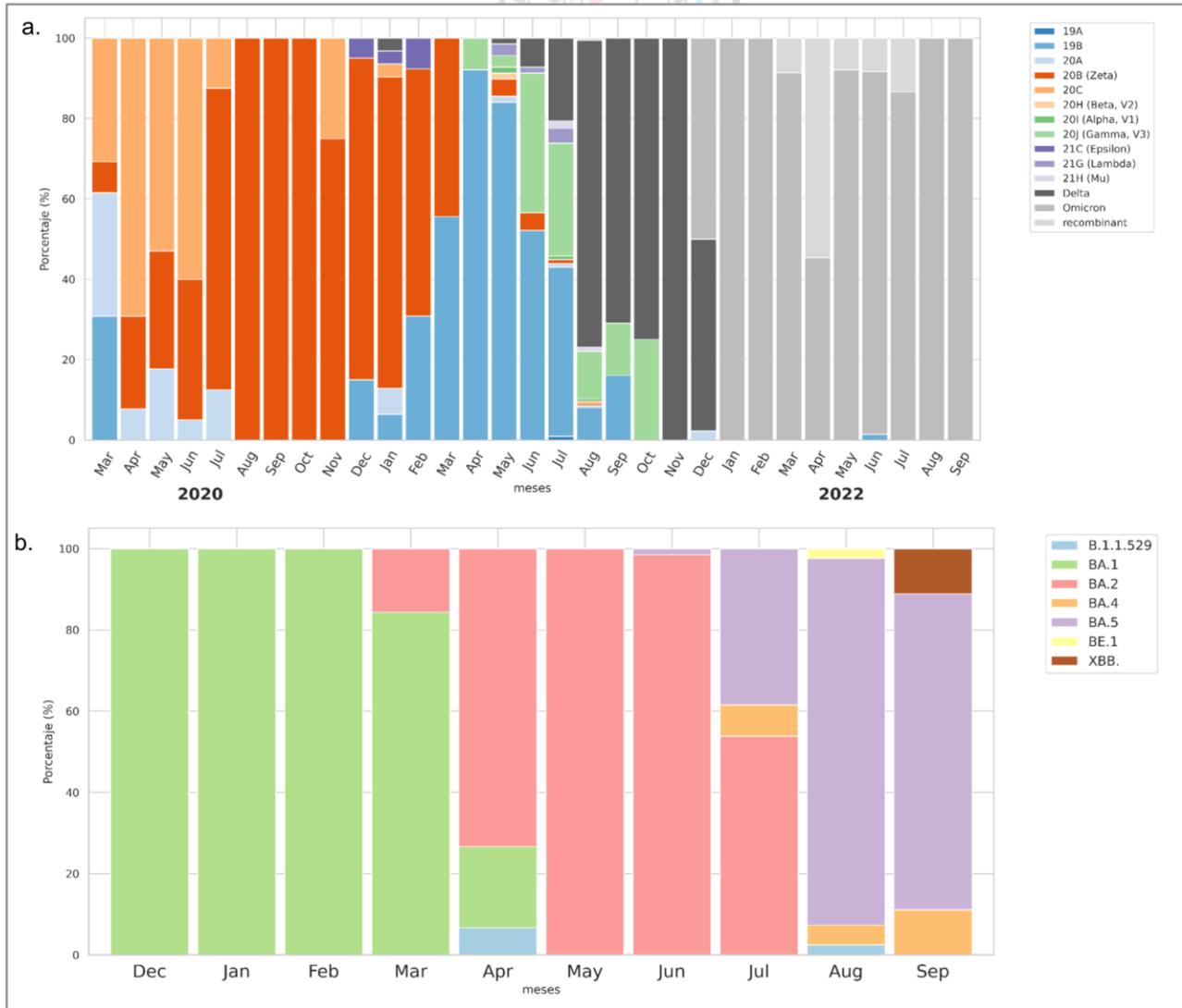
En el 2022, se observa que empiezan a aumentar el porcentaje de casos positivos a partir del mes de Enero. Este pico alcanza el punto más alto durante el mes de Febrero e inicia a descender rápidamente al inicio del mes de marzo. En Abril de este mismo año se observa un nuevo aumento del porcentaje de los casos positivos que alcanza el punto más alto a finales de Junio e inicia descender a partir del inicio del mes de julio. Nuevamente se observa un incremento del porcentaje de casos positivos a partir del mes de agosto y se alcanza el punto más alto a finales de este mismo mes. En este último pico se observa un descenso durante el mes de Septiembre.



**Figura 5:** Distribución temporal de las variantes del SARS CoV 2 en el tiempo.

a.: Distribución de las variantes del SARS CoV 2 desde marzo del 2020 hasta septiembre del 2022.

b.: Distribución de los sublinajes de Omicrón (nomenclatura Pangolin) desde diciembre del 2021 hasta septiembre del 2022



Fuente: Base de datos de resultados de la secuenciación del SARS CoV 2

La figura 5 muestra en barras porcentuales la proporción de cada una de las variantes identificadas mediante secuenciación genómica en Nicaragua, durante el período comprendido entre marzo 2020 y septiembre 2022.

La sección “a” muestra la distribución de cada variante en el período mencionado anteriormente. En el mes de marzo se observa la co circulación de los clados 20B (Zeta), 19B, 20A y 20 C. En los siguientes 4 meses , de abril a julio, se observa la co circulación de los clados 20A, 20B (Zeta) y 20C hasta que el la variante 20B (Zeta) predomina durante los meses de Agosto del 2020 hasta febrero del 2021. En diciembre del 2020 se observa un incremento en la circulación de la variante 19B, que aumenta paulatinamente hasta posicionarse como la variante dominante en los meses de marzo a julio del 2021.

En los meses de junio a octubre del 2021 se observa un aumento de la variante gamma V3, pero no llega a convertirse en una variante dominante. En enero del 2021 se identificó la variante Delta, sin embargo desaparece y se observa nuevamente en Mayo del 2021. Se observa un incremento de Delta durante junio y julio y en Agosto se convierte en la variante dominante, manteniendo este dominio hasta el mes de noviembre . En diciembre del 2021 hubo circulación de delta, pero también se observa la introducción de la variante Omicron, que predomina sobre Delta.

En Enero del 2022 se observa un predominio total de la variante Omicron, este predominio se mantiene hasta el mes de Septiembre, a excepción del mes de Abril en el que predominó alguna (o algunas) variantes recombinantes. Durante los meses de marzo a julio de 2022 se aprecia la co circulación de variantes recombinantes junto a Omicrón.

**Tabla 1:** Fecha y lugar de la identificación de las variantes del SARS CoV 2 a Nicaragua

| <b>Variante</b> | <b>Departamento</b> | <b>Fecha de Identificación</b> |
|-----------------|---------------------|--------------------------------|
| 20B (Zeta)      | Jinotega            | Marzo-2020                     |
| 19B             | Chontales           | Marzo-2020                     |
| 20A             | Managua             | Marzo-2020                     |
| 20C             | Estelí              | Marzo-2020                     |
| 21C (Epsilon)   | Estelí              | Diciembre-2020                 |
| Delta           | RAACS               | Enero-2021                     |
| 20J (Gamma, V3) | Estelí              | Abril-2021                     |
| 20I (Alpha, V1) | Estelí              | Mayo-2021                      |
| 20H (Beta, V2)  | Matagalpa           | Mayo-2021                      |
| 21G (Lambda)    | Managua             | Mayo-2021                      |
| 19A             | Managua             | Julio-2021                     |
| 21H (Mu)        | Masaya              | 26-Julio-2021                  |
| recombinant     | Madriz              | Agosto-2021                    |

| Variante      | Departamento | Fecha de Identificación |
|---------------|--------------|-------------------------|
| 20B (Zeta)    | Jinotega     | Marzo-2020              |
| 19B           | Chontales    | Marzo-2020              |
| 20A           | Managua      | Marzo-2020              |
| 20C           | Estelí       | Marzo-2020              |
| 21C (Epsilon) | Estelí       | Diciembre-2020          |
| Omicron       | Granada      | Diciembre-2021          |

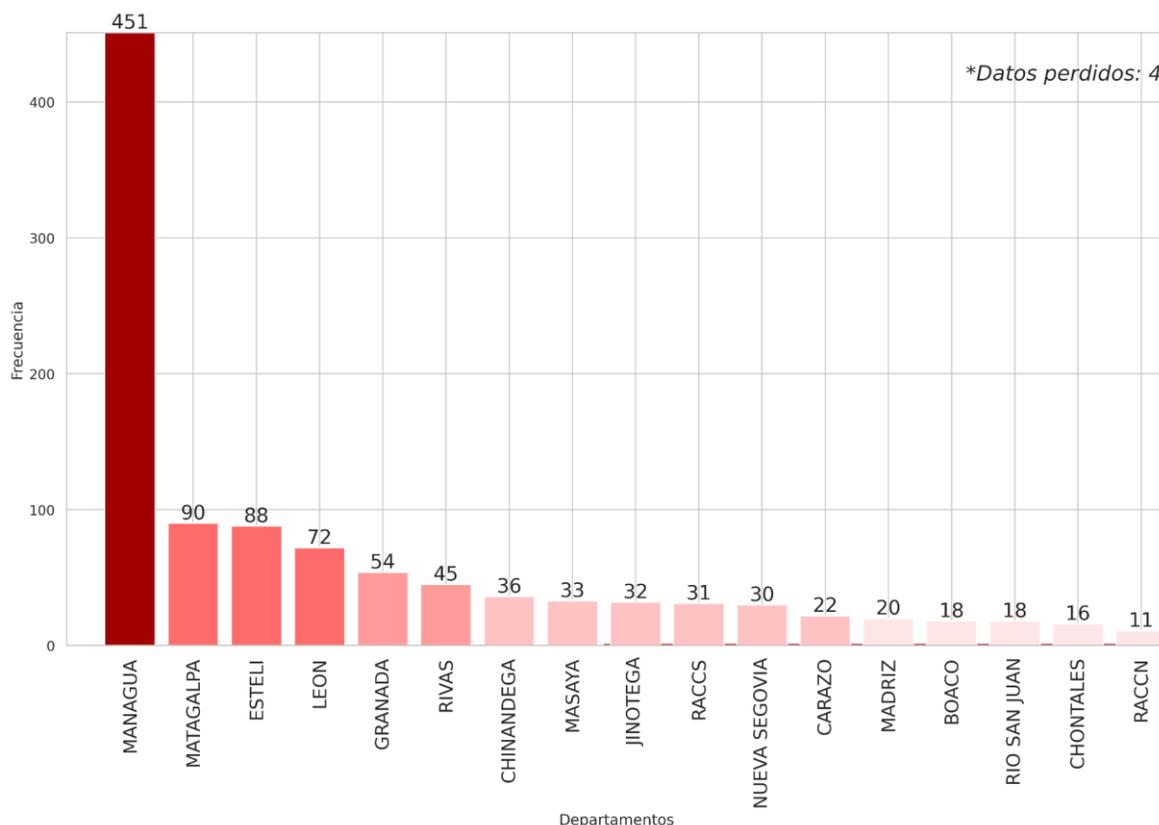
Fuente: Base de datos de secuenciación genómica

En la tabla proporcionada se muestran las diferentes variantes del virus SARS-CoV-2 que han aparecido en las secuencias analizadas en Nicaragua desde marzo de 2020 hasta Septiembre 2022, junto con su fecha de aparición, frecuencia y departamento donde se detectaron. En total, se registraron catorce variantes diferentes, incluyendo la variante Delta, la variante Omicron y varias variantes de preocupación.

Los datos mostrados en esta investigación muestran que el porcentaje de positividad puede ser una herramienta útil para identificar brotes de enfermedades infecciosas, como la COVID-19 al no tener datos para calcular las tasas de incidencia. Si el porcentaje de positividad aumenta, puede ser una señal de que está ocurriendo un brote de la enfermedad en la población. Por lo tanto, el monitoreo regular del porcentaje de positividad de las pruebas puede ayudar a los epidemiólogos y profesionales de la salud pública a tomar medidas preventivas y controlar la propagación de la enfermedad.

**Objetivo 3:** Identificar la distribución espacial del SARS CoV 2 y sus linajes evolutivos.

**Figura 6:** Frecuencia de las secuencias del SARS CoV identificadas en los departamentos de Nicaragua entre marzo del 2020 y septiembre del 2022.



Fuente: Base de datos de secuenciación genómica

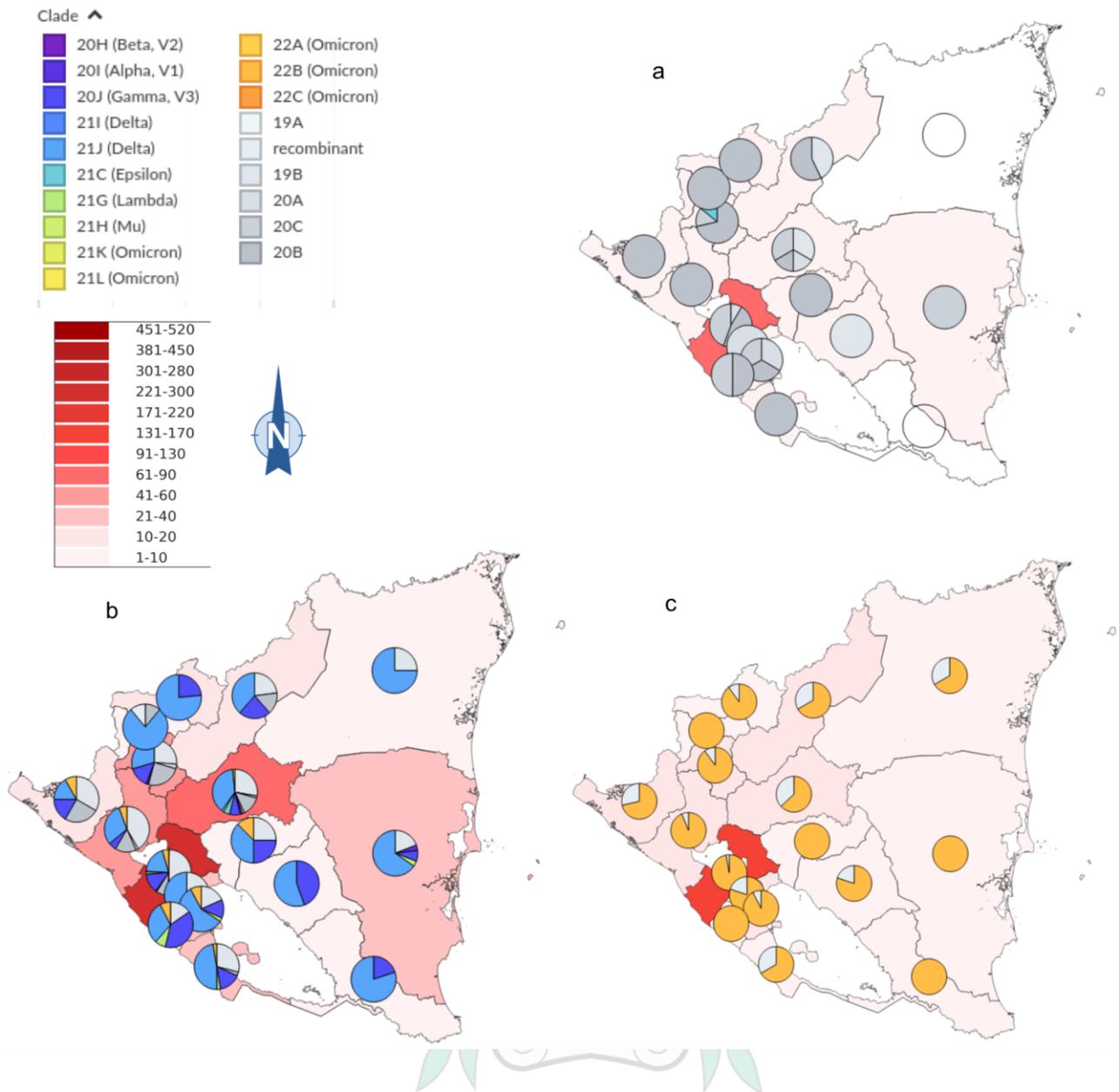
De manera general, las secuencias obtenidas proceden de todos los departamentos de Nicaragua, la mayoría de las variantes son del departamento de Managua (n=451), seguido de los departamentos de Matagalpa, Estelí y León (n = 90, 88 y 72 respectivamente). Por el contrario, la Región Autónoma de las Costa Caribe Norte es la región que menos secuencias posee (n= 11) Junto a Chontales (n= 16), Río San Juan (n =18), Boaco (n = 18) Madriz (n = 20) y Carazo (n= 22). La manera en que se distribuyen las muestras en cada departamento fue similar durante los tres años de pandemia que se analizan en esta investigación

**Figura 7:** Distribución de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua entre el Marzo del 2020 y Septiembre 2022.

**a** : Distribución de las variantes en los departamentos de Nicaragua 2020.

**b** : Distribución de las variantes en los departamentos de Nicaragua 2021.

**c** : Distribución de las variantes en los departamentos de Nicaragua 2022.



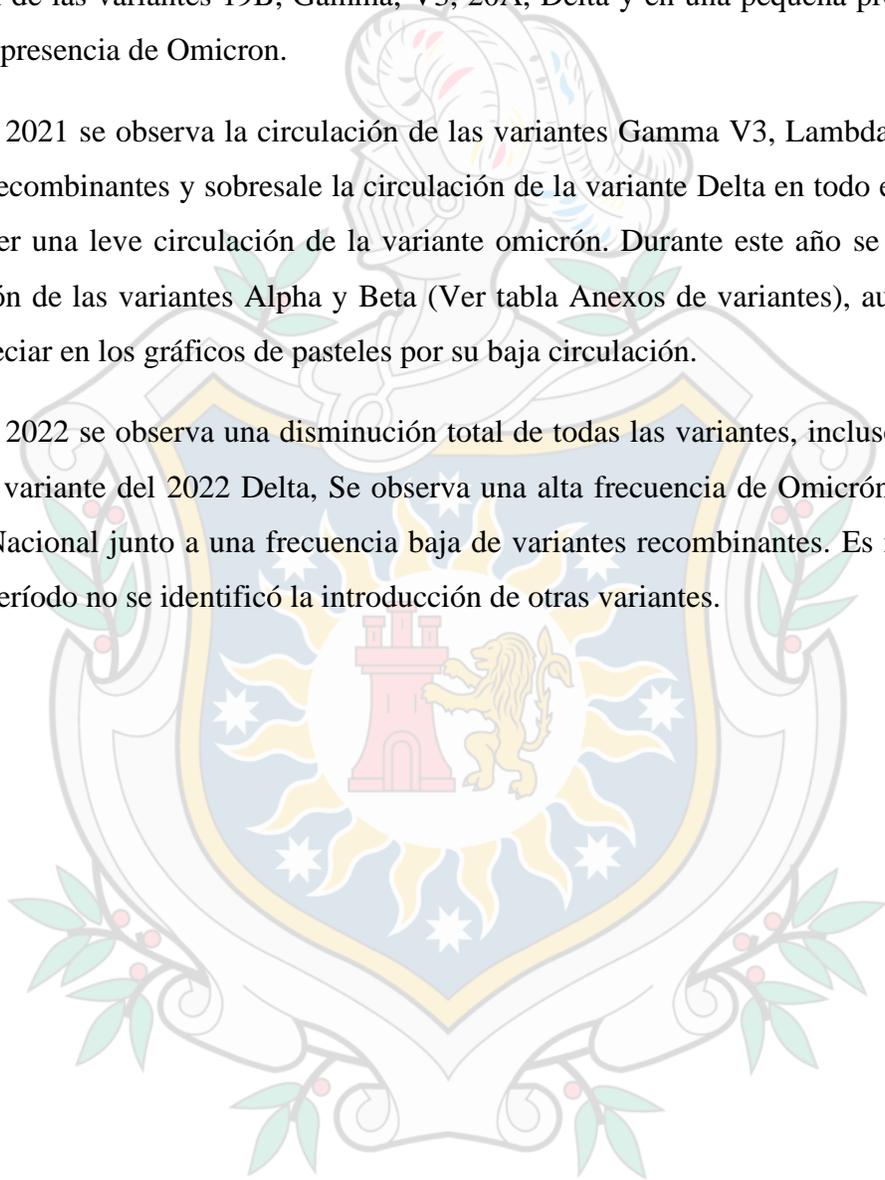
La figura 7 muestra la distribución de las variantes del SARS CoV 2 en Nicaragua. Se muestra la frecuencia de las variantes identificadas en los departamentos de Nicaragua entre

marzo 2020 y Septiembre 2022 (b), además se muestra la distribución en el país de las variantes durante los años 2020 (a), 2021 (c) y 2022 (c)

Las variantes circularon en todo el país. Durante el 2020 se observó la circulación de las variantes 19B, 20B (Zeta), 20A, 20C, 21C (Epsilon), durante el 2021 se observó la circulación de las variantes 19B, Gamma, V3, 20A, Delta y en una pequeña proporción se observó la presencia de Omicron.

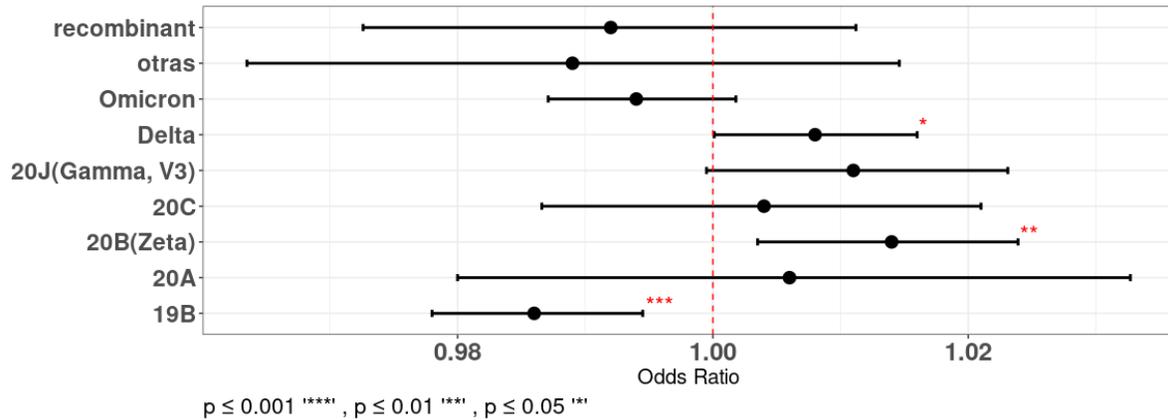
Durante el 2021 se observa la circulación de las variantes Gamma V3, Lambda, 19A, Mu, variantes recombinantes y sobresale la circulación de la variante Delta en todo el territorio. Se logra ver una leve circulación de la variante omicrón. Durante este año se presentó la introducción de las variantes Alpha y Beta (Ver tabla Anexos de variantes), aunque no se logran apreciar en los gráficos de pasteles por su baja circulación.

Durante el 2022 se observa una disminución total de todas las variantes, incluso de la más prevalente variante del 2022 Delta, Se observa una alta frecuencia de Omicrón en todo el territorio Nacional junto a una frecuencia baja de variantes recombinantes. Es notable que para este período no se identificó la introducción de otras variantes.



**Objetivo 4:** Estimar asociaciones entre las variantes del SARS CoV 2 y las características demográficas de las personas a quienes se les tomó una muestra para secuenciación.

**Tabla 2:** Regresión logística univariada que muestra las asociaciones entre las variantes y la edad (edad basada en un incremento de 5 años)



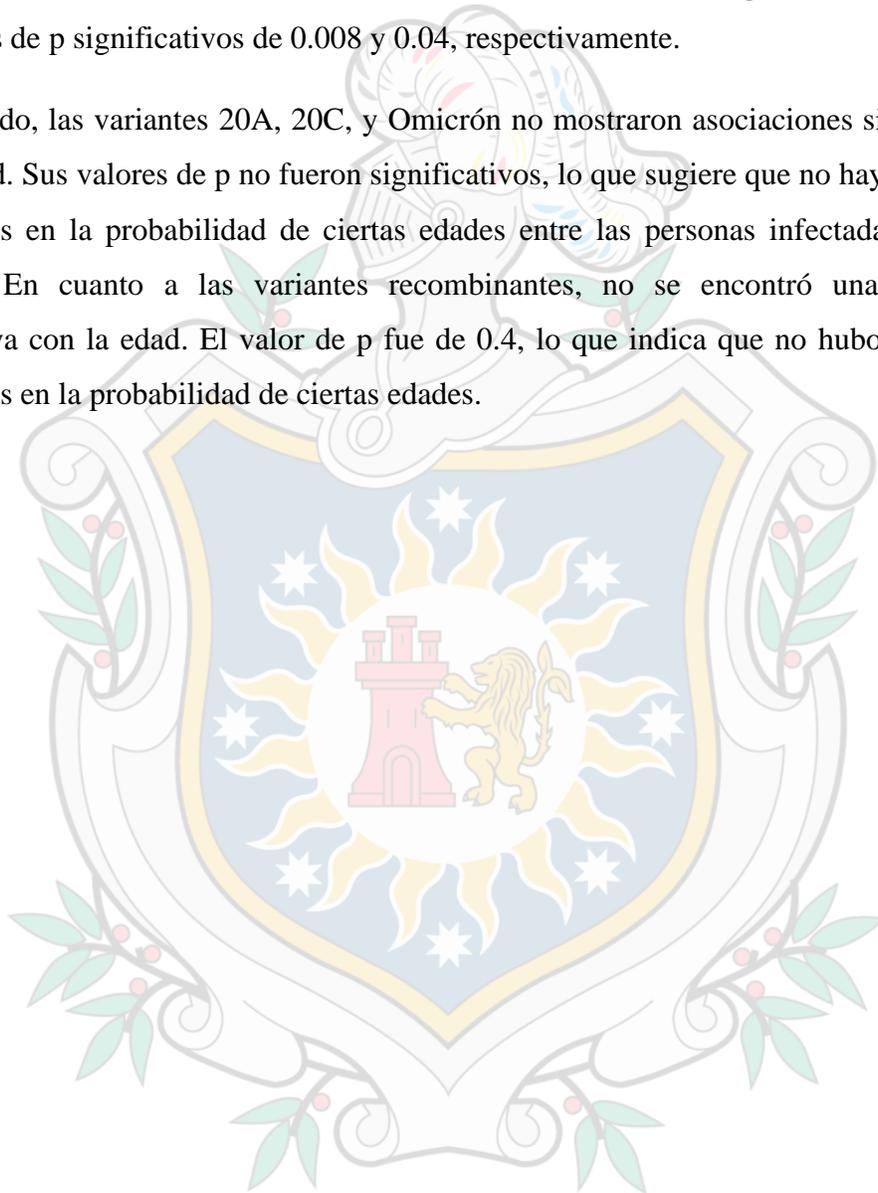
Se analizaron datos de hospitalización de 735 pacientes que tenían registros referente a la hospitalización. 31.4% de las muestras secuenciadas provienen de pacientes hospitalizados, mientras que un 37.32% de las muestras no provienen de pacientes hospitalizados. En el 31.24% del total de las muestras analizadas no se logró conseguir datos de hospitalización (ver anexo 3)

En una búsqueda por entender el comportamiento de las variantes con respecto a la edad, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las edades entre los diferentes grupos de pacientes que se infectaron con distintas variantes (ver Anexo 4), por lo que posteriormente se buscaron asociaciones entre diferentes variantes del SARS-CoV-2 y la edad de los individuos. Utilizando un enfoque de regresión logística univariada, se analizaron los datos de edad y variante para determinar si las variantes del virus están relacionadas con cambios significativos en la probabilidad de ciertas edades (tabla 2)

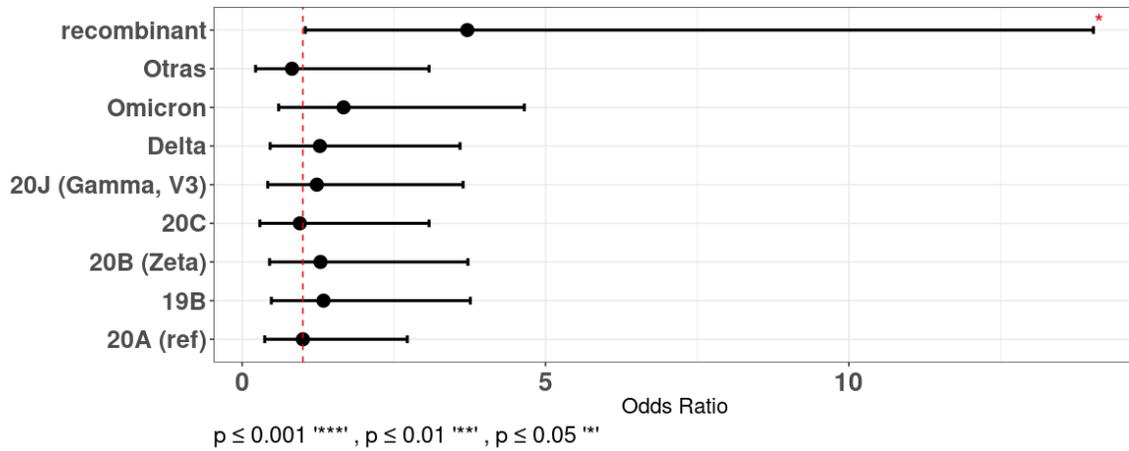
La variante 19B mostró una asociación estadísticamente significativa con sentido negativo con la edad, con un Odds Ratio (OR) de 0.93 (Intervalo de Confianza del 95%: 0.89 - 0.935). Esto indica que a medida que la edad aumenta en 5 años el chance de ser infectado con la variante 19B disminuye, este hallazgo fue altamente significativo, con un valor p menor que 0.001.

Las variantes 20B y Delta también mostraron asociaciones significativas con la edad. La variante 20B tuvo un OR de 1.07 (Intervalo de Confianza del 95%: 1.01 - 1.12), lo que indica un aumento en el chance de ser infectado por esta variante cuando la edad aumenta en 5 años. La variante Delta también mostró significancia estadística en el aumento de la edad, con un OR de 1.04 (Intervalo de Confianza del 95%: 1.02 - 1.08). Estos hallazgos fueron respaldados por valores de p significativos de 0.008 y 0.04, respectivamente.

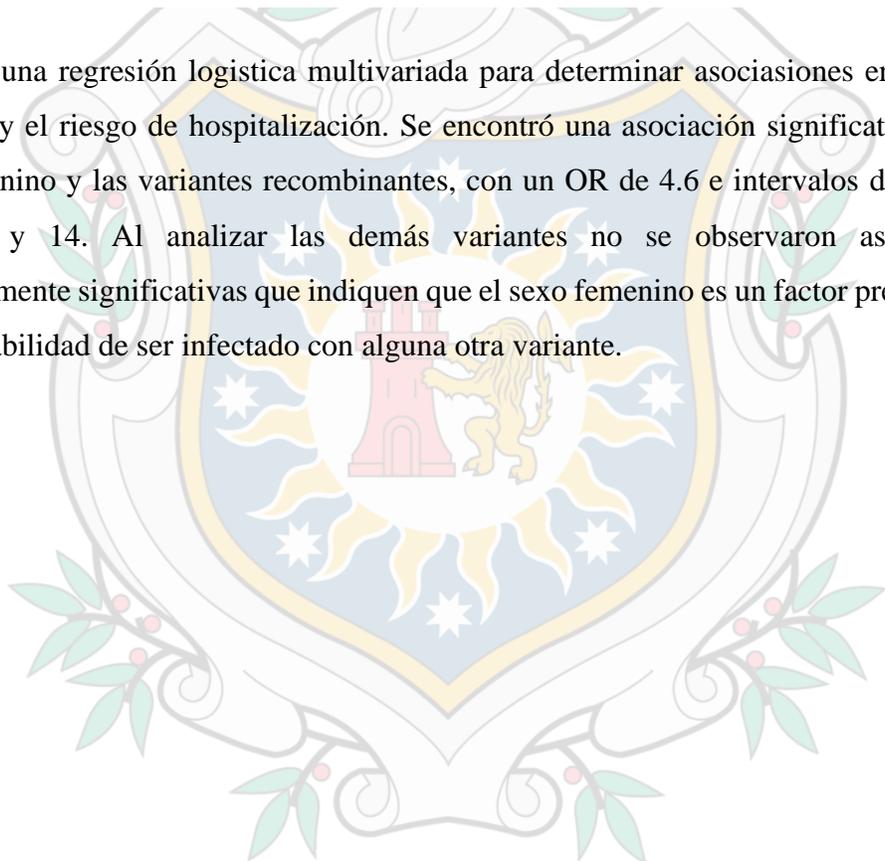
Por otro lado, las variantes 20A, 20C, y Omicrón no mostraron asociaciones significativas con la edad. Sus valores de p no fueron significativos, lo que sugiere que no hay diferencias sustanciales en la probabilidad de ciertas edades entre las personas infectadas con estas variantes. En cuanto a las variantes recombinantes, no se encontró una asociación significativa con la edad. El valor de p fue de 0.4, lo que indica que no hubo diferencias sustanciales en la probabilidad de ciertas edades.



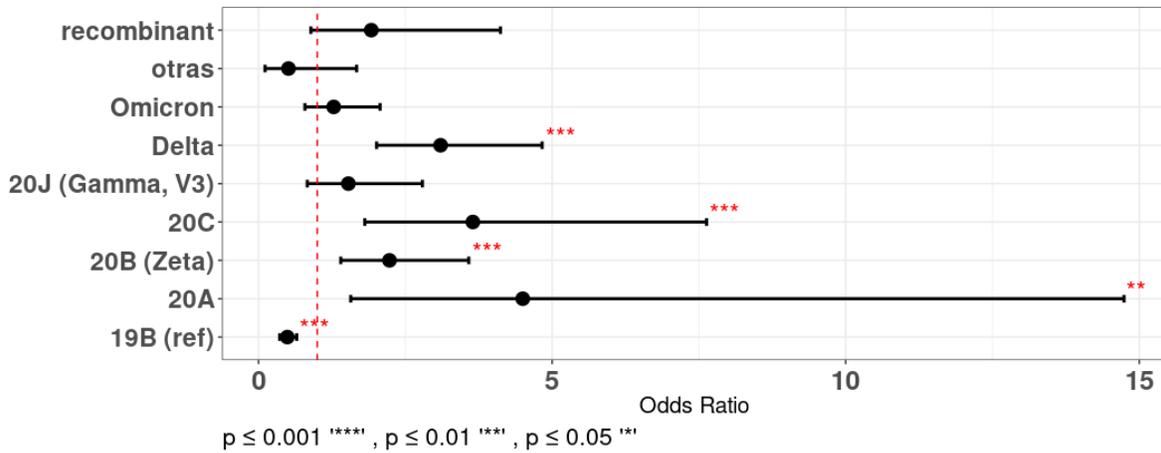
**Figura 8:** Asociaciones entre el sexo femenino y el riesgo de hospitalización por COVID-19.



Se realizó una regresión logística multivariada para determinar asociaciones entre el sexo Femenino y el riesgo de hospitalización. Se encontró una asociación significativa entre el sexo Femenino y las variantes recombinantes, con un OR de 4.6 e intervalos de confianza entre 1.1 y 14. Al analizar las demás variantes no se observaron asociaciones estadísticamente significativas que indiquen que el sexo femenino es un factor predisponente en la probabilidad de ser infectado con alguna otra variante.



**Figura 9:** Asociaciones entre la Hospitalización y las variantes identificadas en pacientes con COVID 19



Se utilizó un modelo de regresión logística multivariada para investigar la asociación entre diferentes variantes del SARS-CoV-2 y la hospitalización. Se observó que varias variantes: "20A", "20B (Zeta)", "20C" y "Delta", se asociaron significativamente con un mayor riesgo de hospitalización, con ORs que oscilan entre 2.23 y 3.65. Estos hallazgos indican que las personas infectadas con estas variantes específicas del SARS-CoV-2 tuvieron una mayor probabilidad de requerir hospitalización en comparación con las que fueron infectadas con la variante 19B.

Por otro lado, algunos resultados no mostraron significancia estadística, las variantes "20J (Gamma, V3)", "Omicron" y las variantes recombinantes no mostraron una asociación estadísticamente significativa con la hospitalización.

## **IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

El SARS CoV 2 se diversificó alrededor del mundo, las variantes no se han limitado a una región específica y todas estas estuvieron presentes en Nicaragua. En el primero de los casos, la variante del clado 19B no fue clasificada como una variante de preocupación, sin embargo es una de las variantes que fue identificada con mayor frecuencia en los genomas analizados en Nicaragua. Esta variante marcó el primer indicio de diversificación del SARS CoV 2, y circuló durante los primeros meses en el Mundo junto al primer SARS CoV 2, 19A.

Las variantes de preocupación (Variants of concerns - VOC), por su parte, tienen la capacidad de cambiar el panorama epidemiológico de los países, y se han presentado con una frecuencia mayor que las demás variantes. De las VOCs que han circulado en Nicaragua, las que se han identificado con mayor frecuencia son Omicron, Delta, gamma, de manera similar que en otras zonas del mundo. Estas variantes, en particular Delta y Omicrón, han demostrado ser altamente transmisibles y han sido responsable de aumentos significativos en los casos de COVID-19 en todo el mundo, por lo que desde un punto de vista epidemiológico, la alta frecuencia de las variantes Delta y Omicron en Nicaragua no es inesperada.

Sin embargo, las variantes de preocupación Alpha y Beta fueron identificadas con muy baja frecuencia, esto contrasta con la situación de otros países donde estas variantes se identificaron con gran frecuencia, existen varios factores que pudieron influir en este comportamiento. Es probable que haya habido una baja introducción de estas variantes al país durante el pico de transmisión del resto de países en donde circulaban. Aunque Nicaragua no cerró sus fronteras, las medidas de control fronterizo de los demás países, la restricción de viajes internacionales y la cuarentena obligatoria para los viajeros, pueden haber limitado la entrada de estas variantes al país. Además de esto, es probable que haya habido una especie de competencia con otras variantes que ya circulaban en el país durante la introducción de Alpha y Beta y que a la par de este escenario la población haya sido inmunizada de manera natural por las variantes circulantes anteriormente, bloqueando la diseminación de estas variantes.

El análisis de las frecuencias de los linajes Pangolín muestra la presencia de múltiples sublinajes. La presencia de múltiples sublinajes de las variantes Omicron y Delta, como se

ha observado en el análisis, es un fenómeno que ha sido informado en otros lugares del mundo. Esto puede deberse a la alta tasa de mutaciones en la proteína spike de Omicron, lo que le permite evadir la inmunidad adquirida por infección previa o por vacunación. Esto resulta en una selección positiva de variantes con mutaciones específicas que les permiten evadir la inmunidad y, por lo tanto, se pueden propagar más fácilmente, dando lugar a que la replicación del virus aumente y por ende también aumente la tasa de mutaciones que da lugar al surgimiento de estas nuevas variantes

El análisis de las mutaciones identificadas en el genoma del SARS-CoV-2 revela una diversidad genética significativa en la población de virus circulantes. Las mutaciones más frecuentes se distribuyen en diferentes regiones del genoma, incluyendo las proteínas M, N, ORF1a, ORF1b, ORF3a, ORF8 y S entre diferentes variantes (ver Anexo 5)

Las mutaciones que aparecen y desaparecen entre las variantes del SARS CoV 2 forman parte de un proceso normal y están relacionadas al proceso cambiante del virus e indica que ha habido una constante evolución del virus durante el tiempo que ha circulado. Las mutaciones del gen ORF1a T2967I y T3255I, la mutación ORF1b:P1342S y la mutación D614G del gen S sobresalen porque han venido presentándose en todas las variantes. La razón biológica es que estas mutaciones le han dado una ventaja al SARS CoV 2 para su supervivencia. Algunos estudios indican que la mutación S:D614G le brinda al SARS CoV 2 una mayor capacidad infectante, además de un aumento en la tasa de infectividad (Korber et al., 2020; Zhang et al., 2020). Por esto mismo, aquellas variantes que presentan esta mutación sobreviven y son las que causan las nuevas olas de contagio. En las variantes identificadas en Nicaragua estas mutaciones son las que se presentan en mayor frecuencia de una variante a otra. Entre todas las variantes se observa que Omicrón es la que presenta la mayor diversidad genética, esto puede observarse en el alto número de mutaciones y también en la diversidad de sus sublinajes.

La proteína S tiene además un alto número y frecuencia de mutaciones con respecto a las mutaciones de las otras regiones, en las variantes Delta y Omicrón las mutaciones aumentaron en diversidad y frecuencia, esto indica que la variante Delta y posteriormente Omicron son muy diferentes al primer SARS CoV 2 identificado en el 2019. La proteína de spike del SARS CoV 2 es codificada por el gen S, el alto número de mutaciones en este gen

es importante debido a que esta proteína es la encargada de la introducción del virus a las células, y además, las vacunas están dirigidas a reconocer la proteína S, mientras más mutaciones posee la proteína S hay una mayor probabilidad de que haya evasión a la respuesta inmune y una mayor capacidad de infectividad.

Las mutaciones de la región S del genoma del SARS-CoV-2 son de gran relevancia debido a su asociación con cambios en la transmisibilidad y la interacción con el receptor ACEII. La proteína de Spike, codificada por el gen S es la proteína target de la mayoría de las vacunas. Las mutaciones de la región S que solo comparten Delta y Omicron son un indicio de que al paso del tiempo se dio origen a nuevos cambios en el ARN del SARS CoV 2 y que estos cambios brindaron una ventaja evolutiva al SARS CoV 2 pues las variantes que no contienen estas nuevas mutaciones desaparecieron. Las mutaciones en esta región son muy importantes pues pueden conferir mayor o menor tasa de infectividad.

En esta investigación también se identificó una frecuencia predominante de mutaciones en los genes de marco de lectura abierto ORF (ver Anexo 5). Previamente se ha documentado que las mutaciones en estos genes pueden modificar el comportamiento del SARS CoV 2 pues están involucrados en el ensamblaje de proteínas no accesorias que pueden aportar a que el virus pueda evadir la respuesta inmune y aumentar su tasa de infectividad (Prüß, 2022).

El análisis del porcentaje de positividad indica que durante el periodo de marzo a julio del 2020, hubo una alta proporción de casos positivos de COVID-19, con cerca del 80% de las muestras siendo positivas. Hubo un aumento durante Marzo - Abril y después una explosión en el porcentaje de casos positivos, esta situación marcó la primera gran ola de la pandemia. La población en este período no tenía inmunidad previa y el SARS-CoV-2, al ser un nuevo patógeno, no había circulado antes en la población humana, por lo que la mayoría de las personas no tenían inmunidad previa contra él. Esto hizo que la propagación del virus haya sido más fácil y rápida, y que la tasa de infección aumente significativamente en poco tiempo. Posteriormente se observan otros picos, con un porcentaje de positivas más pequeños o con un lapso de tiempo mucho más corto.

La inmunidad adquirida, junto a las campañas de vacunación pudo haber provocado un descenso significativo en Noviembre - Diciembre del 2021, el porcentaje de positividad más

bajo en toda la pandemia hasta esa fecha, sin embargo, continuó el surgimiento de nuevas olas en el 2022. Estos picos de positividad fueron más marcados y en periodos de tiempos más cortos.

El comportamiento del SARS CoV 2 en el porcentaje de positividad es muy característico. Desde la introducción se observan diferentes picos en la positividad del SARS CoV 2. Resulta muy llamativo que por cada año, se observan 3 picos en el porcentaje de positividad. Aunque se requieren realizar análisis adicionales, los datos sugieren que el SARS CoV 2 podría tener un comportamiento estacional con una tendencia a que haya un brote al final de un año y al inicio del siguiente, durante los meses mayo-abril y finalmente entre agosto y octubre.

La variante 20B (Zeta) fue la primera variante en ser identificada mediante secuenciación genómica en Nicaragua, detectada en el departamento de Jinotega en marzo de 2020. Desde entonces, se han registrado varias variantes, con la mayoría de ellas apareciendo en el departamento de Estelí.

Durante el mes de marzo se identificaron más de una variante en las muestras secuenciadas. La identificación casi simultánea de cuatro variantes diferentes de COVID-19 en diferentes ciudades de Nicaragua sugiere que es poco probable que la propagación del SARS CoV 2 y la COVID 19 en el país hayan sido provocadas por una única variante. Es posible que estas variantes hayan sido introducidas por diferentes vías y de forma independiente en diferentes partes del país. Sin embargo, es importante destacar que se necesitan más datos epidemiológicos y de secuenciación para determinar con certeza cómo estas variantes entraron en Nicaragua y se propagaron en el país.

A pesar de que Managua es una ciudad muy importante por su alta densidad poblacional, por albergar al aeropuerto internacional, por su dinámica social y comercial y a pesar de que posee la mayor cantidad de secuencias genómicas, las variantes fueron identificadas por primera vez en diferentes departamentos del país.

Al analizar los resultados en cuanto a la distribución temporal, se observa que en diferentes momentos en el tiempo hay una co-circulación de variantes a medida que éstas emergen y que al final de un período existe la dominancia de una sola variante. Esto se observó en

Nicaragua principalmente en el 2020, cuando circularon durante los primeros meses, donde co circularon los clados 20B (Zeta), 19B, 20A, 20C, pero hay una clara dominancia de 20B, posteriormente en el 2021 se observa la circulación de Delta, 20J (Gamma, V3), 20I (Alpha, V1), 20H (Beta, V2), 21G (Lambda), 19A y 21H (Mu), pero quienes prevalecen en dos momentos diferentes del 2021 son 19B y Delta. Esto sugiere que existe una especie de competencia entre las variantes, en la que finalmente gana una variante, que domina por un tiempo hasta ser reemplazada por otra nueva.

Desde un punto de vista biológico - evolutivo , la competencia es un proceso clave en la selección natural de las especies ( en este caso variantes) más aptas para sobrevivir y propagarse. En el caso del SARS-CoV-2, se han identificado varias variantes a medida que el virus ha continuado propagándose por Nicaragua. Algunas de estas variantes, como la variante Delta, se han propagado con mayor rapidez y eficacia que otras. La competencia entre las diferentes variantes se produce a nivel molecular, donde mutaciones específicas en el genoma del virus pueden proporcionar ventajas selectivas que les permiten propagarse más rápidamente. Esto es soportado por el análisis de las mutaciones (figura 3) que muestra que las variantes que más mutaciones acumulan en su genoma, en orden ascendente son Gamma V3, 19B, delta y Omicrón. Estas variantes son las que más han dominado en el transcurso de la pandemia en el país.

Además, al observar los cambios en la circulación de las variantes en el tiempo, se observa que cada nuevo pico en el porcentaje de casos positivos es ocasionado por una nueva variante. Durante el 2020, en el pico que va de Abril a finales de junio hubo un predominio de la variante de clado 20C, en el mes de Julio inició a dominar 20B (Zeta) y provoca un nuevo pico que va de agosto a septiembre, finalmente hay un nuevo aumento en el mes de Diciembre del 2020 a febrero del 2021 que coincido con la introducción del clado 19 B, posteriormente esta variante se posiciona como la variante dominante.

En el 2021 se da la introducción de la variante 20J Gamma V3, esta variante, a pesar de que no domina, su introducción coincide con el aumento del porcentaje de positividad del pico que se da de Abril a Julio. Delta empieza a dominar en el mes de Agosto y provoca otro aumento de la positividad. Al finalizar el 2021 Omicrón es introducido al país, domina sobre delta y durante el mes de Enero del 2022 provoca otro pico en el porcentaje de la positividad.

Hasta ese momento se observó que una introducción provocaba un aumento en el porcentaje de positividad, sin embargo, la variante Omicrón prevaleció hasta Septiembre del 2022 y durante este año se observan otros dos nuevos picos del porcentaje de positividad.

La caracterización de las variantes mediante la metodología pangolin muestra que la variante nombrada por la OMS como Omicrón se diversificó en otros sublinajes. El sublinaje que provocó el primer pico fue BA.1. Los datos sugieren que el segundo pico fue provocado por Omicrón BA.2 y el último pico que se observó coincide con la introducción de Omicrón BA.5. Si el SARS CoV 2 tuviera un comportamiento estacional, se podría esperar un nuevo aumento y una posible nueva introducción al mes de diciembre del 2022, sin embargo esto es solo una asunción.

Managua es el departamento que más secuencias aportó para el análisis de esta investigación. Existen múltiples razones que explican la alta frecuencia de secuencias procedentes de Managua, entre las que destaca que el Centro Nacional de Diagnóstico de Referencia, donde se lleva a cabo el diagnóstico y la secuenciación del SARS CoV 2, está ubicado en la ciudad de Managua, lo que facilita que los centros asistenciales tengan un fácil y rápido acceso al transporte de las muestras, además en Managua existe un número grande de Centros y Hospitales de Referencia Nacional. Es importante señalar que, además, solamente Managua posee más del 20 por ciento de la población Nicaragüense.

El número de muestras secuenciadas podría estar relacionada con la calidad de la muestra, y esta a su vez está relacionada con la distancia. Las muestras biológicas que son transportadas desde las zonas más lejanas al CNDR corren el riesgo de ser degradadas por las temperaturas, las condiciones del transporte y el tiempo que pasa desde la toma de muestra hasta ser procesadas. La frecuencia del número de secuencias analizadas por departamentos no necesariamente está ligada a la incidencia de los casos de COVID-19. Existe la probabilidad de que aspectos sociales, lingüísticos, culturales, así como la calidad de las muestras influyan en el número de frecuencias analizadas.

Las variantes se distribuyeron de manera similar en todo el territorio Nacional. Esto indica que una vez que las variantes fueron introducidas al país estas se diseminaron por todos los departamentos de Nicaragua.

Durante el 2020 hubo circulación de las variantes más parecidas al SARS CoV 2 Original en todos los departamentos. Durante el 2021 se introdujeron más variantes, convirtiéndose Delta en la variante más dominante de este año. Durante el 2020 y el 2021 hubo una distribución diversa de las variantes circulando en el país, sin embargo, en el 2022 se detuvo la introducción de nuevas variantes y Omicrón se convirtió en la variante dominante, y una vez dominando la circulación en el país, empezó a diversificarse.

El presente estudio utilizó datos de vigilancia nacional de COVID 19 para investigar el impacto de las variantes genéticas del SARS CoV 2 en el estado de los pacientes con COVID 19 analizando el sexo, la edad y el estado de la hospitalización. Es importante reconocer la influencia potencial del sesgo de muestreo de la vigilancia Nacional en la investigación. Durante el transcurso de la pandemia no se pudo controlar la manera en que el ministerio de Salud realizaba el muestreo. La manera que se realizó el muestreo pudo cambiar según cambiaba la situación epidemiológica del país, lo que puede introducir sesgos en la representación de la muestra en la presente investigación.

La secuenciación genómica permitió analizar el genoma completo del SARS CoV 2 en Nicaragua y relacionar el resultado del análisis genómico con características del paciente. La distribución de las variantes identificadas en este estudio parecen ser heterogéneas con respecto al número. Variantes como Omicron, Delta o 19B sobresalen en número con respecto a las demás. Esto puede ser atribuible al período en el que circularon las variantes. Diversos autores muestran que para el 2020 hubo una clase de competencia entre las variantes circulantes y el número total de casos era provocado por fracciones de distintas variantes en las que se encuentran las variantes 19A, 19B, 20A, 20B y 20C durante el 2020 y principios del 2021 en Países como Inglaterra, pero también países de la región como Costa Rica y Colombia (Castañeda et al., 2021; Mishra et al., 2021; Molina-Mora et al., 2021). Al igual que en esta investigación, Delta y Omicrón son las variantes que reportan mayor número de observaciones a nivel mundial según la plataforma GISAID. (GISAID, 2022).

La distribución del sexo es mayor en personas del sexo femenino que en el masculino, sin embargo no se encontró asociación entre el sexo y la probabilidad de ser infectado con variantes específicas, a excepción de las variantes recombinantes. Aunque se halla encontrado esta asociación, es importante destacar que las variantes recombinantes se han originado a lo

largo de la pandemia y durante todo este período han surgido y desaparecido muchas variantes recombinantes. No existe un patrón de aparición de estas variantes y tampoco un período específico en el que hayan circulado. Los estudios hasta la fecha han encontrado asociaciones entre el sexo y algunas variantes en condiciones donde algunas características demográficas, sociales o económicas modulan las características de los brotes. Para tener un panorama más claro deberían revisarse otras variables como el período de circulación, la localidad, la ocupación, entre otros factores que pueden estar modulando este comportamiento.

Es probable que en Nicaragua las mujeres sean el grupo mayor diagnosticado, pero no necesariamente el grupo con más probabilidades de infección. Este fenómeno ha sido observado y reportado también en otras poblaciones (Kharroubi & Diab-El-Harake, 2022). Esta distribución podría estar influenciada por factores como la detección y el acceso a los servicios de atención médica y los aspectos culturales y no necesariamente al hecho de que las mujeres son más susceptibles.

En términos de la hospitalización de los casos reportados, aproximadamente el 31.4% de los pacientes requirieron ser hospitalizados (ver Anexo 3). Si bien este porcentaje no debe tomarse como una medida directa de la gravedad de la enfermedad, sugiere que una proporción significativa de pacientes presentó síntomas lo suficientemente graves como para requerir atención hospitalaria. Al determinar asociaciones, el presente análisis reveló una asociación estadísticamente significativa entre las diferentes variantes (20A, 20B (Zeta), 20C y Delta) y riesgos de hospitalización más altos con respecto a otras variantes.

Según los datos del sitio GISAID, las variantes 20A, 20B (Zeta) y 20C fueron las primeras variantes del SARS CoV 2 y circularon al inicio de la pandemia. Durante esta etapa la población estaba vulnerable, no se tenía inmunidad previa y aún no habían vacunas disponibles, todos estos factores pudieron influir en que éstas variantes están asociadas con la hospitalización. Sin embargo los mismos registros del GISAID indican que la variante 19B se mantuvo en la población por un tiempo más prolongado circulando desde el 2020 hasta el 2021.

En el presente análisis, la variante 19B muestra una asociación protectora a la hospitalización con respecto a otras variantes, es decir las variantes 20C, 20B y Delta parecen estar asociadas con un mayor riesgo, mientras que la variante 19B está asociada con un menor riesgo en comparación con otras variantes. Es probable que la variante 19B al haber circulado por más tiempo, la población desarrolló inmunidad y la habilidad para sobrellevar las infecciones cuando se infectó con esta variante. Esta hipótesis es respaldada con el análisis descriptivo de las mutaciones donde se observa que la variante 19B presenta un número importante de mutaciones en comparación con otras variantes. (Ver figura 3 y Anexo 5). Las mutaciones pueden ser interpretadas como una huella molecular del tiempo de circulación de los virus, la variante 19B al tener muchas mutaciones, indica que circuló por mayor tiempo entre la población intentando adaptarse y desarrollando nuevos mecanismos de supervivencia.

En Nicaragua la variante Delta estuvo circulando desde Abril 2021 casi junto al inicio de la vacunación contra la COVID 19 en el país (Maier et al., 2022), a pesar de la inmunidad previa y de la vacunación esta variante estuvo asociada a hospitalización. Este mismo hecho fue reportado por diversos autores (Greene et al., 2023; Harris, 2022). La variante Omicrón fue muy importante en el panorama epidemiológico mundial, a pesar de esto, en esta investigación se muestra que el riesgo de hospitalización fue menor entre los pacientes infectados con la variante Omicron, en comparación con la variante Delta. Esto sugiere que las características genéticas de la variante Delta prevalecieron sobre la inmunidad, aún cuando esta fue inducida por la vacunación. Estos hallazgos sugieren la existencia de diferencias en la susceptibilidad a la hospitalización entre diferentes variantes del SARS-CoV-2.

La relación entre una variante específica y la hospitalización puede ser compleja y estar influenciada por varios factores. Estos factores pueden incluir la combinación de ciertas mutaciones y características genéticas, la capacidad de transmisión, la respuesta inmunitaria del huésped y la efectividad de las medidas de control y prevención.

Es posible que la variante Delta, a pesar de tener la mutación D614G como la variante 19B, presente otras mutaciones o características que contribuyan a su mayor riesgo de hospitalización en comparación con la variante 19B. Estas mutaciones adicionales podrían

afectar la capacidad de replicación viral, la evasión inmunitaria o la interacción con las células huésped, entre otros factores.

Las variantes son originadas por los cambios en el genoma del SARS CoV 2. El impacto en la enfermedad severa u hospitalización está modulada por toda una gama de características propias de cada variantes como combinación de mutaciones, características fenotípicas propias de cada variante y período de circulación.

La identificación y el seguimiento de las variantes del virus en Nicaragua son cruciales para entender cómo se propaga la enfermedad en la población local. Esto permite a las autoridades de salud pública y a los profesionales médicos implementar medidas de control y prevención más efectivas, como campañas de vacunación dirigidas, políticas de cuarentena y aislamiento, y estrategias de comunicación pública.

Diferentes variantes pueden tener distintas características en términos de transmisibilidad, severidad de la enfermedad y eficacia de las vacunas existentes. Comprender estas diferencias es crucial para adaptar las estrategias de salud pública y los tratamientos médicos.

La pandemia de COVID-19 ha sido un problema global, y cada país aporta información valiosa sobre el comportamiento del virus. Los datos de Nicaragua pueden agregar al entendimiento global de las variantes del virus, especialmente en el contexto de Centroamérica.

La investigación sobre las variantes del SARS-CoV-2 también es fundamental para la preparación frente a futuros brotes. Entender cómo evoluciona el virus y cómo se propagan las variantes puede ayudar a anticipar y mitigar futuras pandemias.

## X. CONCLUSIONES

1. Se determinaron las variantes circulantes del SARS CoV 2 entre Marzo 2020 y Septiembre 2022: 19A, 19B, 20A, 20B (Zeta), 20C, 20J (Gamma, V3), Delta, Omicrón y variantes recombinantes. Las variantes evolucionaron acumulando cambios genéticos que dieron origen a nuevas variedades genéticas. Cada variante posee mutaciones en diferentes partes del genoma. Las mutaciones más frecuentes fueron S:D614G, ORF1a:T2967I, ORF1a:T3255I y ORF1b:P1342S. Las variantes que más mutaciones poseen son en orden descendente Omicron, Delta y 19B
2. Durante el tiempo han surgido y desaparecido diferentes variantes y ha existido una especie de competencia entre ellas. Hay unas variantes que predominan por períodos y luego son reemplazadas por otras. Durante el 2020 circularon las variantes Alpha, Beta, 19A, 20B y 20C. Durante el 2021 prevaleció Delta durante el segundo semestre después de dominar por encima de 19B y Gamma V3. Durante el 2022 ha predominado Omicron. Se dieron origen a sublinajes de la variante omicrón y los linajes BA.1, BA.2 y BA.4 provocaron un aumento en la positividad en Nicaragua durante períodos específicos. En general la introducción de nuevas variantes ha provocado picos de porcentaje de positividad altos.
3. Las variantes fueron identificadas por primera vez mediante la vigilancia del SARS CoV 2 en diferentes puntos de Nicaragua desde donde se propagaron por todo el territorio nacional. La mayoría de las variantes analizadas proceden de Managua, seguido de los departamentos de Matagalpa, Estelí y León.
4. Se identificó asociación entre el aumento de la edad y la probabilidad de hospitalización. También se identificó una asociación entre las variantes 20A, 20B (Zeta), 20C y la variante Delta con un aumento en la probabilidad de Hospitalización, por el contrario se encontró asociación entre la variante 19B y una disminución en el riesgo de hospitalización. El sexo femenino se encontró asociado a un aumento en el la probabilidad de infección con las variantes recombinantes.

## **XI. RECOMENDACIONES**

En los últimos 12 años, solo en las Américas hemos sido testigos de dos pandemias y la emergencia de enfermedades como el Zika y el Chikungunya, así como una de las más grandes epidemias de dengue registradas durante el 2019. Estos eventos destacan la urgencia de adoptar enfoques basados en la genómica para fortalecer la epidemiología y la comprensión de las enfermedades infecciosas a nivel de país. Con esto en mente, se presentan las siguientes recomendaciones.

A los equipos Epidemiológicos del Ministerio de Salud:

1. Reconocimiento del Trabajo Actual: Se reconoce y valora el destacado trabajo realizado por los equipos epidemiológicos en la colaboración con el laboratorio Nacional de Virología en la vigilancia genómica de enfermedades como el Dengue y la COVID-19. Los esfuerzos en este ámbito han contribuido significativamente a la comprensión de las enfermedades, la presente investigación es prueba de eso.
2. Continuidad en la Vigilancia Genómica: Se recomienda continuar y potenciar los esfuerzos en la vigilancia genómica de enfermedades prioritarias, manteniendo un foco particular en aquellas de alta prevalencia, transmisibilidad y con un alto potencial epidémico, como el Dengue y la COVID-19. La constante actualización y monitorización genómica son fundamentales para anticipar y mitigar posibles brotes y mutaciones.
3. Expansión de la Vigilancia a Otras Áreas: Basándonos en la experiencia adquirida y en la infraestructura ya existente, se sugiere expandir las iniciativas de investigación y vigilancia genómica a otros microorganismos de interés, especialmente aquellos con potencial desarrollo de resistencia a antibióticos. La diversificación en las áreas de vigilancia permitirá una respuesta más rápida y efectiva ante diversos retos epidemiológicos.
4. Potenciación de Iniciativas Existentes: Aunque existen actualmente varias iniciativas en marcha, se requiere un impulso significativo en el desarrollo y

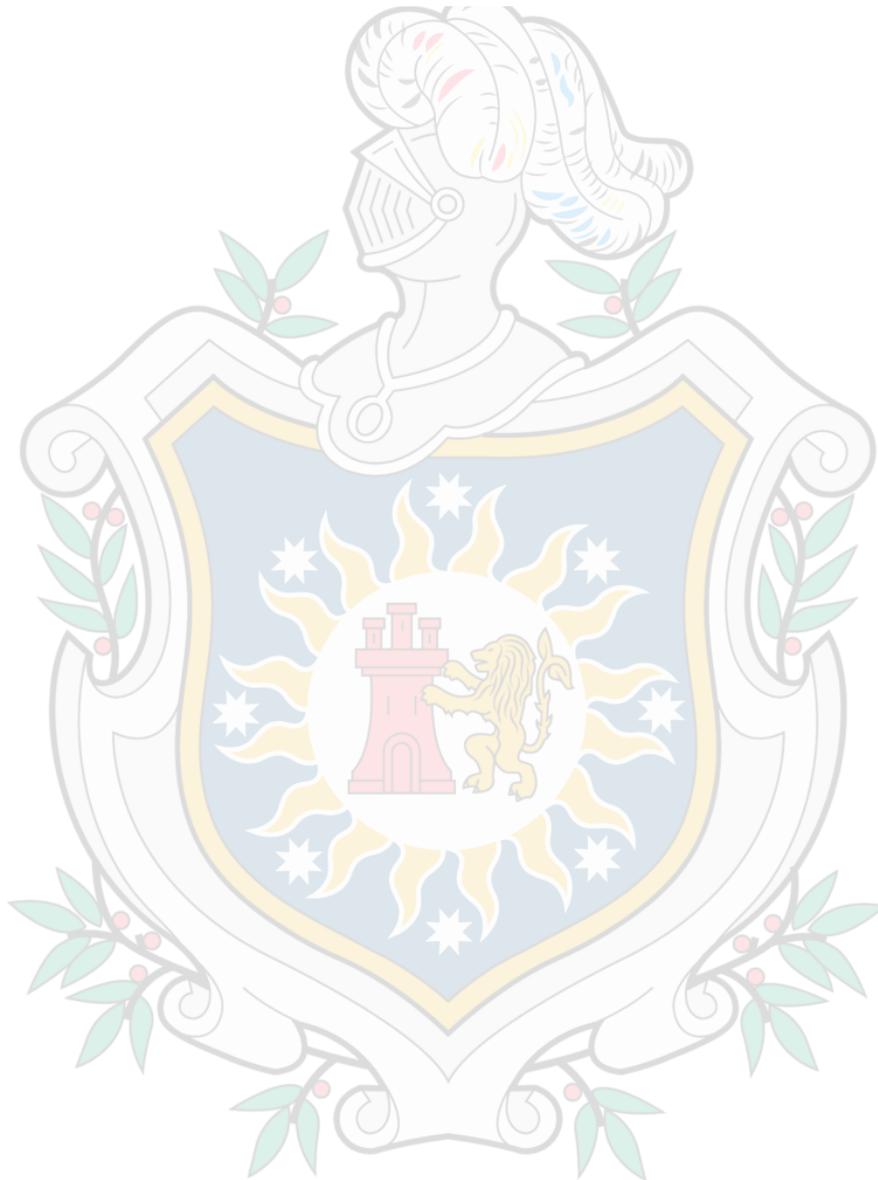
financiamiento de proyectos que aborden la resistencia a antibióticos y otros problemas emergentes. Potenciar dichas iniciativas permitirá mejorar la vigilancia genómica en el país y contribuirá al fortalecimiento del sistema de salud pública.

5. Colaboración Multidisciplinaria: Se aconseja fomentar la colaboración entre diferentes disciplinas y sectores, promoviendo la integración de conocimientos y la optimización de recursos. La colaboración multidisciplinaria es clave para el avance científico y la aplicación efectiva de la vigilancia genómica en el ámbito de la salud pública.

A las universidades:

1. Es crucial que las universidades consideren la inclusión de temas relacionados con la secuenciación y estudio del ADN y ARN, así como herramientas bioinformáticas que permitan su análisis en áreas de estudio de las enfermedades infecciosas con el objetivo de prepararse adecuadamente para nuevas pandemias y epidemias de enfermedades infecciosas emergentes. La secuenciación genómica y las herramientas bioinformáticas desempeñan un papel fundamental en la identificación y caracterización de patógenos, así como en la comprensión de su origen, evolución y mecanismos de transmisión. Al incluir estos temas en los programas académicos en el campo de las enfermedades infecciosas, las universidades estarán brindando a los estudiantes las habilidades necesarias para abordar los desafíos emergentes en la salud global y contribuir de manera significativa a la prevención, diagnóstico y control de futuras pandemias y epidemias.
2. En el contexto de programas de posgrado dirigidos a la investigación epidemiológica, es fundamental considerar la incorporación del uso de herramientas más flexibles para el análisis de datos, como R y/o Python. Estas herramientas de programación y análisis estadístico ofrecen una amplia gama de funcionalidades y capacidades que son altamente relevantes en la investigación científica y el estudio de enfermedades con potencial pandémico. R y Python permiten el manejo eficiente de grandes conjuntos de datos, el análisis estadístico avanzado, la visualización de resultados y la implementación de modelos predictivos. Al incluir estos temas en los programas

de posgrado, las universidades brindarán a los estudiantes las herramientas necesarias para abordar de manera efectiva los desafíos epidemiológicos y estadísticos asociados con enfermedades infecciosas de importancia global. Además, esto fomentará la colaboración interdisciplinaria y el avance de la investigación en el campo de la salud pública.



## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Acer, Ö., Genç Bahçe, Y., & Özüdoğru, O. (2022). Association of viral load with age, gender, disease severity, and death in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants. *Journal of Medical Virology*, 94(7), 3063–3069.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.27677>
- Álvarez-Díaz, D. A., Laiton-Donato, K., Franco-Muñoz, C., & Mercado-Reyes, M. (2020). Secuenciación del SARS-CoV-2: La iniciativa tecnológica para fortalecer los sistemas de alerta temprana ante emergencias de salud pública en Latinoamérica y el Caribe. *Biomédica*, 40(Suppl 2), 188–197.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5841>
- Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J., & Schwager, C. (1986). A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 13(6), 315–323. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(86\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0165-022x(86)90038-2)
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., & Zenke, M. (1987). Automated DNA sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15(11), 4593–4602.
- Artic Network. (2020). *Artic Network*. <https://artic.network/1-about.html>
- ARTIC SARS-CoV-2 Workflow. (2023). [Groovy]. EPI2ME Labs.  
<https://github.com/epi2me-labs/wf-artic> (Original work published 2021)
- Ball, E., & Pinedo-Donelli, S. (2020). Secuenciación de nueva generación: Utilidad en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 48(1), 47–62.  
<https://doi.org/10.35366/93979>

- Beyer, D. K., & Forero, A. (2022). Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Biology*, 434(6), 167265.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167265>
- Castañeda, S., Patiño, L. H., Muñoz, M., Ballesteros, N., Guerrero-Araya, E., Paredes-Sabja, D., Flórez, C., Gomez, S., Ramírez-Santana, C., Salguero, G., Gallo, J. E., Paniz-Mondolfi, A. E., & Ramírez, J. D. (2021). Evolution and Epidemic Spread of SARS-CoV-2 in Colombia: A Year into the Pandemic. *Vaccines*, 9(8), 837.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines9080837>
- Chidgeavadze, Z. G., Beabealashvili, R. S., Atrazhev, A. M., Kukhanova, M. K., Azhayev, A. V., & Krayevsky, A. A. (1984). 2',3'-Dideoxy-3' aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 12(3), 1671–1686.
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., Mc, E., & Zambon, M. (2020). *Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR*. 13.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., & Ysebaert, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260(5551), Article 5551. <https://doi.org/10.1038/260500a0>
- Flor, L. S., Friedman, J., Spencer, C. N., Cagney, J., Arrieta, A., Herbert, M. E., Stein, C., Mullany, E. C., Hon, J., Patwardhan, V., Barber, R. M., Collins, J. K., Hay, S. I., Lim, S. S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Murray, C. J. L., Reiner, R. C., Sorensen, R. J. D., ... Gakidou, E. (2022). Quantifying the effects of the COVID-19 pandemic on

gender equality on health, social, and economic indicators: A comprehensive review of data from March, 2020, to September, 2021. *The Lancet*, 399(10344), 2381–2397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00008-3)

GISAID. (2022, April 4). *GISAID - hCov19 Variants*. HCov19 Variants.

<https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>

Gómez-Carballa, A., Bello, X., Pardo-Seco, J., Martínón-Torres, F., & Salas, A. (2020).

Mapping genome variation of SARS-CoV-2 worldwide highlights the impact of COVID-19 super-spreaders. *Genome Research*, 30(10), 1434–1448.

<https://doi.org/10.1101/gr.266221.120>

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), Article 6.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Goulding, J. (2013, February 28). *Virus replication*. British Society for Immunology.

<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/virus-replication>

Greene, S. K., Levin-Rector, A., Kyaw, N. T. T., Luoma, E., Amin, H., McGibbon, E.,

Mathes, R. W., & Ahuja, S. D. (2023). Comparative hospitalization risk for SARS-CoV-2 Omicron and Delta variant infections, by variant predominance periods and patient-level sequencing results, New York City, August 2021–January 2022.

*Influenza and Other Respiratory Viruses*, 17(1), e13062.

<https://doi.org/10.1111/irv.13062>

Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P.,

Bedford, T., & Neher, R. A. (2018). Nextstrain: Real-time tracking of pathogen

evolution. *Bioinformatics*, 34(23), 4121–4123.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>

Harris, J. E. (2022). COVID-19 Incidence and hospitalization during the delta surge were inversely related to vaccination coverage among the most populous U.S. Counties. *Health Policy and Technology*, 11(2), 100583.

<https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2021.100583>

Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664), 1462–1465.

<https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>

hudsonalpha Institute for Biotechnology. (2021, February 18). *Sequencing from scratch: Reference genomes and de novo sequence assembly – HudsonAlpha Institute for Biotechnology*. <https://www.hudsonalpha.org/sequencing-from-scratch-reference-genomes-and-de-novo-sequence-assembly/>

Indu, R., Baunthiyal, M., & Saxena, J. (2014). *Advances in Biotechnology* (1st ed., Vol. 1). Springer.

Infante, C. F., Martínez-Urtaza, J., Martí, O. F., & González-Recio, Ó. (2020, May 30). *Nanoporos: Secuenciación rápida del coronavirus como alternativa a la PCR*. The Conversation. <http://theconversation.com/nanoporos-secuenciacion-rapida-del-coronavirus-como-alternativa-a-la-pcr-137904>

Jou, W. M., Haegeman, G., Ysebaert, M., & Fiers, W. (1972). Nucleotide Sequence of the

Gene Coding for the Bacteriophage MS2 Coat Protein. *Nature*, 237(5350), Article 5350. <https://doi.org/10.1038/237082a0>

Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D. W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13770–13773.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770>

Kharroubi, S. A., & Diab-El-Harake, M. (2022). Sex-differences in COVID-19 diagnosis, risk factors and disease comorbidities: A large US-based cohort study. *Frontiers in Public Health*, 10.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.1029190>

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., ... Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182(4), 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>

Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., & Studholme, D. J. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>

Le Guillou-Guillemette, H., Vallet, S., Gaudy-Graffin, C., Payan, C., Pivert, A., Goudeau, A., & Lunel-Fabiani, F. (2007). Genetic diversity of the hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology : WJG*,

13(17), 2416–2426. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i17.2416>

Maier, H. E., Balmaseda, A., Saborio, S., Ojeda, S., Barilla, C., Sanchez, N., Lopez, R., Plazaola, M., Cerpas, C., van Bakel, H., Kubale, J., Harris, E., Kuan, G., & Gordon, A. (2022). Protection Associated with Previous SARS-CoV-2 Infection in Nicaragua. *New England Journal of Medicine*, 387(6), 568–570. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2203985>

Md., S. S.-G., Diego-Álvarez, D., Buades, C., Romera-López, A., Pérez-Cabornero, L., Valero-Hervás, D., Cantalapiedra, D., Bioinformatics, Felipe-Ponce, V., Hernández-Poveda, G., José Roca, M., Casañas, C., Fernández-Pedrosa, V., M., C. C., C., Á. A., P., J. C. T., C., Ó. R., Marco, G., Gil, M., ... Ballester, A. (2015). DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES GENÉTICAS: DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO AL DIAGNÓSTICO GENÓMICO CON LA SECUENCIACIÓN MASIVA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(4), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.07.004>

Mishra, S., Mindermann, S., Sharma, M., Whittaker, C., Mellan, T. A., Wilton, T., Klapsa, D., Mate, R., Fritzsche, M., Zambon, M., Ahuja, J., Howes, A., Miscouridou, X., Nason, G. P., Ratmann, O., Semenova, E., Leech, G., Sandkühler, J. F., Rogers-Smith, C., ... Flaxman, S. (2021). Changing composition of SARS-CoV-2 lineages and rise of Delta variant in England. *EClinicalMedicine*, 39, 101064. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101064>

Molina-Mora, J. A., Cordero-Laurent, E., Godínez, A., Calderón-Osorno, M., Brenes, H., Soto-Garita, C., Pérez-Corrales, C., Drexler, J. F., Moreira-Soto, A., Corrales-Aguilar, E., & Duarte-Martínez, F. (2021). SARS-CoV-2 genomic surveillance in

Costa Rica: Evidence of a divergent population and an increased detection of a spike T1117I mutation. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104872.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104872>

Morozova, O., & Marra, M. A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92(5), 255–264.

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.07.001>

Muurlink, O. T., & Taylor-Robinson, A. W. (2020). COVID-19: Cultural Predictors of Gender Differences in Global Prevalence Patterns. *Frontiers in Public Health*, 8.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.00174>

Nanoporetech. (2022). *Medaka* [Python]. Oxford Nanopore Technologies.

<https://github.com/nanoporetech/medaka> (Original work published 2017)

National Center for Biotechnology Information. (2020a, January 13). *Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete geno—Nucleotide—NCBI*.

<https://web.archive.org/web/20200113151631/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947>

National Center for Biotechnology Information. (2020b, March 20). *Taxonomy browser (Betacoronavirus)*.

<https://web.archive.org/web/20200320000811/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=694002&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock=>

National Human Genome Research Institute. (n.d.). *Terminación del Proyecto Genoma Humano*. Genome.Gov. Retrieved March 29, 2022, from

<https://www.genome.gov/11510905/preguntas-maacutes-frecuentes>

- Okoh, O. S., Nii-Trebi, N. I., Jakkari, A., Olaniran, T. T., Senbadejo, T. Y., Kafintu-  
kwashie, A. A., Dairo, E. O., Ganiyu, T. O., Akaninyene, I. E., Ezediuno, L. O.,  
Adeosun, I. J., Ockiya, M. A., Jimah, E. M., Spiro, D. J., Oladipo, E. K., & Trovão,  
N. S. (2022). Epidemiology and genetic diversity of SARS-CoV-2 lineages  
circulating in Africa. *IScience*, 25(3), 103880.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103880>
- Organización Mundial de la Salud. (2022, March 22). *Tracking SARS-CoV-2 variants*.  
World Health Organization. [https://www.who.int/health-topics/nipah-virus-  
infection/tracking-SARS-CoV-2-variants](https://www.who.int/health-topics/nipah-virus-infection/tracking-SARS-CoV-2-variants)
- Oxford Nanopore Technolgies. (2020, January 13). *R10.3: The newest nanopore for high  
accuracy nanopore sequencing – now available in store*. Oxford Nanopore  
Technologies. [http://nanoporetech.com/about-us/news/r103-newest-nanopore-high-  
accuracy-nanopore-sequencing-now-available-store](http://nanoporetech.com/about-us/news/r103-newest-nanopore-high-accuracy-nanopore-sequencing-now-available-store)
- Oxford Nanopore Technolgies. (2021). *Oxford Nanopore launches ‘Midnight kit’, suitable  
for low to high-throughput SARS-CoV-2 sequencing, enabling rapid, low-cost,  
large-scale genomic surveillance of COVID-19*. Oxford Nanopore Technologies.  
[http://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-launches-midnight-kit-  
suitable-low-high-throughput-sars-cov-2](http://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-launches-midnight-kit-suitable-low-high-throughput-sars-cov-2)
- Parra-Luceres, A., Segura, P., Rojas, V., Pumarino, C., Saint-Pierre, G., & Toro, L. (2022).  
Emergence of SARS-CoV-2 Variants in the World: How Could This Happen? *Life*,  
12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/life12020194>
- Peckham, H., de Gruijter, N. M., Raine, C., Radziszewska, A., Ciurtin, C., Wedderburn, L.  
R., Rosser, E. C., Webb, K., & Deakin, C. T. (2020). Male sex identified by global

- COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19741-6>
- Porta, M. (2008). *A Dictionary of Epidemiology 5th Edición* (5th ed., Vol. 1). Oxford University Press.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., & Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4825), 336–341. <https://doi.org/10.1126/science.2443975>
- Prüß, B. M. (2022). Variants of SARS CoV-2: Mutations, transmissibility, virulence, drug resistance, and antibody/vaccine sensitivity. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(2), Article 2. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2702065>
- Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2021). Addendum: A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00872-5>
- Rodriguez-Morales, A. J., Balbin-Ramon, G. J., Rabaan, A. A., Sah, R., Dhama, K., Paniz-Mondolfi, A., Pagliano, P., & Esposito, S. (2020). Genomic Epidemiology and its importance in the study of the COVID-19 pandemic. *Le Infezioni in Medicina*, 28(2), 139–142.

- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R., Gomez, A., Perdomo, S., & García-Roble, R. (2020). *Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: Presente y futuro en la práctica clínica*. [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20\(2020\)/231062391008/](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20(2020)/231062391008/)
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2001). Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. *Journal of Virology*, 75(14), 6566–6571. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6566-6571.2001>
- Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Singh, J., Rahman, S. A., Ehtesham, N. Z., Hira, S., & Hasnain, S. E. (2021). SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nature Medicine*, 27(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01397-4>
- Smith, L. M., Fung, S., Hunkapiller, M. W., Hunkapiller, T. J., & Hood, L. E. (1985). The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: Synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 13(7), 2399–2412.
- Tamim, S., Trovao, N. S., Thielen, P., Mehoke, T., Merritt, B., Ikram, A., Salman, M., Alam, M. M., Umair, M., Badar, N., Khurshid, A., & Mehmood, N. (2021). Genetic and evolutionary analysis of SARS-CoV-2 circulating in the region surrounding

Islamabad, Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution*, 94, 105003.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105003>

The Nexstrain Team. (2021). *Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with global subsampling*. <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?l=radial>

Thorne, L. G., Bouhaddou, M., Reuschl, A.-K., Zuliani-Alvarez, L., Polacco, B., Pelin, A., Batra, J., Whelan, M. V. X., Hosmillo, M., Fossati, A., Ragazzini, R., Jungreis, I., Ummadi, M., Rojc, A., Turner, J., Bischof, M. L., Obernier, K., Braberg, H., Soucheray, M., ... Krogan, N. J. (2022). Evolution of enhanced innate immune evasion by SARS-CoV-2. *Nature*, 602(7897), Article 7897.

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04352-y>

Vignuzzi, M., Stone, J. K., & Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: Molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Research*, 107(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.007>

Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 39(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>

Wick, R. (2022). *Adapter trimmer for Oxford Nanopore reads [C++]*. <https://github.com/rrwick/Porechop> (Original work published 2017)

Worldometer. (2022, April 10). *Countries where Coronavirus has spread—Worldometer*.

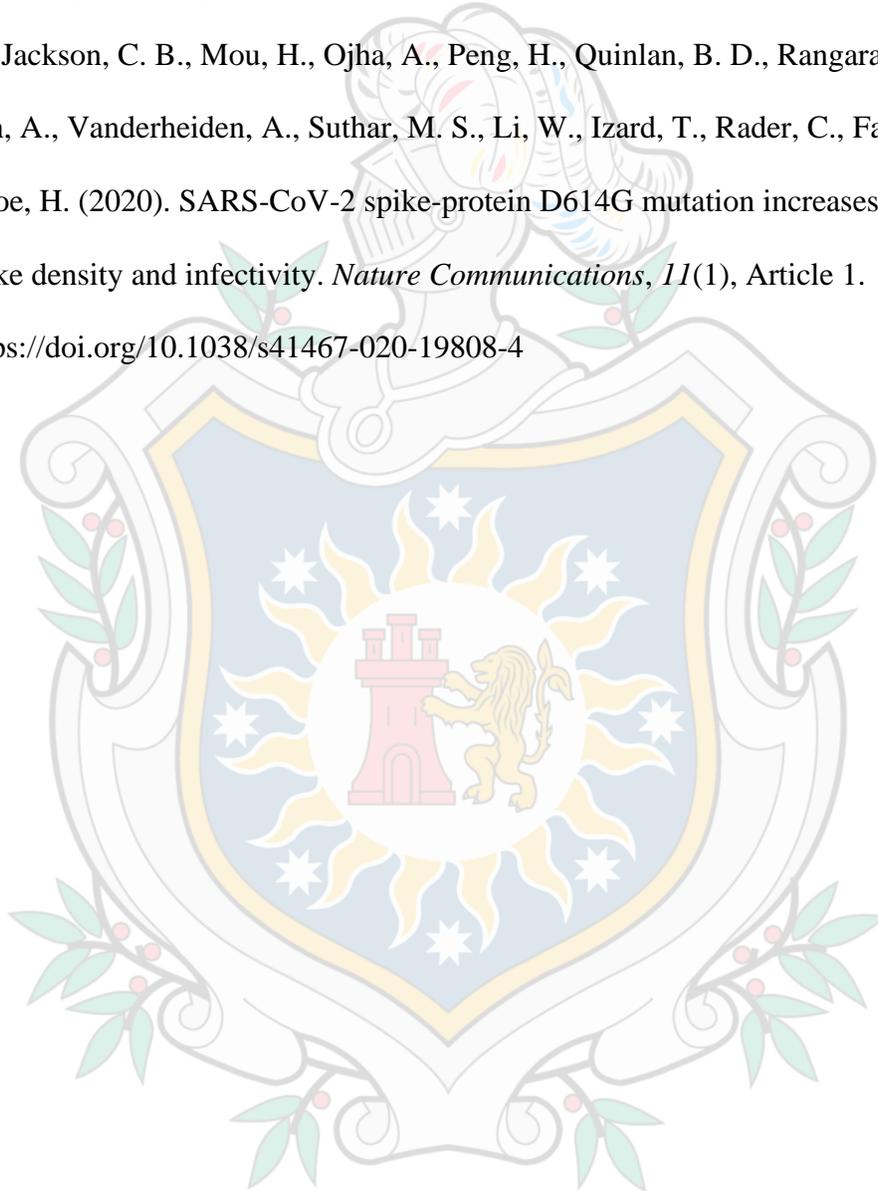
Countries Where Coronavirus Has Spread - Worldometer.

<https://www.worldometers.info/coronavirus/countries-where-coronavirus-has-spread/>

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian,

J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), Article 7798. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B. D., Rangarajan, E. S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M. S., Li, W., Izard, T., Rader, C., Farzan, M., & Choe, H. (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19808-4>



**ANEXOS**





## ANEXO 1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| VARIABLE | INDICADORES              | DEFINICIÓN OPERACIONAL   | VALORES  | ESCALA DE MEDICIÓN |
|----------|--------------------------|--|--|--------------------|
| Variante | Variantes del SARS CoV 2 | Grupos de virus SARS CoV 2 que poseen mutaciones particulares en su genoma | 19A<br>19B<br>20A<br>20B<br>Alpha<br>Beta<br>Delta<br>Eta<br>Epilson<br>Gamma<br>Iota<br>Kappa<br>Mu<br>Lambda<br>Omicron<br>Theta<br>Zeta | Nominal            |

|                      |                           |  |   |          |
|----------------------|---------------------------|--|---|----------|
| Sublinaje            | Sublinaje                 | Diversidad genética dentro de las variantes Delta y Omicrón.     | AY.1<br>AY.2<br>AY.3.5<br>AY.4<br>BA.1<br>BA.2<br>BA.3<br>BA.4<br>BA.5<br>BQ<br>XBB | Nominal  |
| Mutaciones           | Mutaciones del SARS CoV 2 | Mutaciones expresadas por las variantes del SARS CoV 2           | Mutaciones del SARS CoV 2   | Nominal  |
| Número de Mutaciones | número de Mutaciones      | Número de mutaciones expresadas por las variantes del SARS CoV 2 | Unidades  | Continua |

|                           |   |   |  |          |
|---------------------------|---|---|--|----------|
| Fecha de aparición        | Fecha de aparición del virus en el lugar de procedencia | Fecha específica en que una persona empezó a presentar síntomas atribuibles por laboratorio a una infección por SARS CoV 2, o en caso de desconocer esta fecha, la fecha en que se toma la muestra. | Fechas   | continua |
| Fecha de Toma de muestra  | Fecha de Toma de muestra                                | Fecha en la que se tomó una muestra a una persona con resultado positivo a SARS CoV2  | Fecha  | Continua |
| Procedencia de la muestra | Procedencia de la muestra                               | Departamento o donde se toma la muestra a una persona con COVID 19.   | Boaco<br>Carazo,<br>Chinandega,<br>Chontales,<br>Estelí,<br>Granada,<br>Jinotega,<br>León, | Nominal  |

|                          |                       |  |  |         |
|--------------------------|-----------------------|--|--|---------|
|                          |                       |  | <p>Madriz,</p> <p>Managua,</p> <p>Masaya,</p> <p>Matagalpa,</p> <p>Nueva Segovia,</p> <p>Río San Juan,</p> <p>Rivas.</p> <p>Región<br/>Autónoma de la<br/>costa caribe<br/>Norte.</p> <p>Región<br/>Autónoma de la<br/>costa caribe<br/>Sur.</p> |         |
| Variantes<br>circulantes | Variantes Circulantes | <p>Variantes del SARS<br/>CoV 2 que circulan en<br/>un periodo<br/>determinado y en un<br/>lugar determinado</p> | <p>19A</p> <p>19B</p> <p>20A</p> <p>20B</p> <p>Alpha</p> <p>Beta</p>   | Nominal |

|                         |                      |   |  |         |
|-------------------------|----------------------|---|--|---------|
|                         |                      |   | Delta  |         |
|                         |                      |   | Eta  |         |
|                         |                      |   | Epilson  |         |
|                         |                      |   | Gamma  |         |
|                         |                      |   | Iota   |         |
|                         |                      |   | Kappa  |         |
|                         |                      |   | Mu   |         |
|                         |                      |   | Lambda   |         |
|                         |                      |   | Omicron  |         |
|                         |                      |   | Theta  |         |
|                         |                      |   | Zeta   |         |
| Sublinaje<br>circulante | Sublinaje Circulante | Sublinajes de las<br>variantes Delta y<br>Omicrón que circulan<br>en un periodo<br>determinado y en un<br>lugar determinado | AY.1<br>AY.2<br>AY.3.5<br>AY.4<br>BA.1<br>BA.1<br>BA.2<br>BA.3<br>BA.4 | Nominal |

|              |              |  |  |         |
|--------------|--------------|--|--|---------|
|              |              |  | BA.5<br>BQ<br>XBB  |         |
| Grupo Etario | Grupo Etario | Conjunto de individuos de la muestra que comparten un mismo rango de edad. | <b>&lt;1</b> (Menores de un año)<br><b>1-4</b> (de 1 a 4 años)<br><b>5-14</b> (de 5 a 14 años)<br><b>15-24</b> (de 15 a 24 años)<br><b>25-44</b> (de 25 a 44 años)<br><b>45-64</b> (de 45 a 64 años)<br><b>&gt;65</b> (de 65 años a más) | Nominal |
| Sexo         | Sexo         | Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres  | Masculino<br>Femenino  | Nominal |

## ANEXO 2: FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA VIGILANCIA DE VIRUS RESPIRATORIOS



**Ministerio de Salud de Nicaragua**  
**Dirección General de Vigilancia para la Salud Pública**

**Formulario para la vigilancia integrada de IRAG ( ) / ETI ( ) / IRAG Inusitada ( )**

Unidad de Salud:  Fecha de primera  No de caso:

Fecha de consulta  consulta por este evento:

**1. DATOS DEL PACIENTE:** Menor de 5 años ( ) Mayor de 5 años ( )

Nombre y apellidos:  :

Sexo: M ( ) F ( ) Fecha nacimiento: ...../...../..... Edad: Años:..... (<1a) Meses: ..... (<1m) Días:.....

|  |              |                    |  |
|--|--------------|--------------------|--|
| Departamento de Procedencia:                               |              | Municipio:         |  |
| Barrio, Dirección y teléfono:                              |              | Urbano( ) Rural( ) |  |
| Captación: Emergencia ( ) Sala ( ) Ambulatorio ( ) UCI ( ) | Diagnóstico: |                    |  |

**Antecedentes de vacunación:** Presenta tarjeta de vacunación: SI ( ) NO ( )

| Vacuna:            | Aplicada:                 | ¿Cual?                                | No de dosis: | Fecha última dosis: |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------|---------------------|
| Anti Hib           | SI ( ) NO ( ) No sabe ( ) | ( ) Pentavalente                      |              | ...../...../.....   |
| Anti meningococica | SI ( ) NO ( ) No sabe ( ) | ( ) Conjugada ( ) Polisacarida        |              | ...../...../.....   |
| Anti neumococica   | SI ( ) NO ( ) No sabe ( ) | ( ) Heptavalente ( ) 23 polisacarida  |              | ...../...../.....   |
| Anti influenza     | SI ( ) NO ( ) No sabe ( ) | ( ) Estacional, ( ) H1N1pmd, ( ) Otra |              | ...../...../.....   |

**Condiciones preexistentes (marque con X si está presente)**

| Condición                | SI | NO | NS | Condición                   | SI | NO | NS | Condición               | SI | NO | NS |
|--------------------------|----|----|----|-----------------------------|----|----|----|-------------------------|----|----|----|
| Cáncer                   |    |    |    | Enfermedad cardíaca         |    |    |    | Desnutrición            |    |    |    |
| Diabetes                 |    |    |    | Asma                        |    |    |    | Obesidad                |    |    |    |
| VIH                      |    |    |    | EPOC                        |    |    |    | Embarazo (Semanas: )    |    |    |    |
| Otra inmunodeficiencia   |    |    |    | Otra Enf. pulmonar          |    |    |    | Tx con corticosteroides |    |    |    |
| Enf. Neurológica crónica |    |    |    | Insuficiencia Renal Crónica |    |    |    | Otra: _____             |    |    |    |

**2. Datos clínicos**

Fecha de inicio de los síntomas: ...../...../.....

| Manifestaciones clínicas | SI | NO | NS | Manifestaciones clínicas | SI | NO | NS | Manifestaciones clínicas   | SI | NO | NS |
|--------------------------|----|----|----|--------------------------|----|----|----|----------------------------|----|----|----|
| Fiebre                   |    |    |    | Tirajes                  |    |    |    | Dolor muscular / articular |    |    |    |
| Dolor de garganta        |    |    |    | Estridor                 |    |    |    | Exantema                   |    |    |    |
| Tos                      |    |    |    | vómitos                  |    |    |    | Malestar general           |    |    |    |
| Estornudos               |    |    |    | intolerancia VO          |    |    |    | Letargia o inconsciencia   |    |    |    |
| Sibilancias              |    |    |    | Diarrea                  |    |    |    | Convulsiones               |    |    |    |
| Secreción nasal          |    |    |    | Dolor de cabeza          |    |    |    | Otra (¿Cual?):             |    |    |    |
| Dificultad respiratoria  |    |    |    | Conjuntivitis            |    |    |    |                            |    |    |    |
| Taquipnea                |    |    |    | Dolor abdominal          |    |    |    |                            |    |    |    |

Uso de antibióticos durante la última semana: SI ( ) NO ( ) No Sabe ( )

|  |   |
|--|---|
| Si es "SI", Cuantos antibióticos le dio? __ ¿Cuáles antibióticos le dio? _____ | Cuantos días le dio el último antibiótico: Via: Oral ( ) Parenteral ( ) Ambas ( ) |
| Antecedente de uso de antivirales: SI ( ) NO ( ) Nombre del antiviral _____    |   |
| Fecha de 1era dosis // Fecha de última dosis // No de dosis administrada _____ |   |

Consolidado o infiltrado alveolar ( ) Derramen paraneumónico ( ) Patrón alveolo-intersticial (mixto) ( ) Patrón intersticial ( )  
 Atrapamiento de aire ( ) Otros, describir: .....

**4. DATOS DE LABORATORIO:**

**4.1. Obtención de muestra:** Anote los exámenes solicitados con una X

|                          |               |                                 |
|--------------------------|---------------|---------------------------------|
| Hemocultivo              | SI ( ) NO ( ) | Fecha de toma:...../...../..... |
| Cultivo Líquido Pleural: | SI ( ) NO ( ) | Fecha de toma:...../...../..... |
| Hisopado nasofaríngeo:   | SI ( ) NO ( ) | Fecha de toma:...../...../..... |
| Lavado nasofaríngeo:     | SI ( ) NO ( ) | Fecha de toma:...../...../..... |
| Hisopado orofaríngeo:    | SI ( ) NO ( ) | Fecha de toma:...../...../..... |

**4.2 Resultados:** (anote los resultados de los exámenes solicitados)

| Prueba                      | Fecha de resultado       | Resultado   |
|-----------------------------|--------------------------|---|
| Inmunofluorescencia         | ...../...../.....<br>... | Influenza A ( ) Influenza B ( ) Adenovirus ( ) VSR ( )<br>Parainfluenza I ( ) Parainfluenza II ( ) Parainfluenza III ( ) Poca Células ( )<br>Contaminado ( ) Otro ( ) |
| PCR                         | ...../...../.....<br>... | Influenza A H1 ( ) Influenza A H3 ( ) Influenza AH1 2009 ( ) Influenza B ( )<br>); Variante: _____<br>Otros virus: _____<br>Poca muestra ( ) No Procesado ( )         |
| Cultivo viral               | ...../...../.....<br>... | Influenza A H1 ( ) Influenza A H3 ( ) Influenza AH1 2009 ( ) Influenza B ( )<br>); Variante: _____<br>Otros virus: _____  |
| Gram de hemocultivo:        | ...../...../.....<br>... |   |
| Gram de líquido pleural:    | ...../...../.....<br>... |   |
| Hemocultivo:                | ...../...../.....<br>... | Hid ( ) Sph ( ) Otra bacteria: _____ Contaminado ( ) Ninguna ( )<br>No procesado ( )  |
| Cultivo de Líquido pleural: | ...../...../.....<br>... | Hid ( ) Sph ( ) Otra bacteria: _____ Contaminado ( ) Ninguna ( )<br>No procesado ( )  |

**4.3. Susceptibilidad antimicrobiana:** anote los antimicrobianos según susceptibilidad

|             |  |
|-------------|--|
| Sensible:   |  |
| Intermedio: |  |
| Resistente: |  |

¿Estuvo ingresado en Unidad de Cuidado Intensivo (UCI)? SI ( ) No de días ..... NO ( ). Ventilación asistida: ( ) Si, ( )  
 No Diagnósticos de Egreso: 1. (CE-18)..... 2. (CE-18).....  
 Fecha de egreso:...../...../.....  
 Condición de egreso: Alta mejorado o Curado: ( ) Abandono ó Fuga: ( ) Referido a otro hospital: ( ) Falleció: ( )

**5. EVOLUCIÓN DEL PACIENTE:**  
**6. CLASIFICACIÓN FINAL DEL CASO:**

|   |
|---|
| Inadecuadamente investigado ( ) Probable NB ( ) Probable NV ( ) IRAG no especificada ( )<br>Confirmado NB ( ) Agente etiológico bacteriano serotipificación: _____ Descartado NB ( )<br>Confirmado NV ( ) Agente etiológico viral<br>Descartado NV ( )<br>Coinfección Bacteriana y Viral ( ) Agentes etiológicos: ..... |
| Llenó la Ficha: Nombre:..... Fecha: / / Sello: .....  |

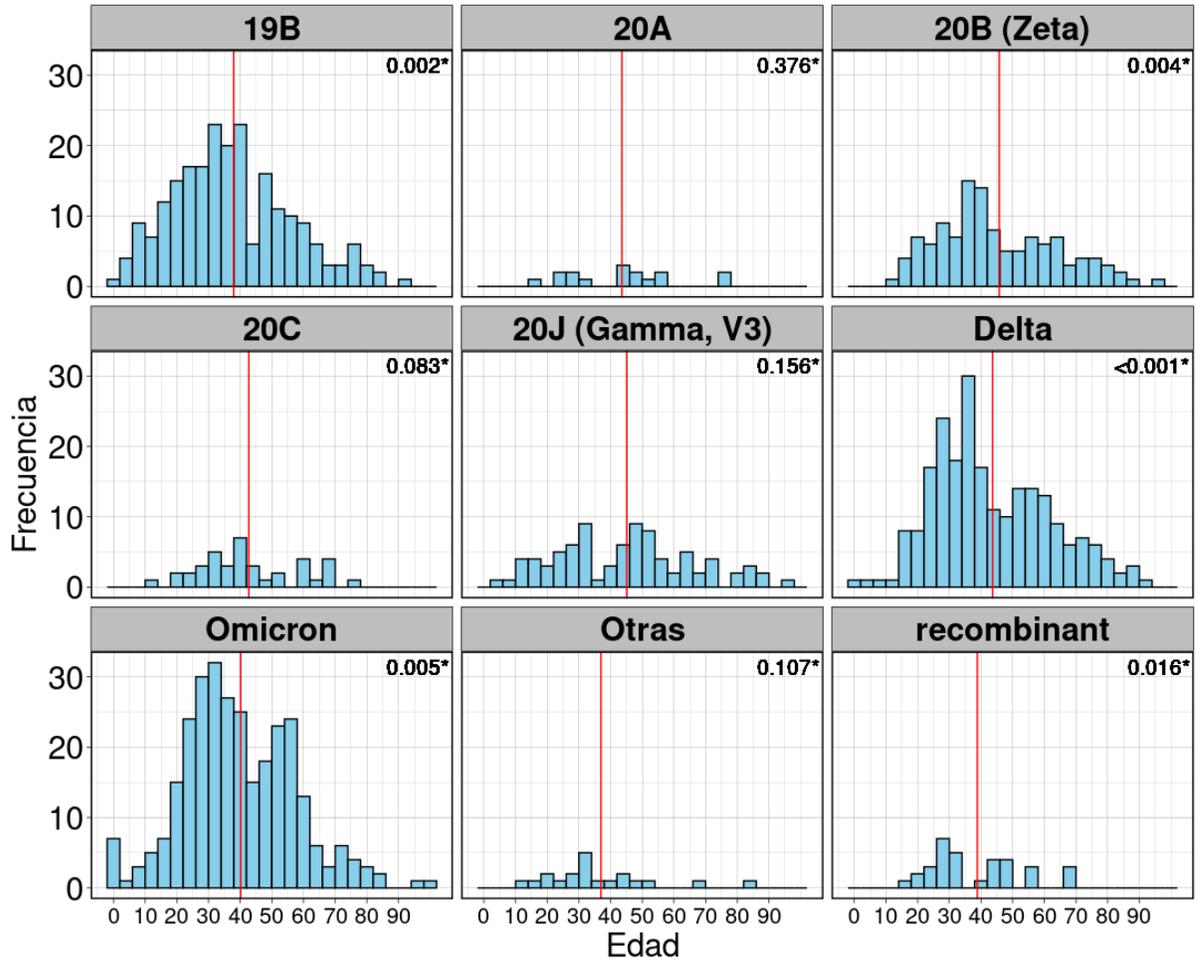
**ANEXO 3: DISTRIBUCIÓN DE VARIANTES IDENTIFICADAS EN 1069 GENOMAS DEL SARS-COV-2 POR SEXO Y ESTADO DE HOSPITALIZACIÓN DE LOS PACIENTES.**

| Variante               | n (%)        | Sexo n (%) |              |          | Hospitalización n (%) |              |            |
|------------------------|--------------|------------|--------------|----------|-----------------------|--------------|------------|
|                        |              | Masculino  | Femenino     | Sin dato | Si                    | No           | sin dato   |
| <b>19A</b>             | 1 (0.09%)    | 0          | 1 (0.09%)    | 0        | 0                     | 0            | 1 (0.09%)  |
| <b>19B</b>             | 227 (21.2%)  | 97 (9.07%) | 130 (12.16%) | 0        | 69 (6.45%)            | 141 (13.18%) | 17 (1.59%) |
| <b>20A</b>             | 16 (1.49%)   | 8 (0.74%)  | 8 (0.74%)    | 0        | 11 (1.02%)            | 5 (0.46%)    | 0          |
| <b>20B (Zeta)</b>      | 119 (11.13%) | 52 (4.86%) | 67 (6.26%)   | 0        | 59 (5.51%)            | 54 (5.05%)   | 6 (0.56%)  |
| <b>20C</b>             | 39 (3.64%)   | 20 (1.87%) | 19 (1.77%)   | 0        | 25 (2.33%)            | 14 (1.31%)   | 0          |
| <b>20H (Beta, V2)</b>  | 1 (0.09%)    | 0          | 1 (0.09%)    | 0        | 0                     | 1 (0.09%)    | 0          |
| <b>20I (Alpha, V1)</b> | 3 (0.28%)    | 2 (0.18%)  | 1 (0.09%)    | 0        | 2 (0.18%)             | 1 (0.09%)    | 0          |
| <b>20J (Gamma, V3)</b> | 88 (8.23%)   | 39 (3.64%) | 48 (4.49%)   | 1(0.09%) | 24 (2.24%)            | 32 (2.99%)   | 32 (2.99%) |
| <b>21C (Epsilon)</b>   | 4 (0.37%)    | 3 (0.28%)  | 1 (0.069%)   | 0        | 1 (0.09%)             | 3 (0.28%)    | 0          |

|                     |                    |                     |                     |                  |                    |                     |                     |
|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <b>21G (Lambda)</b> | 7 (0.64%)          | 5 (0.46%)           | 2 (0.18%)           | 0                | 0                  | 3 (0.28%)           | 4 (0.37%)           |
| <b>21H (Mu)</b>     | 4 (0.37%)          | 1 (0.09%)           | 3 (0.28%)           | 0                | 0                  | 4 (0.37%)           | 0                   |
| <b>Delta</b>        | 228 (21.32%)       | 100 (9.3%)          | 128 (11.97%)        | 0                | 88 (8.29%)         | 58 (5.42%)          | 82 (7.67%)          |
| <b>Omicron</b>      | 299 (27.97%)       | 111 (10.38%)        | 185 (17.3%)         | 3 (0.28%)        | 42 (3.92%)         | 67 (6.26%)          | 190 (17.7%)         |
| <b>recombinant</b>  | 33 (3.08%)         | 7 (0.65%)           | 26 (2.43%)          | 0                | 15 (1.4%)          | 16 (1.49%)          | 2 (0.18%)           |
| <b>Totales</b>      | <b>1069 (100%)</b> | <b>445 (41.62%)</b> | <b>620 (57.99%)</b> | <b>4 (0.37%)</b> | <b>336 (31.4%)</b> | <b>399 (37.32%)</b> | <b>334 (31.24%)</b> |



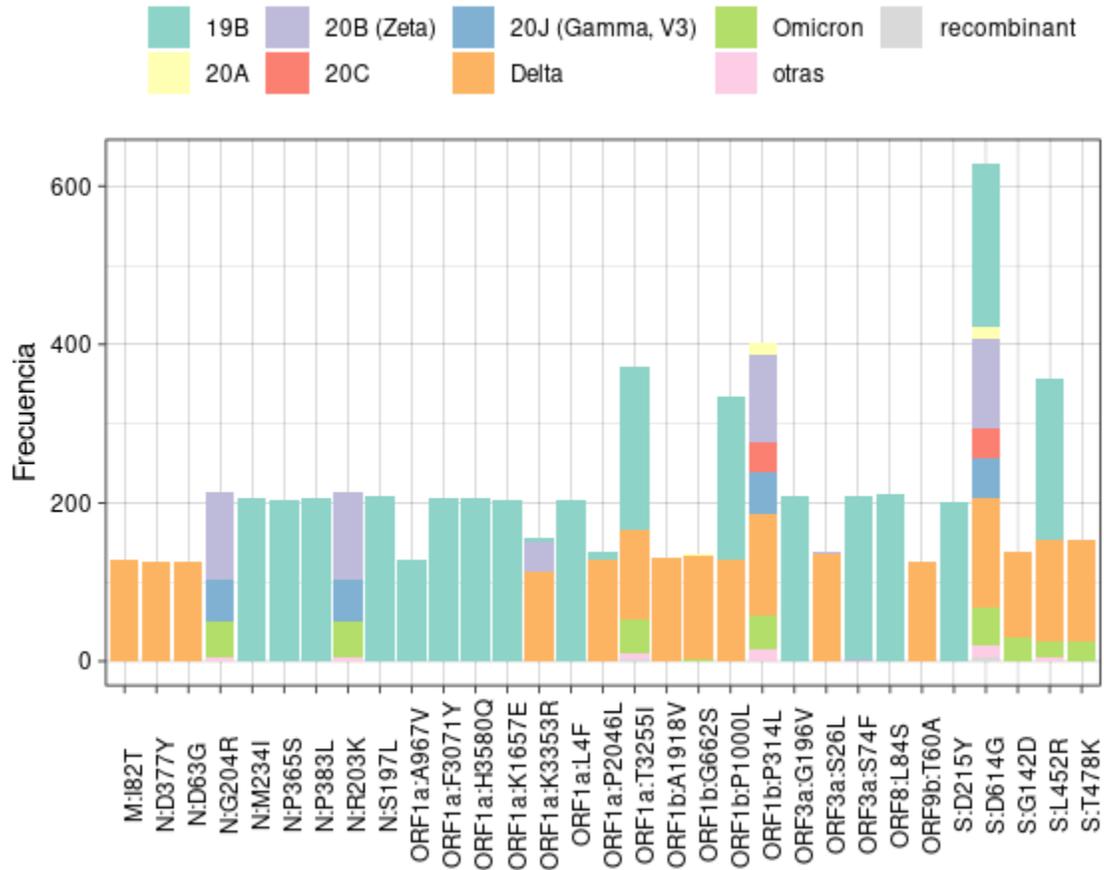
## ANEXO 4: DISTRIBUCIÓN DE LA EDAD DE LOS PACIENTES SEGÚN LAS VARIANTES IDENTIFICADAS



\*p\_value Shapiro test  
Kruskal-Wallis Test: p = 0.005



**ANEXO 5: 30 MUTACIONES IDENTIFICADAS MÁS FRECUENTEMENTE MEDIANTE SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN LAS VARIANTE DEL SARS COV 2 EN 735 PACIENTES CON DATO DE HOSPITALIZACIÓN**



## ANEXO 6: CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS



Sustainable Sciences Institute  
Instituto de Ciencias Sostenibles

Managua, 10 de Noviembre de 2022

### CARTA DE AUTORIZACIÓN

Por este medio, autorizo a Gerald Nicolás Vásquez Alemán, Lic. Bioanálisis Clínico, trabajador activo del Instituto de Ciencias Sostenibles y estudiante de la Maestría en Epidemiología en el Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud (CIES UNAN Managua), a acceder a la base de datos de resultados de secuenciación del SARS CoV2, información del estudio de cohorte pediátrica y datos de las muestras procesadas en el laboratorio de virología del CNDR, en el período Marzo 2021 – Septiembre 2022 para ser utilizados en el proyecto de investigación de tesis titulado: "Epidemiología molecular y evolutiva del SARS CoV 2 en Nicaragua, Marzo 2021 – Septiembre 2022".

Autoriza

  
  
Dr. Ángel Lázaro Balmaseda Hecheverría  
Ced.: 777-021060-0001H  
Coordinador de sitio ICS Nicaragua

SSI – Nicaragua  
Quinta Etapa, Los Robles  
Gasolinera Plaza el Sol, 2o al Sur 1c arriba  
Casa No 85, Managua, Nicaragua  
Telefax: +505.2254.7266

SSI – California  
870 Market Street, Suite 764  
San Francisco, California 94102  
Tel: +1.415.772.0939 | Fax: +1.415.772.9059

