

Bioquímica y Patología Clínica

Bioquímica y Patología Clínica

ISSN: 1515-6761

ISSN: 2684-0359

revista@aba-online.org.ar

Asociación Bioquímica Argentina

Argentina

Quintana, Silvina; Fedele, Stefanía; Giustina, Silvina; Montiel Belmonte, Javier; Di Gerónimo, Vanesa Mariana; Sanz, Yamila; Ligorino, Gisela; Gorla, Natalia; Giletto, Giuliana; Rivero, Mariana; Fares Taie, Hernán
Estudio del valor de Ct: el polimorfismo D/I del gen ECA1 en la respuesta al SARS-COV-2.
Bioquímica y Patología Clínica, vol. 87, núm. 1, 2023, Enero-, pp. 35-39
Asociación Bioquímica Argentina
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65174086004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio del valor de Ct y el polimorfismo D/I del gen ECA1 en la respuesta al SARS-COV-2

Study of the impact of the ACE1 I/D polymorphism and SARS-COV-2 Ct value on COVID-19 infection

Quintana, Silvina ^{1,2*}; Giustina, Silvina¹; Montiel Belmonte, Javier¹; Di Gerónimo, Vanesa Mariana¹; Fedele, Stefanía ¹; Sanz, Yamila ¹; Ligorino, Gisela¹; Gorla, Natalia ¹; Giletto, Giuliana³; Rivero, Mariana⁴; Fares Taie, Hernán¹

¹Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Biotecnología, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Investigaciones en Producción Sanidad y Ambiente, CONICET-CIC, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

³Hospital Interzonal Especializado Materno Infantil "Don Victorio Tetamanti". Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁴Centro de Investigación Veterinaria de Tandil, CONICET-CIC, Fac. Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Quintana, Silvina. Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Biotecnología, Rivadavia 3343, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina; biologiamolecular@farestaie.com.ar.

Resumen El gen de la ECA1 (Enzima convertidora de la Angiotensina) presenta un polimorfismo (rs4646994) de inserción/delección (I/D). La delección se ha asociado con una menor expresión de ECA2, el receptor de SARS-Cov-2. Se ha estudiado que el valor de Ct (*cycle threshold*) para SARS-Cov-2 tiene relación con el desarrollo de síntomas. Nuestro objetivo fue evaluar si el polimorfismo rs4646994 está vinculado a la susceptibilidad a SARS-Cov-2 y si el Ct influye en el desarrollo de síntomas. Se estudiaron 658 individuos no relacionados, 325 individuos no infectados, 132 portadores asintomáticos y 201 individuos sintomáticos en los cuales la presencia o ausencia del virus SARS-Cov-2 fue determinada mediante kit comercial de RT-qPCR. Se registró edad, sexo, valor de Ct, así como los síntomas de cada individuo. Las muestras se genotipificaron para rs4646994. Se encontraron diferencias significativas entre la presencia de síntomas y el valor de Ct (asintomáticos: Ct= 23,84 vs. sintomáticos: Ct= 20,22, $p < 0,001$). Se encontraron diferencias significativas entre la presencia de malestar general, fiebre, cefalea, odinofagia, tos, mialgia, anosmia y el valor de Ct, ($p < 0,001$). La frecuencia del alelo D en los no infectados fue de 0,51, mientras que en el grupo de portadores asintomáticos de SARS-Cov-2 fue de 0,54 y de 0,53, en los sintomáticos, sin mostrar diferencias significativas entre los tres grupos. Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo rs4646994 no estaría vinculado a la susceptibilidad al SARS-Cov-2 en nuestra población y que la carga viral, analizada como valor de Ct, influye en la aparición de algunos síntomas.

Palabras clave: COVID-19, valor de Ct, polimorfismo del gen ECA1, síntomas, susceptibilidad genética.

Abstract The Angiotensin Converting Enzyme (ACE1) gene presents an insertion/deletion (I/D) polymorphism (rs4646994). The deletion has been associated with a lower expression of ACE2, the SARS-Cov-2 receptor. It has been described that the SARS-Cov-2 cycle threshold (Ct) value is related to the development of symptoms. Our objective was to evaluate whether the rs4646994 polymorphism is linked to the susceptibility to SARS-Cov-2 infection and whether the Ct value influences the development of symptoms. We studied 658 unrelated individuals: 325 uninfected individuals, 132 asymptomatic carriers and 201 symptomatic individuals, in whom the presence/absence of SARS-Cov-2 in a nasopharyngeal swab sample was determined using a commercial RT-qPCR kit. The age, gender, Ct value, and symptoms of each individual were recorded. Samples were genotyped by PCR for rs4646994. No differences were found in the age and gender of SARS-Cov-2-positive patients, or in the presence of symptoms. Significant differences were found between the presence of symptoms and the Ct value (asymptomatic Ct: 23.84 vs symptomatic Ct: 20.22, $p < 0.001$). Significant differences were found between the presence of general malaise, fever, headache, odynophagia, cough, myalgia and anosmia and the Ct value ($p < 0.001$). The D allele frequency in uninfected individuals was 0.51, whereas that in asymptomatic carriers was 0.54 and that in symptomatic ones was 0.53, showing no significant differences between the three groups. Our results suggest that the rs4646994 polymorphism is not linked to the susceptibility to SARS-Cov-2 infection in our population, and that the viral load, analyzed as the Ct value, influences the appearance of some symptoms.

Key words: COVID-19, Ct value, ACE1 polymorphism, symptoms, genetic susceptibility.

Introducción

En diciembre de 2019, China reporta por primera vez la enfermedad llamada COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), causada por un nuevo coronavirus al cual se denominó SARS-Cov-2¹. Dada su alta tasa de diseminación en el mundo, existen 433.000.000 de casos confirmados y 5.900.000 muertes, al 27/02/2022². La COVID-19 ha mostrado una amplia gama de comportamientos clínicos, desde asintomáticos hasta síndromes de enfermedad respiratoria grave. Los síntomas más habituales que presentan las personas infectadas por SARS-Cov-2 son fiebre, tos, cansancio, pérdida del gusto y/o del olfato. Dentro de los síntomas menos habituales, se encuentran: dolor de garganta, dolor de cabeza, malestar general, diarrea y erupción cutánea. Los síntomas de mayor gravedad son: dificultad para respirar o disnea, pérdida de movilidad o del habla, sensación de confusión y dolor en el pecho³.

Hasta el momento, no se conocen para cada población los marcadores asociados a susceptibilidad, resistencia y severidad de la COVID-19. Aún no está claro si son factores genéticos, sociales y/o una combinación de ambos los que contribuyen a las variaciones geográficas actuales de COVID-19. Se han iniciado trabajos a nivel internacional para estudiarlo^{4,5}. Desde el inicio de la pandemia, se han analizado factores virales como las diversas variantes del SARS-Cov-2⁶ y la carga viral, así como factores del hospedador, tales como diabetes y obesidad, factores genéticos y también, el grupo sanguíneo⁵.

La detección de la infección por SARS-Cov-2 se ha realizado, principalmente, mediante la prueba de PCR con transcripción reversa (RT-qPCR). Los resultados de tales pruebas se pueden informar como valores de ciclo umbral (Ct, del inglés, *cycle threshold*), que pueden proporcionar mediciones semicuantitativas o indirectas de la carga viral. En el caso del SARS-Cov-2, la cinética viral ha sido poco caracterizada y su asociación con la evolución de la enfermedad es controvertida. A pesar de ello, existen evidencias que sugieren que el período de incubación es de aproximadamente 5 días y que la carga viral máxima se produce en la fase inicial de la enfermedad, cerca del momento del inicio de los síntomas⁷. El tiempo que transcurre hasta la eliminación viral varía entre los estudios, pero la diseminación del virus puede persistir durante varias semanas después del inicio de los síntomas, incluso meses, en algunas personas⁸, y puede ser más corta en personas jóvenes y/o asintomáticas. En pacientes hospitalizados, algunos estudios sugieren una carga viral más alta en pacientes graves en comparación con pacientes leves⁹.

El papel de la genética del huésped en el impacto de la susceptibilidad y la gravedad de la COVID-19 no han sido estudiados en nuestra población. El coronavirus SARS-Cov-2 entra en las células a través de la unión de una proteína de su superficie, la proteína *Spike*, con el receptor ECA2 (enzima convertidora de angiotensina 2) de las células huésped¹⁰.

El gen que codifica a la ECA1 se localiza en el cromosoma 17 (17q23) y está compuesto por 26 exones y 25 intrones. El gen de la ECA1 presenta un polimorfismo de inserción/de-

lección [I/D, dbSNP rs4646994], el cual se debe a la presencia o no, en el intrón 16, de una secuencia Alu repetitiva que comprende 287 pares de bases¹¹. La delección de este polimorfismo del gen ECA1 se ha asociado con una menor expresión de ECA2, el receptor de SARS-Cov-2, lo cual implicaría que aquellos pacientes con el genotipo DD presentarían menor susceptibilidad a la infección¹².

En diversos trabajos, se ha descrito la relación entre este polimorfismo y la severidad en pacientes con COVID-19¹³⁻¹⁷. Existen ciertas discrepancias acerca de la relación entre la expresión de ECA2 y la susceptibilidad a la infección por SARS-Cov-2, como propone Saadat en su publicación¹⁸, motivo por el cual resulta necesario tener en cuenta distintos factores ambientales como la frecuencia alélica de cada población, el patrón geográfico de prevalencia y mortalidad, la economía y el número de testeos para dicha infección, etc., ya que es evidente que dichos factores pueden sesgar las conclusiones de varios de los trabajos publicados.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el polimorfismo rs4646994 del gen ECA1 está vinculado a la susceptibilidad a SARS-Cov-2 y si el valor de Ct influye en el desarrollo de síntomas.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se estudiaron individuos no relacionados en los cuales la presencia o ausencia del virus SARS-Cov-2 fue determinada en muestras de hisopado nasofaríngeo mediante *kit* comercial de RT-qPCR. Los individuos completaron una planilla epidemiológica y, además, firmaron un consentimiento informado para la participación en el estudio, el cual cuenta con aprobación de un comité de ética local (Comité de Ética en Investigación, Instituto de Investigaciones Clínicas). Se analizaron individuos no infectados que habían tenido un contacto estrecho con un caso confirmado dentro de los tres días anteriores a la toma de muestra, portadores asintomáticos e individuos sintomáticos que asistieron al laboratorio entre septiembre y diciembre de 2020. Los síntomas registrados fueron cefalea, odinofagia, tos, mialgia, diarrea, artralgia, anorexia, disnea, malestar general, fiebre y anosmia.

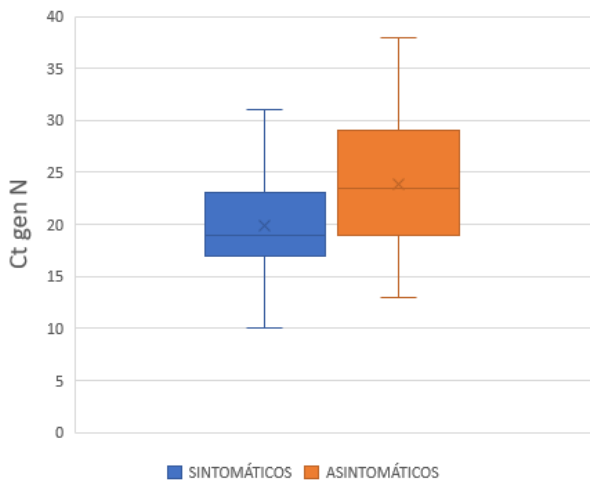
Toma de muestra

La muestra utilizada para la detección de SARS-Cov-2 y el estudio del polimorfismo I/D [rs4646994] del gen ECA1 por el método de PCR fue el hisopado nasofaríngeo. La toma de muestra estuvo a cargo de personal de salud capacitado para este procedimiento. Una vez realizado el hisopado nasofaríngeo, se colocó el hisopo en un tubo cónico con solución fisiológica y la muestra se conservó refrigerada en heladera a 4°C, no más de 72 h, hasta su procesamiento.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ARN y ADN de las muestras respiratorias se llevó a cabo con el *Viral Nucleic Acid Extraction Kit* (Genaid, New Taipei, Taiwan), siguiendo las instrucciones del

Figura 1. Valores de Ct del Gen N en individuos sintomáticos y asintomáticos.



fabricante. Las extracciones se llevaron a cabo en cabina de seguridad biológica tipo II.

Estudio molecular de la presencia de ARN de SARS-CoV-2

La detección del SARS-CoV-2 se realizó con el kit 2019-nCoV CDC EUA, (IDT, Integrated DNA Technologies). Se utilizó la premezcla *GoTaq(R) Probe 1-Step RT-qPCR System* –Promega - Bosphore® *novel coronavirus (2019-NCOV) Detection kit V2*. Como control positivo de las reacciones, se utilizó *2019-nCoV-N-Positive Control* (IDT). El kit utiliza dos juegos de *primers* y sondas para amplificar las regiones N1 y N2 del gen de la nucleocápside viral (gen N). Un par de *primers* y sondas adicionales se utiliza para detectar el gen humano *Rnase P* como control del proceso de extracción de ARN de las muestras biológicas (control interno). Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un equipo Analytik Jena qTOWER³Q, siguiendo el siguiente programa: 15 minutos a 45°C, 2 minutos a 95°C con 45 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 55°C. La medición de fluorescencia se realizó en el canal FAM.

Estudio del polimorfismo I/D del gen ECA1

El análisis del polimorfismo genético I/D (rs4646994) en el intrón 16 del gen ECA1 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Rigat y colaboradores¹¹. Se realizaron amplificaciones con los oligonucleótidos ACEfw (CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT) y ACerv (GATGTGGCCATCACATTCGTCA-GAT) con la premezcla Mytaq (Biosystems); los productos de amplificación fueron observados en gel de agarosa 1,5 %. Los pacientes homocigotas D/D presentan una banda de 190pb, los homocigotas I/I presentan una banda de 490 pb. En el caso de los heterocigotas I/D, se observan dos bandas: una de 190pb y otra de 490pb.

Análisis estadístico

Con base en los resultados obtenidos mediante la geno-

Tabla I. Media de valores de Ct, desvío standard (SD) y valor P (WMW) para los diferentes síntomas analizados.

| Síntoma | | Media Ct | SD | Valor P |
|------------------|----------|----------|------|---------|
| Diarrea | Presente | 20,17 | 4,58 | 0,23 |
| | Ausente | 21,77 | 5,68 | |
| Malestar general | Presente | 19,32 | 4,44 | <0,0001 |
| | Ausente | 22,84 | 5,79 | |
| Artralgia | Presente | 19,46 | 3,75 | 0,09 |
| | Ausente | 21,84 | 5,72 | |
| Fiebre | Presente | 18,61 | 3,86 | <0,0001 |
| | Ausente | 22,87 | 5,76 | |
| Cefalea | Presente | 19,99 | 4,77 | 0,0042 |
| | Ausente | 22,15 | 5,78 | |
| Odinofagia | Presente | 20,41 | 5,47 | 0,0455 |
| | Ausente | 21,91 | 5,63 | |
| Tos | Presente | 19,41 | 4,58 | <0,0001 |
| | Ausente | 22,54 | 5,75 | |
| Mialgia | Presente | 19,21 | 4,17 | 0,0030 |
| | Ausente | 21,98 | 5,71 | |
| Anorexia | Presente | 20 | 3,97 | 0,29 |
| | Ausente | 21,76 | 5,69 | |
| Disnea | Presente | 20,18 | 4,17 | 0,45 |
| | Ausente | 21,71 | 5,66 | |
| Anosmia | Presente | 22,77 | 4 | 0,03 |
| | Ausente | 21,51 | 5,79 | |

► *Ct= valor umbral del ciclo (cycle threshold value) **SD= desvío estándar *** Valor p= probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible, dada una hipótesis nula cierta.

tipificación de los individuos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo en estudio para los tres grupos de muestras. En los tres grupos de individuos, se evaluó su apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg bajo el test de Chi-cuadrado (X²). Para evaluar el valor de Ct y la presencia de los diferentes signos y síntomas, se utilizó el test de Mann–Whitney–Wilcoxon (WMW). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia (α) = 0,05.

Resultados

Se estudiaron 658 individuos no relacionados: 325 individuos no infectados que habían tenido contacto estrecho con un caso confirmado dentro de los tres días anteriores a la toma de muestra, 132 portadores asintomáticos y 201 individuos sintomáticos.

El promedio de edad de la población estudiada fue de 41.76 años [rango 1-95, DS 17,81], el 51 % era masculina]. No se encontró relación entre la edad y el sexo con la posi-

Tabla II. Frecuencias alélicas y genotípicas en los tres grupos estudiados.

| Grupo | Frecuencia genotípica | | | Frecuencia alélica | |
|---------------------------|-----------------------|------|------|--------------------|------|
| | DD | DI | II | D | I |
| Negativos para SARS-Cov-2 | 0,26 | 0,55 | 0,19 | 0,51 | 0,49 |
| Positivos sintomáticos | 0,26 | 0,55 | 0,19 | 0,53 | 0,47 |
| Positivos asintomáticos | 0,28 | 0,54 | 0,18 | 0,54 | 0,46 |

vidad para SARS-Cov-2, con la presencia de síntomas ni con el valor de Ct. Se encontraron diferencias significativas entre la presencia de síntomas y el valor de Ct (asintomáticos: Ct = 23,84 vs. sintomáticos: Ct = 20,22, WMW, $p < 0,001$), y los individuos con síntomas mostraron un valor de Ct menor (Figura 1).

No se encontraron diferencias entre la presencia de diarrea, artralgia, anorexia, disnea y el valor de Ct. Se encontraron diferencias significativas entre la presencia de malestar general, fiebre, cefalea, odinofagia, tos, mialgia, anosmia y el valor de Ct, ($p < 0,05$, Tabla I). En todos los casos, excepto para anosmia, los pacientes con síntomas presentaban un valor de Ct menor (mayor carga viral) respecto de los que no los presentaban.

Estudio del polimorfismo I/D del gen ECA1

Se obtuvieron los perfiles genéticos de las 658 muestras, que permitieron calcular las frecuencias alélicas y genotípicas y, por ende, lograr estimar la distribución de frecuencias de estos polimorfismos en cada grupo de estudio. La frecuencia del alelo D en los individuos no infectados fue de 0,51, mientras que en el grupo de portadores asintomáticos de SARS-Cov-2 fue de 0,54 y de 0,53, en los sintomáticos (Tabla II). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p = 0,35$) ni tampoco, al comparar los individuos con PCR detectable (sintomáticos y asintomáticos) con los no detectables ($p = 0,98$).

Asimismo, no se encontró una relación estadísticamente significativa del genotipo del polimorfismo genético I/D (rs4646994) del gen ECA1 con el sexo ni con el valor de Ct ni con la aparición de ninguno de los síntomas evaluados. Todos los grupos de datos están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Discusión

Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo rs4646994 no estaría vinculado a la susceptibilidad a la infección por SARS-Cov-2 en nuestra población y que la carga viral analizada como valor de Ct influye en la aparición de algunos síntomas.

En el presente trabajo, encontramos que los pacientes con síntomas presentaban valores de carga viral medida en

valor de Ct, mayores que los de aquellos pacientes sin síntomas. Existen varios trabajos anteriores en los cuales no se ha encontrado relación entre el valor de Ct con el desarrollo de síntomas¹⁹⁻²¹. Por el contrario, en el caso de Salvatore y colaboradores, ellos encontraron, utilizando el mismo kit de RT-qPCR que el presente trabajo, una relación entre el valor de Ct y el desarrollo de síntomas respiratorios²². En particular, hemos encontrado relación entre el valor de Ct y el desarrollo de los siguientes síntomas: malestar general, fiebre, cefalea, odinofagia, tos, mialgia y anosmia.

Los pacientes con el síntoma de anosmia presentaron un valor de Ct mayor que aquellos que no la presentaban, lo cual podría estar relacionado con que este síntoma tiene una aparición más tardía en la infección. En trabajos anteriores, no encontraron relación entre el valor de Ct y la severidad o el tiempo de recuperación de la anosmia²³.

El análisis de este estudio no mostró una relación entre el valor de Ct y las diferentes edades. En la bibliografía existen evidencias contradictorias al respecto, aunque se sugiere que el valor de Ct disminuye con la edad^{24,25}.

El presente estudio cuenta con varias limitaciones. Los participantes fueron categorizados según sus síntomas en el momento de la toma de muestra para la prueba de RT-qPCR, lo cual no refleja la trayectoria completa de los síntomas del individuo. Adicionalmente, se incorporaron a este estudio pacientes ambulatorios con cuadros leves, por lo tanto, no se pudieron realizar correlaciones de los valores de Ct o del genotipo del polimorfismo I/D del gen ECA1 con el desarrollo de cuadros graves de COVID-19.

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el genotipo del polimorfismo I/D del gen ECA1 con el sexo, con el valor de Ct ni con la aparición de ninguno de los síntomas evaluados. Tampoco se hallaron diferencias en su frecuencia alélica en los tres grupos estudiados, lo cual sugiere que este polimorfismo no estaría vinculado a la susceptibilidad al SARS-Cov-2 en nuestra población. Se han descrito otros genes, así como otros polimorfismos en los genes ECA, que podrían estar involucrados en la respuesta a la infección^{26,27}.

Este estudio aportará datos de utilidad para investigaciones que requieran el uso del polimorfismo I/D del gen ECA1 como marcador genético vinculado a la respuesta a la infec-

ción por SARS-Cov-2 en nuestra población. Probablemente, sería conveniente estudiarlo en pacientes con cuadros graves, ya que se ha encontrado que está relacionado con los mismos en diversas poblaciones^{28,13,14}.

Asimismo, este trabajo brindó información sobre la influencia del valor de Ct con el desarrollo de algunos síntomas que no se habían descrito en nuestra población.

Referencias bibliográficas

1. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, Kelvin K, Hin C, Jin Y et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020; 395: 514–23.
2. Weekly epidemiological update on COVID-19 - Edition 80 [Consultado 2022 27 Feb]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-february-2022>.
3. Coronavirus disease [COVID-19] [Consultado 2022 27 Feb]. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3
4. The COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-Cov-2 virus pandemic. *Eur J Hum Genet* 2020;28:715–718.
5. Fakhroo AD, Al Thani AA, Yassine HM. Markers Associated with COVID-19 Susceptibility, Resistance, and Severity. *Viruses* 2021; 13: 45.
6. Tracking SARS-CoV-2 variants [Consultado 2022 27 Feb]. Disponible en <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
7. He X, Lau E H Y, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26: 672–675.
8. Cevik M, Tate M, Ollie LO, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2021; e13–e22.
9. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect.* 2020; 20: 656–657.
10. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn S C, Di Napoli Features R. Evaluation and Treatment Coronavirus [COVID-19]. 2021 StatPearls [Consultado 2022 27 Feb]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
11. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990; 86:1343.
12. Li M, Schifanella L, Larsen P A. Alu retrotransposons and COVID-19 susceptibility and morbidity. *Human Genomics*, 2021;15(2):1-11.
13. Aladag E, Tas Z, Ozdemir B S, Akbaba T H, Meltem Akpınar M G, Goker H et al. N. "Human Ace D/I Polymorphism Could Affect the Clinicobiological Course of COVID-19". *JRAAS*, 2021; 5509280: 1-7.
14. Yamamoto N, Ariumi Y, Nishida N, Yamamoto R, Bauer G, Gojobori T et al. SARS-Cov-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype *Gene*. 2020;758:144944.
15. Delanghe J R, Speeckaert M M, De Buyzere M L. COVID-19 infections are also affected by human ACE1 D/I polymorphism. *Clin Chem Lab Med.* 2020 ;58(7):1125-1126.
16. Pati A, Manhto HS, Padhi S, Panda, A K. ACE deletion allele is associated with susceptibility to SARS-Cov-2 infection and mortality rate: An epidemiological study in the Asian population. *Clin Chim Acta.* 2020;510:455-458.
17. Gómez J, Albaiceta G M, García-Clemente M, López-Larrea C, Amado-Rodríguez L, Lopez-Alonso I et al. Angiotensin-converting enzymes [ACE, ACE2] gene variants and COVID-19 outcome. *Gene*. 2020; 762: 145102.
18. Saadat M. No significant correlation between ACE Ins/Del genetic polymorphism and COVID-19 infection. *CCLM* 2020; 58(7):1127-1128.
19. Zuin M, Gentili V, Cervellati C, Rizzo, Zuliani G. Viral Load Difference between Symptomatic and Asymptomatic COVID-19 Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect. Dis. Rep.* 2021; 13:645–653.
20. Arons M M, Hatfield K M, Reddy S C. Presymptomatic SARS-Cov-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med.* 2020; 382:2081-2090.
21. Kimball A, Hatfield K M, Arons M, Allison J, Joanne T, Kevin S et al. Asymptomatic and presymptomatic SARS-Cov-2 infections in residents of a long-term care skilled nursing facility - King County, Washington. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020; 69(13):377-381.
22. Salvatore P P, Dawson P, Wadhwa A, Rabold E M, Buono S, Dietrich E A et al. Epidemiological Correlates of Polymerase Chain Reaction Cycle Threshold Values in the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 [SARS-Cov-2]. *Clin Infect Dis.* 2021 ;72(11):e761-e767.
23. Cho R H W, To Z W H, Yeung Z W C, Tso E Y K, Fung K S C, Chau S K Y et al. COVID-19 Viral Load in the Severity of and Recovery from Olfactory and Gustatory Dysfunction. *Laryngoscope.* 2020;130(11):2680-2685.
24. Buchan B W J S, Gmehlin C G, Perez A, Faron M L, Munoz-Price L S, Ledebor N A. Distribution of SARS-Cov-2 PCR Cycle Threshold Values Provide Practical Insight Into Overall and Target-Specific Sensitivity Among Symptomatic Patients. *Am J Clin Pathol.* 2020 ;154(4):479-485.
25. Euser S, Aronson S, Manders I, Van Lelyveld S, Herpers B, Sinnige J, et al. SARS-Cov-2 viral-load distribution reveals that viral loads increase with age: a retrospective cross-sectional cohort study. *Int J Epidemiol.* 2021;50(6):1795-1803.
26. Lo Presti M, Beck D B, Duggal P, Cummings D A T, Solomon B D. The Role of Host Genetic Factors in Coronavirus Susceptibility: Review of Animal and Systematic Review of Human Literature. *AJHG.* 2020;107:381-402.
27. Schurr T G. Host genetic factors and susceptibility to SARS-Cov-2 infection *Am J Hum Biol.* 2020;32(5):e23497.
28. Ballone M S L. ACE polymorphisms and COVID-19-related mortality in Europe. *J Mol Med [Berl].* 2020;98(11):1505-1509.