

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Influencia de la carga viral, extracción de ARN y
conservación de las muestras en el diagnóstico
de COVID-19 mediante la PCR-RT en tiempo
real. LRR-Huancavelica, 2022**

Tesis para optar el título profesional de
Biólogo, Especialidad: Microbiología

Presentado por:
Bach. Roger Orlandini Cuba Quispe

Asesor:
Dr. Gilmar Peña Rojas

**Ayacucho - Perú
2024**

A mis queridos padres, Julia y Máximo, por sus constantes enseñanzas y valores. A mis hermanos, sobrinos, docentes y amigos, por su apoyo incondicional durante mi camino en ser un Biólogo profesional.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater* donde alcancé mis conocimientos académicos que me permitirán seguir avanzando profesionalmente.

A los docentes del Área Académica de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme sus amplias experiencias y conocimientos en cuanto a mi formación como Microbiólogo.

En especial al Área de Biología Molecular del Laboratorio Referencial de Salud Pública-Huancavelica, por su amable colaboración al proporcionar sus instalaciones para la ejecución exitosa de este proyecto, y al Dr. Sócrates Poma Solier por su apoyo.

Al Mg. Jorge Luis Lara Zúñiga, por su respaldo y orientación en la ejecución del proyecto. Su experiencia y conocimiento fueron determinantes desde un inicio hasta el final de la investigación.

Al Dr. Gilmar Peña Rojas, por su amistad, apoyo en el asesoramiento, permitiendo la elaboración y finalización del trabajo de investigación.

Al Dr. Homero Ango Aguilar, por su valiosa colaboración, calidad y profesionalismo.

Al Mg. Luis Armando Zúñiga Ccoicca, por su compromiso en el asesoramiento en la parte estadística e interpretación, contribuyeron en gran medida al éxito de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.1.1. Internacionales	3
2.1.2. Nacionales	5
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. Taxonomía del SARS-CoV-2	7
2.2.2. Estructura y morfología viral	8
2.2.3. Estructura genética	9
2.2.4. Ciclo infeccioso del SARS-CoV-2	10
2.2.5. Estructura de la proteína S	11
2.2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)	11
2.2.7. El valor del Umbral de ciclos (Ct)	13
2.2.8. Técnicas de extracción de ARN viral para detección del SARS-CoV-2	13
2.2.9. Obtención, transporte y conservación de muestras para RT-PCR	15
2.3. Marco legal ético	16
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Zona de estudio	19
3.1.1. Ubicación política	19
3.1.2. Ubicación geográfica	19
3.2. Población de estudio	19
3.3. Muestra	19
3.3.1. Criterios de inclusión	19
3.3.2. Criterios de exclusión	20
3.4. Sistema de muestreo	20

3.5.	Metodología y recolección de datos	20
3.5.1.	Métodos y procedimiento	20
3.5.2.	Selección de muestras	20
3.5.3.	Preparación de Buffer para la extracción manual	20
3.5.4.	Extracción del ARN manual Marca kit MOLE BIOSCIENCE	20
3.5.5.	Extracción del ARN semiautomatizado kit LIFOTRONIC	21
3.5.6.	Amplificación mediante de la RT-PCR en tiempo real, kit LIFOTRONIC	22
3.6.	Tipo de investigación	22
3.7.	Diseño de investigación	23
3.8.	Análisis estadístico	23
IV.	RESULTADOS	25
V.	DISCUSIÓN	33
VI.	CONCLUSIONES	39
VII.	RECOMENDACIONES	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Muestras positivas totales en diferentes periodos de tiempo: 0, 5, 10 y 15 por la Prueba de Kolmogórov-Smirnov. Laboratorio de Biología Molecular en la Región Huancavelica, 2022.	27
Tabla 2. Tendencia del promedio de Rango y suma de Rangos para los Genes ORF1ab y Gen N. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	28
Tabla 3. Análisis comparativo de métodos de extracción: manual y semiautomatizado mediante la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon por Día y Gen. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	29
Tabla 4. Mediana y rango de los genes ORF1ab y el Gen N en la región. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del virión.	9
Figura 2. Genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva del SARS-CoV-2.	9
Figura 3. Entrada de SARS-CoV-2 a la célula del hospedero.	11
Figura 4. Extracción de ácidos nucleicos por el método de extracción por columnas de sílice y perlas magnéticas.	15
Figura 5. Comparación mediante diagrama de cajas agrupado por el gen ORF1ab, según número de días y métodos. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	31
Figura 6. Comparación mediante diagrama de cajas agrupado por el gen N según, número de días y método. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	32

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Carta de autorización del CIEI DIRESA en la región Huancavelica, 2022.	51
Anexo 2. Selección de las muestras de la Viroteca. Laboratorio de Biología Molecular de la región Huancavelica, 2022.	52
Anexo 3. Descongelamiento de las muestras con CT alto, medio y bajo, con contenido suficiente (1,600 ml). Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	53
Anexo 4. Área de extracción manual. Laboratorio Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	54
Anexo 5. Área de extracción semiautomatizada. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	55
Anexo 6. Área limpia para la siembra de muestras. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	56
Anexo 7. Área de amplificación y lectura en RT-PCR. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	57
Anexo 8. Lectura de las curvas de los CT del día 0. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	58
Anexo 9. Lectura de las curvas de los CT del día 5. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	59
Anexo 10. Lectura de las curvas de los CT del día 10. Laboratorio de Biología Molecular en la región Huancavelica, 2022.	60
Anexo 11. Lectura de las curvas de los CT del día 15. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	61
Anexo 12. Selección de muestra positivas de acuerdo a la carga viral (bajos, medios y altos). Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	62
Anexo 13. Temple de trabajo para la PRE RT-PCR. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	63
Anexo 14. Preparación de los Reactivos Was A y Was B para la extracción manual. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	64

Anexo 15. Contenido de la placa para la extracción semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	65
Anexo 16. Pasos para la amplificación por RT-PCR del kit Lifotronic. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	66
Anexo 17. Cuantificación del Gen N para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método manual. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	67
Anexo 18. Cuantificación del Gen ORF1ab para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método manual. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	68
Anexo 19. Cuantificación del Gen N para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	69
Anexo 20. Cuantificación del Gen ORF1ab para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.	70
Anexo 21. Matriz de consistencia.	71

RESUMEN

El diagnóstico oportuno y preciso de la infección del SARS-CoV-2 es un factor determinante en las medidas de contención y propagación de la COVID-19. La detección del ARN viral en muestras clínicas es una estrategia primordial en este proceso; no obstante, la estabilidad del material genético viral en diversas condiciones de almacenamiento y transporte puede afectar significativamente los resultados. Con el objetivo de comparar dos métodos de extracción: manual y semiautomatizado, se utilizaron muestras positivas a SARS-CoV-2 expuestas a temperatura ambiente durante diferentes periodos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días respectivamente), procedentes de la región Huancavelica durante el periodo de marzo - abril del 2022. Se seleccionaron 30 muestras positivas a SARS-CoV-2, las cuales se agruparon según su carga viral en tres grupos: Ct alto ($> 30,10$), Ct medio ($18,83 - 30,10$) y Ct bajo ($< 18,83$). Estos grupos se emplearon para analizar los genes ORF1ab y N mediante la U de Mann Whitney y cajas y bigotes. Las muestras fueron extraídas y purificadas de forma paralela mediante la extracción manual "Mole Bioscience" y de manera semiautomatizada "Lifotronic", posteriormente se realizaron las amplificaciones mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados indicaron diferencias significativas para el día inicial con valores ($p < 0,05$); sin embargo, a partir del quinto día no mostró diferencia significativa ($p > 0,05$) para el gen ORF1ab y N. En conclusión, la extracción semiautomatizada es la más adecuada para el día inicial de extracción. Sin embargo, para muestras con mayor tiempo de exposición a temperatura ambiente a partir del quinto día, ambos métodos evidenciaron ser eficientes en la detección del SARS-CoV-2 sin diferenciación.

Palabras clave: Ct, carga viral, RT-PCR, extracción manual, extracción semiautomatizada.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del COVID-19, causada por el agente SARS-CoV-2, surgió el 2019 en Wuhan, China y fue declarada en el 2020 como una pandemia mundial, debido a su alta capacidad de transmisión (Britto et al., 2021). En la actualidad, uno de los principales desafíos es garantizar un diagnóstico correcto y oportuno para contener la infección. Por tanto, la prueba molecular empleada para reconocer los genes específicos del SARS-CoV-2, es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR), considerada la Gold estándar para muestras recolectadas mediante hisopados del tracto respiratorio superior (nasofaríngeo y orofaríngeo). (Dabanch, 2021). La CDC (Centro de Control y prevención de Enfermedades en EE. UU) prioriza el transporte adecuado de las muestras para mantener la viabilidad del genoma viral. Se enfatiza el uso de un medio de transporte viral (UTM) y puntualiza procesar las muestras en un plazo de 72 horas. Además, es necesario conservar las muestras entre 2 - 8°C, y aquellas que se procesarán después de las 72 horas deben mantenerse a -70°C (Aguilar et al., 2020).

En la región Huancavelica, persiste un desafío en el traslado y conservación de las muestras biológicas por temas logísticos y geográficos de la región, donde un porcentaje de las mismas experimentan demoras en la entrega al laboratorio de procesamiento. Una preocupación en el proceso de diagnóstico es evitar la exposición del genoma del coronavirus a ARNasas presentes en el ambiente y también en las manos, esto puede reducir la eficiencia en la extracción del genoma viral y a resultados deficientes durante la amplificación exponencial, dando lugar a resultados falsos negativos (Lopez et al., 2020). El Área de Biología Molecular del Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública - Huancavelica, emplea dos métodos de extracción de ARN viral: la extracción por columnas de sílice (método manual) y la de perlas magnéticas (método semiautomatizado) (Perret

et al., 2022). Estos métodos son primordiales para obtener resultados confiables en muestras heterogéneas, considerando factores que influyen en el proceso de diagnóstico, toma de muestra, cadena de frío, rotulación, almacenamiento, transporte, temperatura ambiental.(Pan et al., 2020).

La presente investigación se centró en la evaluación comparativa de dos métodos utilizados para la extracción del ARN viral del SARS-CoV-2. El propósito fue determinar cuál de ellos es más eficaz en el rescate del genoma viral en muestras positivas a SARS-CoV-2 expuestas a temperatura ambiente durante distintos periodos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días) aparentando la llegada de muestras heterogéneas con días de retraso y conservadas inadecuadamente. Para alcanzar este objetivo, se llevaron a cabo ensayos de la técnica de RT-PCR en tiempo real, y se analizaron los valores de Ct en los genes ORF1ab y N. En base a lo expuesto, se plantearon los siguientes objetivos de investigación:

Objetivo general

Comparar dos métodos de extracción de ARN viral para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en muestras positivas, considerando diferentes períodos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días) y expuestas a temperatura ambiente.

Objetivos específicos

1. Evaluar la eficacia de la extracción manual en muestras positivas expuestas a temperatura ambiente durante 0, 5, 10 y 15 días.
2. Evaluar la eficacia de la extracción semiautomatizada para muestras positivas expuestas a temperatura ambiente durante 0, 5, 10 y 15 días.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Internacionales

Vásquez et al., (2021) investigaron técnicas y procedimientos para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR con el propósito de mejorar las estrategias de diagnóstico molecular. Para ello, utilizaron dos métodos principales de extracción de ARN viral: la extracción por columnas de sílice (manual) y la aplicación de partículas magnéticas (automatizado). Ambos procedimientos demostraron una sensibilidad y especificidad del 100%, siendo igualmente efectivos y confiables, detectando al menos una copia del ARN viral por microlitro. Así, establecieron que la extracción manual y la extracción automatizada son apropiadas para el diagnóstico del virus, respaldando su uso en el diagnóstico molecular de la infección.

Pan et al., (2020) examinaron los efectos de la inactivación térmica del ARN viral en resultados cuantitativos de la RT-PCR del SARS-CoV-2, en relación con falsos negativos en muestras con carga viral baja. Determinaron que aproximadamente la mitad de las muestras positivas que analizaron con Ct bajo (7 de 15 muestras, 46,7%) tuvieron resultados negativos después de someterse a inactivación térmica. Por otro lado, utilizaron una técnica de lisis basada en guanidinio para la conservación de muestras, resultando cantidades menores de falsos negativos (2 de 15 muestras, 13,3%) y un aumento significativamente menor en los valores de Ct en comparación con la inactivación térmica. Así, afirmaron que la inactivación térmica afecta negativamente la eficiencia de la prueba de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2.

Kucirka et al., (2020) plantearon como objetivo estimar la tasa de falsos negativos según los días transcurridos desde la infección. Para ello, analizaron 7 estudios sobre el rendimiento de la RT-PCR desde el inicio de los síntomas al SARS-CoV-

2, utilizando muestras del tracto respiratorio superior (n= 1330). Así, reportaron que la probabilidad de obtener un resultado falso negativo en una persona infectada disminuyó al 100 % para el día 1 y hasta el 67 % para el día 4 antes de la presencia de los síntomas. En el día inicial de los síntomas, la tasa de falsos negativos fue de 38 %, y luego disminuyó al 20 % en el día 8. Sin embargo, a partir del día 9, la tasa de falsos negativos comenzó a aumentar nuevamente, alcanzando un 66 % el día 21. Finalmente, recomendaron una adecuada interpretación de los resultados de RT-PCR en etapas tempranas de la infección, considerando el contexto clínico y epidemiológico.

Ulloa et al., (2020) realizaron un estudio comparativo entre dos métodos de extracción de ARN viral: el método automatizado NucliSENS easyMag® (BioMérieux) y el método manual de precipitación con PEG/NaCl, donde analizaron 94 muestras positivas con un rango de valores de Ct de 12,79 a 39,12, y 10 muestras negativas de hisopado nasofaríngeo. El método manual demostró una sensibilidad y especificidad del 100% en la detección del ARN viral del SARS-CoV-2. Además, encontraron diferencias significativas en los valores de Ct entre el método PEG/NaCl y el easyMAG® para los genes Orf1ab y N (prueba de Wilcoxon, $P < 0,0001$), determinando que el método manual puede ser eficiente en ciertos casos. En conclusión, demostraron que el método de extracción PEG/NaCl tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección del ARN viral del SARS-CoV-2 en las muestras analizadas.

Montalvo et al., (2023) evaluaron dos medios de transporte viral: medio de transporte universal (BTU) y el medio de transporte de ácidos nucleicos (TAN), para el diagnóstico mediante RT-PCR del SARS-CoV-2. Los medios fueron analizados utilizando muestras de exudado nasofaríngeo (ENF) recolectadas y comparadas con un medio de referencia viral (BTV). Los resultados revelaron una concordancia en las muestras recolectadas en el medio TAN, mientras que el medio BTU mostraron una relación moderada. La estabilidad de los especímenes fue del 100 % a las 48 horas para ambos medios, reduciendo a 85,71 % para el medio BTU a las 72 horas. En el caso del medio TAN, la estabilidad lo conservaron hasta las 168 horas (100 %). No observaron discrepancias significativas en los valores de Ct (umbral de ciclo) entre los medios evaluados y el medio de referencia BTV. Determinaron que ambos medios de transporte son adecuados para la detección del SARS-CoV-2 por RT-PCR, siendo comparables con el medio de BTV.

Chu et al., (2020) Desarrollaron dos ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real de un solo paso para detectar dos regiones distintas (ORF1b y N) del genoma del nuevo coronavirus 2019-nCoV, con diseño de cebadores y sondas específicos para este virus y sus variantes cercanas, como el coronavirus del SARS. La evaluación de los ensayos con controles positivos y negativos, así como con muestras respiratorias de pacientes infectados, mostró un rango dinámico amplio y límites de detección por debajo de las 10 copias por reacción. Todos los controles negativos resultaron negativos, mientras que las muestras de pacientes con 2019-nCoV fueron positivas. Los ensayos desarrollados permiten la rápida detección del 2019-nCoV en muestras humanas, facilitando la identificación temprana de pacientes.

Goldschmidt (2020) Estudio los desafíos que pueden generar resultados falsos durante la detección del genoma del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Los falsos negativos pueden estar relacionados con la toma de muestra, el almacenamiento y la descongelación de las muestras, así como la inactivación térmica de la virulencia. Los caracteres retardados de controles internos pueden invalidar la negatividad, y muestras con poco material biológico pueden conducir a falsos negativos. Estableció un umbral mínimo de células epiteliales que puedan ayudar a reducir estos errores. Aunque la totalidad de los kits detectan ADN humano, no están graduados para medir la carga celular. La presencia de ácidos ribonucleicos nucleares (ARN) virales en superficies como guantes y tubos puede resultar en falsos positivos. Se sugiere controlar la contaminación en series de 100 muestras.

2.1.2. Nacionales

Torres (2021) realizó la optimización del control de calidad interno de RT-PCR la detección de SARSCoV-2 utilizando valores de Ct en tres tipos de controles: control negativo de alicuotado, control negativo de extracción y control positivo. Los resultados mostraron desviaciones estándar de 1,37; 1,98 y 0,94 para los tres tipos de controles. Además, los índices de capacidad real de proceso (Cpk) fueron de 1,55; 1,35 y 4,26, demostrando la aceptación del lote de valores de Ct y un Cpk mayor a 1,33 para los controles del estudio. Como resultado, destaco que la optimización del control interno de calidad se asoció con una mayor confiabilidad en los resultados de los pacientes y una reducción en los falsos positivos y falsos negativos.

Quiroz et al., (2022) realizaron una correlación entre el valor de Ct y la clasificación clínica de la COVID-19 mediante la RT-PCR orientado al gen N, donde incluyeron

un total de 718 casos, de los cuales el 77,7 % (558) fueron clasificados como casos leves, el 21,3 % (153) como casos moderados y el 1 % (7) como casos graves. Los valores de Ct se dividieron en tres niveles: Ct alto ($> 30,10$), Ct medio ($> 18,83 - 30,10$) y Ct bajo ($\leq 18,83$). Así, reportaron una correlación significativa pero débil entre el valor de Ct y la clasificación clínica ($p = 0,002$; rho de Spearman = $-0,117$). Ciertas características, como el sexo, la edad $<$ a 65 años, la presencia de fiebre, escalofríos, diarrea, anosmia y sobrepeso-obesidad, existieron asociación al valor de Ct. Es decir, que al menor valor de Ct se estima una mayor gravedad de la COVID-19; sin embargo, debido a la correlación débil, su utilidad como predictor de gravedad es limitada. En conclusión, otros factores clínicos y epidemiológicos afectan la evaluación completa y precisa del estado clínico de los pacientes con COVID-19.

Juárez & David, (2021) realizaron un estudio para evaluar la carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes confirmados por RT-PCR en dos distritos de la Región San Martín: Juanjuí y Tocache, durante los meses de mayo a setiembre del 2020. Para ello, analizaron la asociación de los valores de Ct obtenidos por RT-PCR, buscando identificar diferencias significativas entre ambas poblaciones, así como las frecuencias según grupo etario y sexo. En total, incluyeron 195 casos confirmados, 133 pertenecientes a Juanjuí y 62 a Tocache. Encontraron diferencias significativas en los valores de Ct entre ambos distritos, con un promedio de Ct más bajo en Juanjuí (23,52) en comparación con Tocache (27,85). Además, observaron que el sexo femenino fue más afectado en las dos poblaciones y el grupo etario de 31 - 50 años tuvieron la mayor cantidad de casos confirmados. Para ello, realizaron un análisis estadístico mostrando que todas las diferencias en los valores de Ct fueron significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, la correlación entre la carga viral y la clasificación clínica fue débil, limitando el valor predictivo del valor de Ct para la gravedad de la enfermedad. Así, destacaron la importancia de considerar otros factores clínicos y epidemiológicos en la evaluación del estado clínico de los pacientes con COVID-19.

Pampa & Quispe, (2022) investigaron el comportamiento de la epidemia de SARS-CoV-2 en la población de médicos en la Región La Libertad, teniendo en cuenta la relación de los valores de Ct obtenidos en pruebas RT-PCR. Evaluaron una población de 108 médicos diagnosticados con COVID-19 mediante pruebas RT-PCR, de un total de 366 médicos afectados en la región. Por otro lado, identificaron las comorbilidades frecuentes entre los médicos afectados, destacando la

obesidad, enfermedad cardiovascular y asma. Algunos médicos recibieron oxígeno suplementario y ventilación mecánica. Sus principales síntomas observados fueron tos y dolor de garganta, y un porcentaje presentaron un cuadro clínico severo. Sin embargo, entre los casos de médicos fallecidos, ninguno mostró un valor de Ct alto. En ese sentido, analizaron una relación entre los valores de Ct y el comportamiento de la infección en estos médicos, determinando que los valores de Ct en pruebas RT-PCR tienen implicaciones en el comportamiento de la infección por SARS-CoV-2 en médicos de la región La Libertad, teniendo en cuenta las diferencias de la presentación clínica y la gravedad de la enfermedad entre los médicos con distintos valores de Ct.

Miñano, (2022) realizó un estudio mediante la técnica de RT-PCR por el método semiautomatizado de perlas magnéticas para detectar la infección de COVID-19. Para ello, empleó muestras de hisopados nasofaríngeas y orofaríngeo, preservándolas en tubos de medio viral (MTV), luego extrajo y purificó el material viral utilizando el método de perlas magnéticas con un equipo de extracción Opentrons. Posteriormente, para la detección del genoma del virus, empleó un kit de amplificación con alta sensibilidad y especificidad, garantizando resultados confiables. Realizó el diagnóstico en 4 a 6 horas y estableció procedimientos estandarizados para asegurar la trazabilidad en todas las etapas del proceso, aquello contribuyó a obtener resultados válidos y reducir posibles errores o contaminantes. Concluyó que la RT-PCR por el método semiautomatizado de Perlas Magnéticas demostró ser una técnica confiable y eficiente para detectar la infección por COVID-19.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Taxonomía del SARS-CoV-2

Superreino	: Riboviria
Orden	: Nidovirales
Suborden	: Coronidovirineae
Familia	: Coronaviridae
Subfamilia	: Orthocoronavirinae
Género	: Betacoronavirus
Subgénero	: Sarbecovirus
Especie	: <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus SARS-CoV, SARS-CoV-2.</i>

Fuente: Gorbalenya et al., 2020)

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus estableció el Superreino Riboviria, donde agrupan a los coronavirus cuyo genoma son de ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva; es decir, secuencias de bases similares al ARN mensajero. Estos virus utilizan una enzima existente llamada ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que es capaz de utilizar el ARN viral como molde para sintetizar nuevas cadenas de ARN complementarias. Ello permite que el virus produzca copias de su genoma de ARN y sintetice ARN mensajero (ARNm) para la producción de proteínas virales. El orden Nidovirales pertenece a este Superreino, englobando 7 Subórdenes, entre ellos el suborden: Coronavirineae con una sola familia: Coronaviridae, y la subfamilia: Orthocoronavirinae, dicha familia se divide genótipicamente y serológicamente en 4 géneros: deltacoronavirus, gammacoronavirus (infectan aves), alfacoronavirus, y betacoronavirus (infectan mamíferos), la última albergando al agente causante de la COVID-19 (Santos & Salas, 2020).

2.2.2. Estructura y morfología viral

El virión se caracteriza por presentar un diámetro de 60 a 140 nm, de forma esférica con picos de aproximadamente de 9 a 12 nm en su membrana, lo cual confiere la característica principal de una corona solar. Está conformado por cuatro estructuras proteicas principales: la glicoproteína espiga (S), la glicoproteína membrana (M), la proteína envoltura no glicosilada (E) y la nucleocápside (N). Además, presenta proteínas accesorias como la proteína hemaglutinina esterasa (HE), proteína 3, proteína 7a, entre otras (Vargas et al., 2020).

Estas proteínas estructurales presentan diferentes funciones principales.

1. La glicoproteína espícula (S) tiene forma de espícula que favorece la unión y entrada del virión a la célula huésped receptora.
2. La glicoproteína membrana (M) mantiene la curvatura de la membrana del virión y el ensamblaje con la nucleocápside.
3. La proteína envoltura (E) realiza la función fundamental en el ensamblaje y la descarga del virión.
4. La proteína nucleocápside (N) conforma parte de la nucleocápside helicoidal al unificar el material genético viral.
5. La proteína accesoria (HE) se estima en algunos Betacoronavirus y su actividad de esterasa facilita la entrada del virus en la célula huésped (Pastrian, 2020).

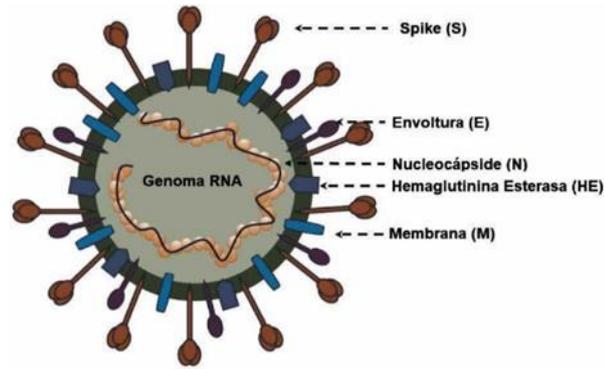


Figura 1. Estructura del virión

Fuente: Ruiz & Jiménez, 2020.

2.2.3. Estructura genética

El genoma del SAR-CoV-2 presenta un ARN monocatenario de polaridad positiva (+ssARN) de aproximadamente 30,000 pares de bases, asemejándose estructuralmente al ARN de una célula eucariota. Contiene una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3' y un capuchón metilado (cap) en el extremo 5'. Los ORF son idénticos a otros coronavirus y varios genes adicionales (Ezpeleta & Azorín, 2020).

El genoma del SARS-CoV-2 está organizado de la siguiente manera:

- Dos tercios del ARN viral, ubicados en el extremo 5', codifican para dos marcos abiertos de lectura (ORF1a y ORF1b). Estos ORF son traducidos en dos poliproteínas de gran tamaño llamadas pp1a y pp1ab.
- Las poliproteínas pp1a y pp1ab son procesadas proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps). Estas proteínas no estructurales desempeñan un papel crucial en la replicación del genoma viral del SARS-CoV-2 como también en la transcripción del RNAm subgenómicos (sgRNAs).
- El último tercio del genoma viral, más cercano al extremo 3', codifica los genes de las cuatro proteínas estructurales principales: glicoproteína S (spike), glicoproteína M (membrana), proteína E (envoltura) y proteína N (nucleocápside). También codifica los genes de las proteínas accesorias, como la proteína HE, 3 y 7a, entre otras (Lam et al., 2021).

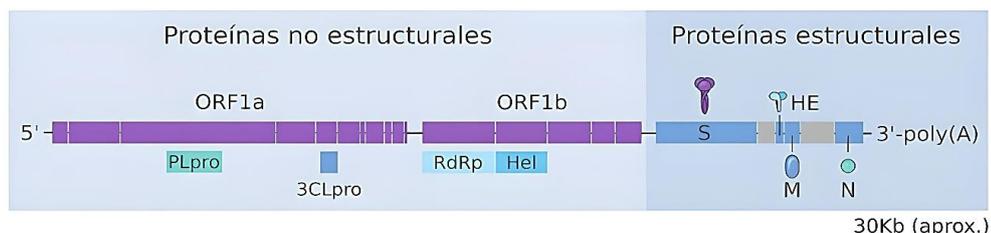


Figura 2. Genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva del SARS-CoV-2.

Fuente: (Pastrian, 2020).

2.2.4. Ciclo infeccioso del SARS-CoV-2

Inicia con la identificación del virión a un receptor en la superficie de la célula huésped, denominado enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). En este proceso, la glicoproteína espiga (S) presente en la superficie del virus es responsable de su identificación. Una vez formado el complejo resultante de la unión de la glicoproteína espiga y el receptor ECA2, se desencadena un proceso proteolítico conducido por la proteasa transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), esta es responsable de la división de glicoproteína espiga. La subunidad S1 contiene un dominio de unión (RBD), encargada de la interacción con el receptor ACE2 de la célula hospedera, y la subunidad S2 contiene el péptido para la fusión a la membrana celular. Este paso es importante para la entrada a la célula mediante la formación de una endosoma, específicamente a los neumocitos y enterocitos. (Dabanch, 2021).

Posteriormente, el ARN viral es liberado en el citoplasma de la célula hospedera, para iniciar la traducción en el ribosoma de las poliproteínas 1a y 1ab, y estas son procesadas proteolíticamente para formar las proteínas no estructurales que participan en la replicación del genoma viral y en la transcripción de los ARNs subgenómicos; a medida que se forman las glicoproteínas de envoltura, estas se implantan en el retículo endoplasmático rugoso o en el sistema membranoso del aparato de Golgi. Al mismo tiempo, el ARNm y las proteínas de nucleocápside se ensamblan para dar lugar a la formación de viriones. Los viriones se localizan en el espacio intermedio entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático y luego son transportados a través de vesículas hacia la membrana plasmática. Finalmente, se fusionan con la membrana celular, resultando en la liberación de viriones completamente constituidos, listos para iniciar un nuevo ciclo de infección en otras células hospederas (Oliva, 2020).

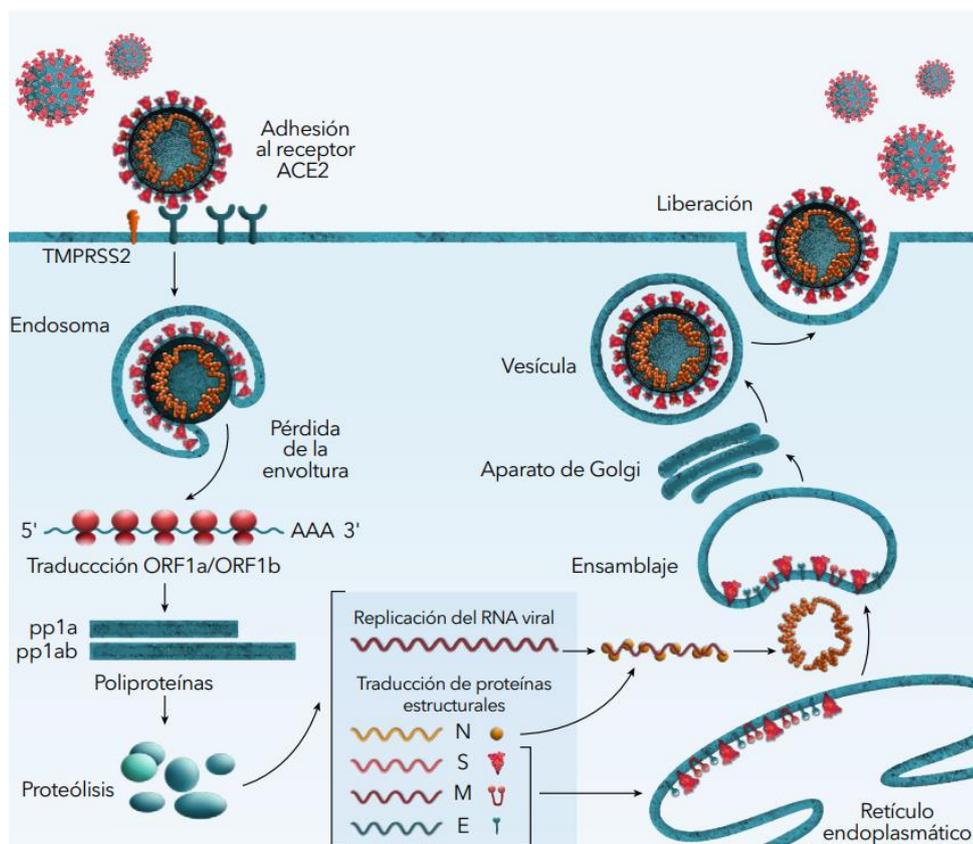


Figura 3. Entrada de SARS-CoV-2 a la célula del hospedero.

Fuente: Peña et al., 2020.

2.2.5. Estructura de la proteína S

En la membrana basal, se encuentra la glicoproteína S de tipo I homo-trimérica, organizada en tres dominios: dominio extracelular (EC), dominio anclaje transmembranal y un dominio tipo cola intracelular (Serrano, 2020). El dominio EC se compone de dos subdominios primordiales para el proceso de unión al receptor celular (S1) y ensamblaje de la membrana (S2). El subdominio S1 muestra dos dominios autónomos: un dominio N-terminal (S1-NTD) y un dominio de unión al receptor (RBD), que cumple un papel clave en los métodos de unión y reconocimiento. Durante el proceso de ensamblaje hospedador-virus, la proteína S se fracciona en el límite de los subdominios S1/S2 por las proteasas de la célula huésped, desprendiendo un péptido de fusión, el cual es indispensable para la entrada del virus (Peña et al., 2020).

2.2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) es un procedimiento molecular que permite amplificar e identificar segmentos del material genético de agentes patógenos (ADN y ARN) de manera

eficiente, altamente sensible y específica. Esta técnica es una variante de la PCR convencional, empleando un paso inicial en el cual un fragmento de ARN es convertido en ADN complementario (ADNc) mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, para ser amplificado siguiendo los pasos de una PCR convencional (Dorado, 2020).

Por otro lado, al desarrollar una RT-PCR en tiempo real, permite seguir el proceso de amplificación del ADN mientras este va realizando la reacción. Cada vez que los fragmentos de ADN producen una nueva copia (amplificación), se emite una señal de fluorescencia gracias a las sondas fluorescentes específicas que emplea la técnica. La señal es identificada por un equipo llamado termociclador y este la traduce en un gráfico generando una “curva de amplificación”, la cual es indicativo que el fragmento de ADN inicial ha sido multiplicado varias veces durante todo el proceso. La prueba molecular permite detectar diferentes tipos de marcadores moleculares claves presentes en el virus, entre ellos están el gen E, N, RdRp y ORF, validados a nivel global por la OMS (Carranza et al., 2020).

a) Transcriptasa reversa

En la técnica de RT-PCR, la enzima transcriptasa reversa cumple un papel fundamental al convertir el ARN viral en ADN complementario (ADNc) antes de la amplificación mediante la PCR en tiempo real. Esta enzima tiene la capacidad de sintetizar una cadena de ADN a partir de una molécula de ARN molde, utilizando un cebador específico y nucleótidos dNTPs (Sandoval et al., 2023).

b) Desnaturalización

El primer paso en la PCR es la desnaturalización del ADNc, donde las hebras se separan a una temperatura de más de 90°C debido a la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno. Esto permite que cada hebra actúe como plantilla para la generación de nuevas hebras complementarias durante los ciclos. Es un paso clave para obtener el ADN en forma de cadena única y listo para la amplificación (Carranza et al., 2020).

c) Hibridación

Es un paso fundamental, que consiste en el emparejamiento y alineación de cebadores y sondas específicos a cada una de las hebras específicas del genoma. Un cebador es un fragmento corto de ADN sintético que se emplea como material de partida para la copia del ADN molde y cuenta con una secuencia determinada de primers (18-24 nucleótidos), que permite unirse a una posición específica del ADN y esto ocurrirá a una temperatura entre 40°C y 60°C (Rodríguez et al., 2021)

d) Extensión

Es la etapa final del proceso de amplificación, la enzima ADN polimerasa, se encarga de sintetizar la nueva hebra complementaria, utiliza el ADN molde como plantilla y el cebador como punto de inicio. Durante este proceso, se utilizan sondas marcadas con fluoróforos, dichas sondas son secuencias de ADN cortas que contienen un fluoróforo y un quencher (apagador) en sus extremos. Cuando la ADN polimerasa incorpora nucleótidos en dirección del extremo 5' a 3', con una temperatura óptima de 72°C, se libera el fluoróforo de la sonda. En la ausencia de un quencher cercano, el fluoróforo emite fluorescencia detectable. Posteriormente, el producto de la amplificación, que es una nueva doble cadena de ADN, puede someterse a un nuevo ciclo de amplificación, comenzando nuevamente con el primer paso de desnaturalización (Tamay de Dios et al., 2013).

2.2.7. El valor del Umbral de ciclos (Ct)

El cycle threshold o umbral de ciclos (Ct), permite cuantificar los ciclos de amplificación necesarios para identificar el punto de encuentro entre la curva de amplificación y la línea del umbral, indicando la presencia del virus en las muestras del tracto respiratorio mediante la RT-PCR, que proporciona información sobre la cantidad relativa. El valor de Ct es inversamente proporcional a la carga viral presente en las muestras. Es decir, un Ct bajo indica que el virus está presente en alta concentración, mientras un Ct alto indica una menor carga viral. La cuantificación del Ct es importante para la interpretación de los resultados en el diagnóstico y seguimiento de la infección, permitiendo evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en pacientes infectados. Además, es relevante para la vigilancia epidemiológica y la toma de decisiones en la salud pública (García et al., 2020).

2.2.8. Técnicas de extracción de ARN viral para detección del SARS-CoV-2

a) Método de purificación por columnas de sílice (manual)

La técnica de extracción de ácidos nucleicos mediante el empleo de columnas de sílice es ampliamente utilizada para obtener ARN viral de diversas muestras. Esta técnica se basa en la alta afinidad de las columnas de sílice hacia los ácidos nucleicos, gracias a las condiciones iónicas adecuadas que se encuentran en los principales kits de extracción comercial de ARN. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) se unen a la fase sólida de sílice, mientras que los restos del material celular y viral lisado se eliminan mediante la centrifugación previa a la purificación. Por otro lado, durante el proceso, se utilizan buffers de lavado para limpiar los ácidos

nucleicos retenidos en la columna. Una vez que el material genético está libre de impurezas, se recupera en un microtubo estéril mediante el uso de un buffer de elución. Es importante destacar que esta extracción permite obtener ácidos nucleicos de alta pureza en comparación con otros métodos de aislamiento de ADN o ARN. Sin embargo, también es sustancial mencionar que el rendimiento obtenido mediante el método de columnas de sílice no suele ser muy alto, lo que puede ser un inconveniente para la sensibilidad de detección de un segmento específico de ADN o ARN mediante una PCR convencional o sus variantes (Cao et al., 2019).

b) Método de purificación por perlas magnéticas (semiautomatizado)

El método semiautomatizado se basa en la extracción y purificación de ácidos nucleicos mediante el uso de perlas magnéticas. Se emplea generalmente para el procesamiento de muestras a gran escala, utilizando un equipo que desarrolla todos los pasos en el procedimiento de extracción (Leon, 2021). Las perlas magnéticas usadas en este tipo de técnica interactúan con los ácidos nucleicos gracias a la acción de un campo magnético (óxido de hierro), y como resultado de dicha interacción, el material genético queda retenido por las perlas magnéticas y el resto celular, como carbohidratos, proteínas y lípidos, son removidos de la solución. Al igual que el método que emplea columnas de sílice, la técnica mediante perlas magnéticas emplea buffers de lavado que permiten limpiar al material genético retenido con las perlas para, finalmente, desactivar el campo magnético y los ácidos nucleicos puedan ser liberados en el buffer de elución. Este tipo de técnica de extracción permite la obtención de un volumen alto de procesamiento de muestras, ya que el personal capacitado se encarga principalmente de colocar correctamente la muestra en la solución de lisis y el equipo semiautomatizado se encarga de subsiguientes pasos en el proceso de extracción. Las perlas magnéticas presentan un tamaño aproximadamente es entre 0,5 y 10 μm , sintetizadas a partir de biopolímeros, vidrio poroso o materiales magnéticos inorgánicos como el óxido de hierro. Son adecuadas por su afinidad con las moléculas de ácidos nucleicos. Las perlas magnéticas utilizadas en el kit de extracción están especialmente revestidas, teniendo una fuerte afinidad por el ácido nucleico de la muestra en determinadas condiciones. Cuando las condiciones cambian, las perlas magnéticas liberan el ácido nucleico adsorbido (Ali et al., 2017).

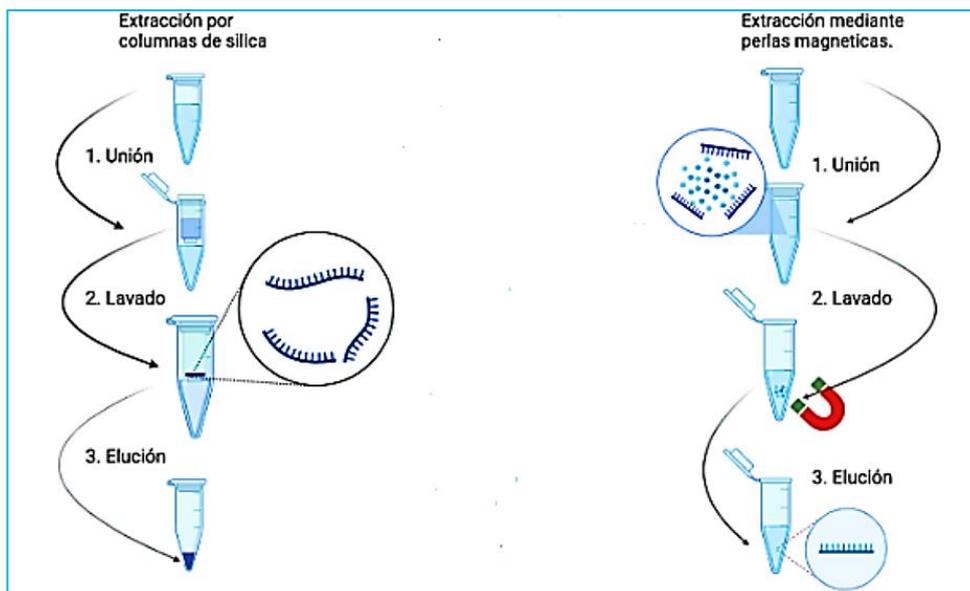


Figura 4. Extracción de ácidos nucleicos por el método de extracción por columnas de sílice y perlas magnéticas.

Fuente: Goldschmidt, 2020.

2.2.9. Obtención, transporte y conservación de muestras para RT-PCR

a) Obtención de muestras

- **Hisopado nasofaríngeo**

El proceso de toma de muestra para detectar el virus implica una serie de pasos cuidadosos. Primero, se inclina suavemente la cabeza del paciente para facilitar el acceso a las fosas nasales. Luego, se introduce un hisopo seco en una de las fosas nasales y se guía hacia atrás, llegando a la nasofaringe. Se detiene allí por unos segundos para asegurar una adecuada recolección del material. Después, se retira el hisopo con movimientos rotatorios, ejerciendo una leve presión contra el tabique nasal para maximizar la recogida de muestras. Este proceso se repite en la otra fosa nasal utilizando el mismo hisopo. Una vez que se han tomado las muestras de ambas narinas, el hisopo se introduce en un tubo que contiene un medio de transporte viral, generalmente 2 - 3 ml. Luego, se rompe el extremo del hisopo y se cierra herméticamente el tubo para evitar la contaminación. Finalmente, es importante rotular correctamente las muestras para asegurar su correcta identificación y posterior procesamiento en el laboratorio. Siguiendo estos pasos meticulosamente, se garantiza una recolección precisa y adecuada de las muestras para el análisis del virus (Morales et al., 2020).

- **Hisopado orofaríngeo**

El procedimiento para tomar una muestra de la faringe posterior consta de varios pasos. En primer lugar, se le pide al paciente que abra la boca y baje la lengua

emitiendo la letra "a" para mantener la faringe cerrada. Luego, se utiliza un hisopo para obtener la muestra de la faringe posterior, impidiendo el contacto con las amígdalas. Posteriormente, el hisopo con la muestra se introduce cuidadosamente en el medio de transporte adecuado, asegurándose de mantener la parte con la muestra dentro del tubo. Por último, se corta y descarta la parte restante del hisopo de manera adecuada para evitar contaminación. Este procedimiento garantiza una toma de muestra precisa y segura, adecuada para el análisis en la detección del SARS-CoV-2 u otras infecciones respiratorias (Pavez et al., 2019).

b) Transporte de muestras

El transporte de las muestras biológicas se realiza en un triple envase refrigerado, que incluye un contenedor principal con tapa de rosca, un contenedor secundario hermético, a prueba de derramamientos con señal de riesgo biológico y un contenedor terciario como una caja de Tecnopor o una hielera con bolsas congelantes. Es importante descontaminar los envases con hipoclorito de sodio al 1% y que el contenedor terciario presente el símbolo de bioseguridad, si la muestra no puede ser trasladada en el tiempo previsto, se debe congelar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservar la integridad del material biológico. El transporte se realiza hasta el posterior análisis en el laboratorio dentro de las 24 horas. La muestra debe ser enviada al laboratorio en un tiempo inferior a 2 horas en un medio de transporte que pueda conservar la muestra a temperatura $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (INS, 2019).

c) Almacenamiento y estabilidad de los medios de transporte viral

El medio de transporte viral (MTV) se compone de soluciones que incluyen sales, proteínas, antibióticos y/o agentes antifúngicos. Estos componentes tienen un beneficio fundamental: aseguran la estabilidad y la esterilidad de las muestras recolectadas hasta la fecha de vencimiento que está impresa en cada envase. Este proceso garantiza la integridad y la calidad óptima de las muestras obtenidas, lo que, a su vez, refuerza la confiabilidad de los resultados en el diagnóstico tanto del SARS-CoV-2 como de otras posibles infecciones respiratorias (INSN-SB, 2020).

2.3. Marco legal ético

El Laboratorio de Biología Molecular de Referencia Regional Huancavelica, en la etapa pre - analítica, se procede a la codificación secuencial de las fichas epidemiológicas y muestras de los pacientes de acuerdo al orden de llegada. Todo el procesamiento de la información de las muestras positivas de la Viroteca se llevó a cabo exclusivamente con el código interno asignado por el tesista, así

manteniendo el anonimato y la confidencialidad de los datos. Esta medida fue necesaria debido a que se manejan datos sensibles protegidos por ley. El plan de tesis fue evaluado y autorizado por el comité de investigación de la DIRESA - HUANCVELICA (Anexo 1), asegurando la protección y privacidad de los datos de acuerdo con la legislación peruana (Ley 25). Se garantiza que no se divulgarán datos sensibles y que la información obtenida se trabajó con riguroso cuidado ético.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio

La presente investigación fue realizada en el Área de Biología Molecular del Laboratorio de Referencia de Salud Pública - Huancavelica, durante los meses de julio - agosto del 2022.

3.1.1. Ubicación política

País : Perú
Región : Huancavelica
Provincia : Huancavelica
Distrito : Santa Ana

3.1.2. Ubicación geográfica

Las instalaciones del Área de Biología Molecular del Laboratorio de Referencia de Salud Pública se encuentran localizadas en las coordenadas: $-12^{\circ} 78,76''S$ y $74^{\circ}96' 65''O$, a una elevación de 3,660 m.s.n.m.

3.2. Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por muestras positivas a SARS-CoV-2, de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo confirmadas previamente por RT-PCR en tiempo real. Estas muestras fueron conservadas a $-30^{\circ} C$ en la Viroteca del Área de Biología Molecular del Laboratorio Referencial de Huancavelica.

3.3. Muestra

Estuvo compuesta por 30 muestras positivas a SARS-CoV-2 de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo, procedentes de las siete provincias de Huancavelica durante los meses marzo - abril del 2022.

3.3.1. Criterios de inclusión

Muestras de hisopados que dieron resultado positivo a la prueba de diagnóstico de COVID-19.

3.3.2. Criterios de exclusión

- Muestras de hisopados que dieron resultado negativo a la prueba de diagnóstico de COVID-19.
- Muestras cuyas codificaciones internas no garantizaron la privacidad y confiabilidad de los pacientes.

3.4. Sistema de muestreo

Muestreo no probabilístico – por conveniencia, ya que las muestras positivas a SARS-CoV-2 fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad en el momento de la investigación debido a las restricciones de tiempo y recursos, agrupándolos en 3 grupos (CT, alto, medio y bajo). (González, 2020).

3.5. Metodología y recolección de datos

3.5.1. Métodos y procedimiento

La investigación siguió el protocolo de la Resolución Ministerial N°004-2021-J-OPE/INS, específicamente el Documento técnico que detalla la DIRECTIVA QUE ESTABLECE DISPOSICIONES PARA LA CONSTATAción Y VERIFICACIÓN DE LOS LABORATORIOS PÚBLICOS Y PRIVADOS PARA REALIZAR LA DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS SARS-CoV-2.

La ejecución del trabajo contó con la autorización del Comité de Ética Institucional DIRESA-HUANCAVELICA (Anexo 1).

3.5.2. Selección de muestras

- Se seleccionaron aleatoriamente 30 muestras positivas a SARS-CoV2, previamente alícuotas de 1,8 ml y preservadas a - 30°C (Anexo 2).
- Las muestras positivas se agruparon en tres grupos: Ct alto (>30,10) Ct medio (18,83 - 30,10) y Ct bajo (<18,83) (Anexo 12)
- Se utilizó dos controles blanco de extracción tanto para el método manual y el semiautomatizado.

3.5.3. Preparación de Buffer para la extracción manual

- Se utilizó alcohol absoluto.
- Se añadieron 13 ml de alcohol absoluto al Buffer A (6,5 ml).
- Se añadieron 38 ml de alcohol absoluto al Buffer B (18 ml) (Anexo 14).

3.5.4. Extracción del ARN manual Marca kit MOLE BIOSCIENCE

- Se realizó la limpieza y desinfección de las superficies de la cabina de extracción con alcohol etílico de 70%.
- Se añadió 200 µl de buffer lisis en los tubos Eppendorfs junto con 200 µl de muestra positiva.

- Se homogenizo con agitador de tubos por 15 segundos y luego se centrifugó a 2000 rpm por 30 segundos.
- Se incubó durante 5 minutos.
- Se traspasó el volumen total de 400 µl a la columna de extracción, la cual se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos.
- El exceso se eliminó invirtiendo el tubo colector sobre una hoja limpia de papel absorbente.
- Primer lavado: se añadió 500 µl de buffer de lavado A sobre la columna de extracción y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos.
- El exceso de etanol se eliminó mediante la inversión del tubo colector sobre una hoja limpia de papel absorbente.
- Se descartó y reutilizó los tubos de colectores.
- Segundo lavado: se añadió 450 µl de buffer de lavado B sobre la columna de extracción y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos.
- El exceso de etanol se eliminó invirtiendo el tubo colector sobre una hoja limpia de papel absorbente.
- Se descartó y se reutilizó los tubos colectores.
- Tercer lavado: se repitió el paso del segundo lavado.
- Se traspasó la columna de extracción a un tubo Eppendorfs de 1.5 ml, añadió 60 µl de Buffer de Elusión en el centro de la columna.
- Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 12,000 por 2 minutos.
- El genoma viral extraído se conservó de 2 - 8°C (Anexo 14).

3.5.5. Extracción del ARN semiautomatizado kit LIFOTRONIC

- Se realizó la limpieza y desinfección de las superficies de la cabina de extracción con alcohol etílico de 70%.
- Se dispuso 2 placas de 96 pozos, cada uno con procesamiento de 16 muestras.
- Se dispuso 2 protectores para los separadores magnéticos.
- Se etiquetaron 2 placas de 16 pocillos de la siguiente manera: Placa 1 (15 muestras positivas + 1 control blanco) y Placa 2 (15 muestras positivas + 1 control blanco).
- Se retiró el papel aluminio adherente que cubre la placa.
- Se añadió 200 µl de muestra en orden A1 a H1 y de A7 a H7.
- Se colocó un set de peines de punta Lifotronic en una microplaca.

- Se llevaron las dos placas al equipo extractor semiautomatizado de ácidos nucleicos durante 23 minutos (Anexo 15).

3.5.6. Amplificación mediante de la RT-PCR en tiempo real, kit LIFOTRONIC

- Se realizó la limpieza y desinfección de las superficies de la cabina de extracción con alcohol etílico de 70%.
- Las muestras se mantuvieron sobre hielo y se taparon para evitar la exposición directa a la luz.
- Todos los reactivos para la PCR fueron descongelados y homogenizados.
- Se calcularon las cantidades para el Master Mix considerando 30 muestras, 4 controles de extracción (manual y semiautomatizado) y 3 controles de amplificación (C.P, C.N y NTC) (Anexo 13).
- Se rotuló un vial de 1,5 ml para preparar la mezcla reacción y se añadió las cantidades previamente calculadas y homogenizar suavemente en un spin.
- Se taparon los tubos y trasladados al área de siembra protegidos de la luz y en cadena de frío.
- Se repartió 20 µl de la mezcla de reacción (Master Mix y solución de reacción).
- Se mezcló suavemente el ARN extraído y se agregaron 20 µl a la placa de extracción (columna 6 y 12) a la placa strips de amplificación.
- Se uso los pocillos para las muestras y controles de contaminación.
- Se agregó 20 µl del control negativo (C.N).
- Se agregó 20 µl del control positivo (C.P).
- Los tubos se centrifugaron para eliminar burbujas que puedan interferir con la lectura de la fluorescencia y asegurar que la solución quedara en el fondo de los tubos.
- Se sello firmemente los strips y se cubrió de la luz.
- Se transportó los strips al área de amplificación.
- Se colocó los strips con ARN al termociclador y se programó (Anexo 16).
- Se realizó la lectura del umbral exponencial de los Ct: canal fluorescente: FAM para el gen ORF1ab, VIC para el gen N, CY5 para el gen de control interno.

3.6. Tipo de investigación

Tipo comparativo, ya que la presente investigación tiene como propósito comparar dos métodos de extracción de ARN viral para analizar y establecer las diferencias entre los mismos. Para lograr una correcta comparación, se describirán en detalle las características de cada método al inicio y final del estudio (Goodrick, 2014).

3.7. Diseño de investigación

Cuasi experimental, ya que las muestras no cumplieron una distribución de forma aleatoria entre las situaciones de tratamiento, y los grupos de comparación se crearon por medios estadísticos mediante un muestreo no probabilístico (por conveniencia). Esto difiere del experimento controlado (clásico) en el cual el tratamiento se distribuye de manera aleatoria entre los grupos de estudio (Ramos, 2021).

3.8. Análisis estadístico

Para el análisis de la información obtenida, se manejó el software estadístico SPSS versión 27 y Microsoft Excel 2019, que facilitó el procesamiento de los resultados. Se empleó el test de normalidad de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos conseguidos de la variable Ct. Posteriormente, se realizaron pruebas de hipótesis para comparar medias, como U de Mann-Whitney y Cajas y Bigotes, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los valores de Ct de las dos extracciones de ARN viral.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Muestras positivas totales en diferentes periodos de tiempo: 0, 5, 10 y 15 por la Prueba de Kolmogórov-Smirnov. Laboratorio de Biología Molecular en la Región Huancavelica, 2022

Días Genes N			0		5		10		15	
			ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N
			60	60	60	59	57	58	54	57
Parámetros	Media		23,755	22,700	25,551	24,492	25,914	25,049	26,1617	25,3804
normales ^{a, b}	Desv. Desviación		6,4971	6,6677	6,9546	7,0156	6,9670	7,3321	6,4015	6,9206
Máximas	Absoluta		,152	,140	,164	,146	,148	,141	,138	,133
diferencias	Positivo		,152	,140	,164	,146	,148	,141	,138	,133
extremas	Negativo		-,077	-,065	-,084	-,111	-,083	-,091	-,076	-,090
Estadístico de prueba			,152	,140	,164	,146	,148	,141	,138	,133
Sig. asin. (bilateral) ^c			,001	,005	<,001	,004	,003	,006	,012	,013
Sig. Monte Carlo	Sig.		,002	,006	<,001	,004	,003	,005	,011	,013
(bilateral) ^d	Intervalo de	Límite inferior	,001	,004	,000	,002	,002	,003	,008	,010
	confianza al 99%	Límite superior	,003	,008	,001	,005	,005	,007	,014	,015

Resultados de la prueba estadística Kolmogórov-Smirnov, utilizada para analizar la distribución normal de los valores de Ct. Los datos obtenidos no siguen una distribución normal, los valores son inferiores ($p < 0,05$), decidiendo emplear pruebas no paramétricas.

N: tamaño de muestras

Sig. asin. (bilateral)^c: Nivel de significancia (p-valor)

Tabla 2. Tendencia del promedio de Rango y suma de Rangos para los Genes ORF1ab y Gen N. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Días	Rangos												
	0			5			10			15			
	N	Rango \bar{X}	Σ de rangos	N	Rango \bar{X}	Σ de rangos	N	Rango \bar{X}	Σ de rangos	N	Rango \bar{X}	Σ de rangos	
Gen_ORF1a	1	30	36,07	1082,0	30	34,17	1025,0	28	32,32	905,00	26	30,65	797,00
	2	30	24,93	748,00	30	26,83	805,00	29	25,79	748,00	28	24,57	688,00
	Total	60			60			57			54		
Gen_N	1	30	35,93	1078,00	29	34,16	990,50	28	32,75	917,00	27	31,37	847,00
	2	30	25,07	752,00	30	25,98	779,50	30	26,47	794,00	30	26,87	806,00
	Total	60			59			58			57		

a. Variable de agrupación:

Método:

1: Manual

2: Semiautomatizado

N: tamaño de muestras

Promedio de rangos y sumas de rangos para los genes ORF1ab y N en distintos días. Estos valores proporcionan una visión general de las variaciones entre los métodos de extracción en los intervalos de días.

Tabla 3. Análisis comparativo de métodos de extracción: manual y semiautomatizado mediante la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon por Día y Gen. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Días Gen	Estadísticos de prueba ^a							
	0		5		10		15	
	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N
U de Mann-Whitney	283,00	287,000	340,00	314,500	313,000	429,000	282,00	341,00
W de Wilcoxon	748,00	752,00	805,00	779,500	748,000	794,000	688,00	806,000
Z	-2,469	-2,410	-1,626	-1,827	-1,485	-1,416	-1,420	-1,023
Sig. asin.(bilateral)	,014	,016	,104	,064	,138	,157	,156	,306

Sig. asin. (bilateral): Nivel de significancia (p-valor)

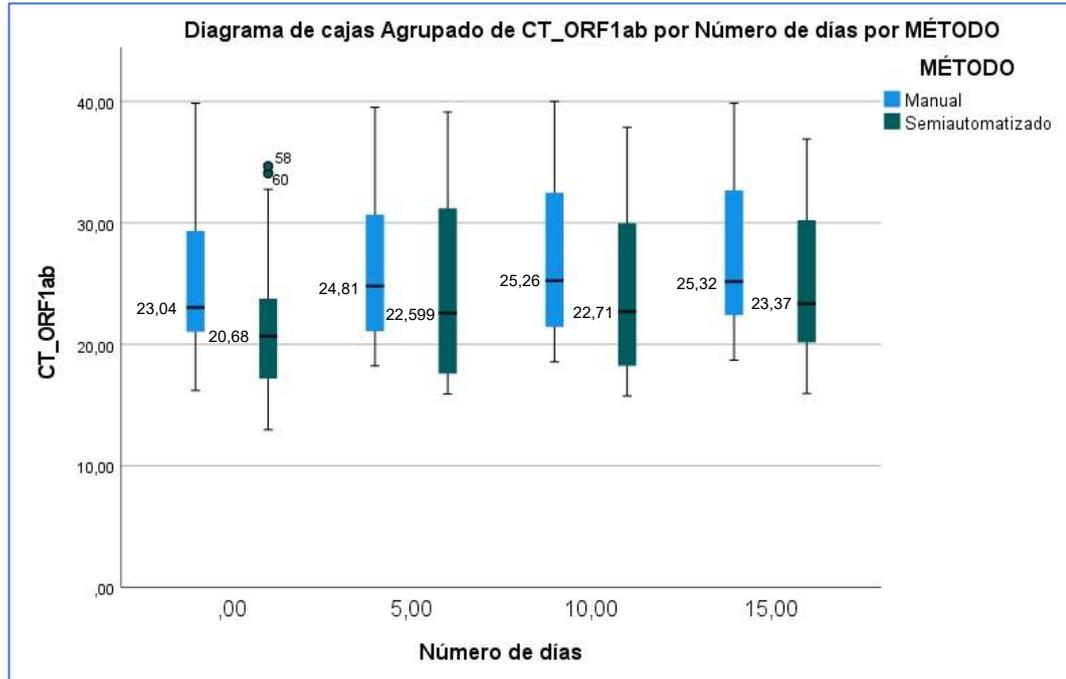
Resultados de la prueba estadística realizada en intervalos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días) para los genes ORF1ab y N, evaluando las diferencias entre los métodos de extracción. Los estadísticos U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon revelan las discrepancias entre los grupos, la significancia que indica la relevancia estadística de las diferencias observadas.

Tabla 4. Mediana y rango de los genes ORF1ab y el Gen N en la región. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Genes				Gen ORF1ab		Gen N	
				Mediana	Rango	Mediana	Rango
Número de días	0	Método	Manual	23,04	23,64	22,85	24,17
			Semiautomatizado	20,68	21,97	19,96	22,38
	5	Método	Manual	24,81	21,63	24,21	21,76
			Semiautomatizado	22,59	23,21	21,70	22,29
	10	Método	Manual	25,26	21,44	24,25	22,64
			Semiautomatizado	22,71	22,64	21,83	23,63
	15	Método	Manual	25,32	21,45	24,92	22,33
			Semiautomatizado	23,37	20,85	22,05	23,02

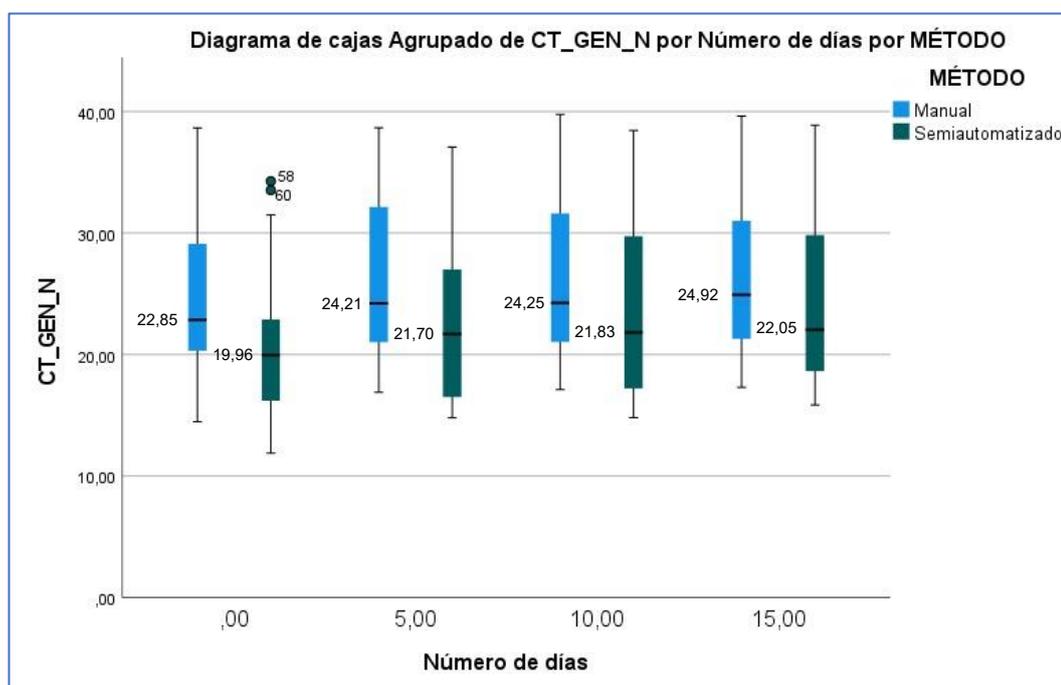
Comparación de las medianas y rangos para el gen ORF1ab y N en distintos días, utilizando los métodos manual y semiautomatizado. Proporciona una perspectiva sobre cómo estos valores varían en función de los días y los métodos empleados para la extracción.

Figura 5. Comparación mediante diagrama de cajas agrupado por el gen ORF1ab, según número de días y métodos. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



Nota. En el diagrama de caja, el eje “y” corresponde al gen ORF1ab y el eje “x” corresponde a los diferentes días, donde se visualizan las distribuciones y tendencias de los datos. La caja azul representa el método manual y la caja verde representa el método semiautomatizado. La línea central dentro de cada caja indica la mediana, mientras que la extensión de la caja abarca desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior.

Figura 6. Comparación mediante diagrama de cajas agrupado por el gen N según, número de días y método. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



Nota. En el diagrama de caja, el eje “y” corresponde al gen N y el eje “x” corresponde a los diferentes días, donde se visualizan las distribuciones y tendencias de los datos. La caja azul representa el método manual y la caja verde representa el método semiautomatizado. La línea central dentro de cada caja indica la mediana, mientras que la extensión de la caja abarca desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior.

V. DISCUSIÓN

En el contexto de la pandemia de COVID-19, la región Huancavelica enfrentó uno de los mayores desafíos para el diagnóstico de la enfermedad, siendo un reto la conservación y el transporte de muestras al laboratorio de procesamiento. Así, un porcentaje de las muestras experimentaron considerables retrasos y exposición a agentes degradantes (ARNasas, T° ambiente, ADNasas, etc.), teniendo como resultados, falsos negativos al momento de la amplificación por PCR-RT en tiempo real. (Montalvo et al., 2023) mencionan un problema similar relacionado con la estabilidad del ARN viral a partir del tiempo 0 (en las primeras 12 h de recolección), y a las 48 y 72 horas de colectadas las muestras, afirmaron que todas las muestras deben ser procesadas a las 24 horas y conservarse a -4°C y -8°C, para obtener resultados confiables. Además, (Leon, 2021) señala el uso de dos métodos para la extracción y purificación del ARN (manual y automatizado), que funcionan perfectamente para el proceso de diagnóstico de COVID-19 y son utilizados en el área de Biología Molecular del Laboratorio Referencial de Huancavelica. Por ello, cuando las muestras de hisopado son recibidas con retraso, no está claro cuál de estos métodos emplear para recuperar mejor el material genético del virus en dichas condiciones. Para abordar esta problemática, el presente estudio utilizó muestras positivas de SARS-CoV-2 agrupadas en Ct bajo, medio y alto, sometiéndolas a temperatura ambiente a diferentes días, representando la llegada de muestras heterogéneas con días de retraso y conservadas inadecuadamente. En la tabla 1 se determinó la distribución normal de los grupos expuestos a temperatura ambiente, se analizaron los valores de Ct obtenidos por PCR-RT en tiempo real mediante la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95%. Teniendo como resultados para el día 0: gen ORF1ab $p= 0,001$ y gen N $p= 0,005$; día 5: gen ORF1ab $p= <0,001$ y gen N $p= 0,004$; día 10: gen ORF1ab $p= 0,003$ y Gen N $p= 0,006$; día 15: gen ORF1ab $p= 0,012$ y Gen N $p= 0,013$,

presentando una distribución no normal ($p < 0,05$). Por consiguiente, se aplicó estadística no paramétrica: la U de Mann-Whitney. (Ayala et al., 2013) mencionaron que esta posible atribución de los resultados radica en el tamaño de las muestras en cada grupo, ya que se manejó una cantidad específica de muestras debido a la provisión institucional de reactivos y materiales. Además, es necesario tener en cuenta que el periodo de ejecución coincidió con la quinta ola de la pandemia y bajo las condiciones del área de Biología Molecular de Huancavelica. A pesar de estas limitaciones, estos hallazgos iniciales abren la puerta para investigaciones más exhaustivas que profundicen el estudio de la conservación de muestras, evaluando hasta qué punto una muestra pueda ser conservada y aun así arrojar un resultado positivo en situaciones similares.

En la tabla 2 y 3, se muestran los resultados del análisis por U de Mann-Whitney en el día 0 para el gen ORF1ab $p=0,014$ y gen N $p=0,016$ con un nivel de significancia ($p < 0,05$). Los resultados muestran que existe diferencias estadísticas entre ambos métodos para el día inicial de extracción, siendo el método semiautomatizado el más adecuado y eficaz en la recuperación del ARN (tabla 4). (Ali et al., 2017), resaltaron el uso del método semiautomatizado que está basado en pequeñas partículas cubiertas con material magnético (óxido de hierro) que permiten capturar y aislar el ARN viral que se manipula mediante un campo magnético en muestras que se encuentran frescas y recién recolectadas en el día inicial de la extracción.

Sin embargo, a partir del quinto día los valores de Ct para el gen ORF1ab $p= 0,104$ y gen N $p=0,064$; décimo día, el gen ORF1ab $p= 0,138$; gen N $p=0,157$; y décimo quinto día, el gen ORF1ab $p= 0,156$; gen N $p=0,306$, mostraron diferencias estadísticas no significativas ($p > 0,05$). En este contexto, ambos métodos de extracción pueden utilizarse de manera indistinta para el procesamiento. Es preciso señalar que el método manual puede ser igual de eficiente en la extracción del ARN. (Cao et al., 2019) atribuyen su afinidad química entre los grupos fosfato del ARN y los grupos silanol de la matriz de sílice. El ARN se logra ajustar a las condiciones de los tampones de unión y elución para promover o disminuir las interacciones electrostáticas entre el ARN y la matriz. Este enfoque de afinidad y separación selectiva es esencial para obtener ARN de alta calidad y pureza a partir de muestras biológicas complejas.

Las muestras evaluadas permanecieron expuestas a temperatura ambiente hasta por 15 días y experimentaron una degradación progresiva del ARN a partir del

quinto día. Ello podría afectar ambas técnicas de extracción, explicando en cierta medida la falta de diferencias estadísticas entre ambos métodos a partir del quinto día. Además, la estabilidad del ARN viral fluctúa dependiendo de las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde la recolección hasta su punto de procesamiento. Vásquez et al., (2021) enfatizaron que no existen diferencias significativas entre ambos métodos utilizados para la extracción de la infección del SARS-CoV-2, teniendo como resultado un 100% de sensibilidad y especificidad en la detección del genoma viral a partir del quinto día de la infección, lo cual es concordante con la evaluación del presente estudio que incluyen la importancia de la adecuada conservación y recolección de las muestras para garantizar una suficiente concentración de carga viral. Este enfoque garantiza una correcta amplificación mediante RT-PCR, que tiene la capacidad de detectar inclusive niveles virales muy bajos. Por tanto, para mejorar la confiabilidad de los resultados, se debe tener precaución al interpretar los resultados de muestras que experimentaron retrasos en su procesamiento y han sido expuestas a condiciones variables de temperatura. Así mismo, Ulloa et al., (2020) afirma no encontrar diferencias estadísticas significativas entre los métodos de extracción manual y semiautomatizado. En dicho estudio resaltan, que ambos métodos pueden detectar el gen del SARS-CoV-2 con valores cercanos al límite de detección de la técnica de RT-PCR ($CT > 39$), destacando que el método automatizado es ideal en los primeros días de infección por una mayor carga viral y la ventaja del uso de perlas magnéticas. Además, determinando que el método manual puede ser más eficiente en ciertos casos (cantidad de muestra y con retrasos).

Chu et al., (2020) abordan el uso de la RT-PCR en muestras de hisopado orofaríngeo recolectadas a partir de los 5 días de infección de SARS-CoV-2, realizando diluciones de hasta 1/10 de ARN viral, resaltando, aun así, que ambos métodos de extracción lograron extraer y purificar el genoma viral en diferentes proporciones de las diluciones, por tanto, la RT-PCR en tiempo real sigue siendo capaz de detectar cantidades mínimas de ARN viral. De igual manera, Corman et al., (2020) señalan que es posible detectar la presencia de ARN del SARS-CoV-2 con diluciones de 1/10, evidenciando que la RT-PCR es altamente sensible y capaz de detectar el ARN viral incluso en diluciones extremadamente bajas, con una amplificación de miles de veces en condiciones óptimas. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con la detención del genoma viral en muestras tomadas en los días iniciales de infección, cuando la carga viral es alta.

Por otro lado, el análisis de muestras positivas hasta con 15 días de exposición a temperatura ambiente, donde se experimentó una disminución de la carga viral, se determinó que los valores de Ct para los genes ORF1ab, y N no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción, confirmando que ambos métodos pueden utilizarse indistintamente a partir del quinto día.

En la figura 5 y 6 los resultados obtenidos muestran que el método semiautomatizado tiene valores de Ct inferiores, mientras que el método manual presenta valores de Ct ligeramente superiores, indicando que el método semiautomatizado extrae de manera más efectiva el ARN viral, como se observa los diagramas las cajas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Miñano, (2022) quien menciona que la RT-PCR por el método semiautomatizado de perlas magnéticas demostró ser una técnica más confiable y eficaz para detectar la infección por COVID-19. También se analizó la degradación del ARN viral para los genes Orf1ab y N, donde se detalla una disminución gradual desde el día inicial hasta el decimoquinto día. A medida que las muestras estuvieron expuestas a diferentes tiempos a temperatura ambiente, muestras con Ct > 38 sufrieron degradación completa a partir del décimo día. Asimismo, Russo et al., (2020) señalan que la degradación del genoma viral puede ser causada por varios factores, incluyendo la toma de muestra, el etiquetado, el almacenamiento , transporte inadecuado y prolongado. Por otra parte, Pan et al., (2020) señalaron que una temperatura inadecuada afecta negativamente la eficiencia de la prueba de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2. En la región de Huancavelica, se observaron algunos de estos factores debido al difícil acceso a diferentes lugares de los centros de salud, afectando la integridad del ARN viral y en consecuencia los resultados de los análisis. Goldschmidt (2020) destaca la importancia de reducir estos factores y mantener técnicas asépticas durante el proceso de toma de muestra, aislamiento y purificación del genoma viral. Además, es crucial utilizar reactivos y materiales libres de ARNasas para evitar la degradación del SARS-CoV-2, ya que este virus es sensible a los cambios de temperatura y la exposición a estas enzimas. Los métodos de extracción de ARN funcionan de manera eficiente para respaldar el proceso de diagnóstico de COVID-19. En el actual contexto, donde aún enfrentamos una situación pandémica en constante agravamiento, resulta de vital importancia que estos métodos de extracción sigan estando accesibles de manera sencilla para los investigadores, quienes continúan

laborando incansablemente para frenar el avance del COVID-19 y aportar información de gran valor en este proceso. Finalmente, es preciso señalar que los resultados de la presente investigación muestran un enfoque preliminar en la evaluación de los métodos empleados en el Laboratorio Referencial de Huancavelica y teniendo en cuenta el contexto de dicha región en el marco de la pandemia de la COVID-19. En tal sentido, se requerirá de estudios más profundos para tener una mejor comprensión de la dinámica de degradación del ARN del SARS-Cov-2 y contar con metodologías más robustas para su diagnóstico.

VI. CONCLUSIONES

1. El método semiautomatizado destaca su eficacia de la extracción de ARN al realizarse en el día 1, no obstante, a partir del quinto día, ambos métodos ofrecen resultados similares, considerando el tiempo de almacenamiento y la exposición a diferentes rangos de temperatura, destacando la importancia de la degradación progresiva del ARN y la heterogeneidad de las muestras al seleccionar el método de extracción del ARN del SARS-CoV-2.
2. El método manual demostró ser eficaz en muestras positivas expuestas a temperatura ambiente a partir del día 5, 10 y 15, sugiriendo la adaptabilidad en determinadas circunstancias de extracción.
3. El método semiautomatizado resultó más eficiente para muestras positivas expuestas a temperatura ambiente desde el día 1 hasta el día 15, especialmente en muestras frescas, destacando su rapidez y eficiencia en cantidad de muestras.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios adicionales con un tamaño de muestra más extenso y ampliar el tiempo de exposición a rangos de temperatura para mejorar el estudio en este tipo de muestras, proporcionando información más completa y precisa sobre la estabilidad del material genético viral y su impacto en los resultados de la prueba de RT-PCR, lo cual contribuirá a una mejor comprensión de la dinámica de la infección por SARS-CoV-2 en condiciones reales.
2. Evaluar la cuantificación de la carga viral del ARN/ μ l por cada día expuesto (0, 5, 10 y 15 días) a rangos de temperatura. Esto proporcionará información adicional sobre la viabilidad del genoma viral del SARS-CoV-2 en función del tiempo de exposición y permitirá evaluar la relación entre la carga viral y los valores de CT.
3. Evaluar muestra salival, para determinar la eficacia de la extracción y purificación del ARN viral, permitiendo evaluar la efectividad de los métodos de extracción en muestras salivales y su utilidad en el diagnóstico de COVID-19.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, P., Enriquez, Y., Quiroz, C., Valencia, E., Pareja Cruz, A., Aguilar Ramírez, P., Enriquez Valencia, Y., Quiroz Carrillo, C., Valencia Ayala, E., de León Delgado, J., & Pareja Cruz, A. (2020). Pruebas diagnósticas para la COVID-19: La importancia del antes y el después. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(2). <https://doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n2.14>
- Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Ayala, P. A., Gonzalez, L. A., & García, R. (2013). Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma materno. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 181. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.taca>
- Britto, F., Cabezas, C., Carbone, F., & García, H. (2021). TIEMPOS DE PANDEMIA 2020-2021. [webmaster@minsa.gob.pe. http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/5485.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/5485.pdf)
- Cao, M. A., Ocampo, E. A., Bravo, A. L., González, C. H., & Le, S. (2019). *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular*. Casa abierta al tiempo. https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual_practicas_laboratorio_biologia_molecular.pdf
- Carranza, L. A., Maldonado, F. E., & Cruz, J. (2020). La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID-19 [Artículo de Revisión; Artículo de Revisión]. En *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento* (pp. 64-74). [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(2\).mayo.2020.64-74](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(2).mayo.2020.64-74)
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, 66(4), 549-555. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Dabanch, J. (2021). EMERGENCIA DE SARS-COV-2. ASPECTOS BÁSICOS SOBRE SU ORIGEN, EPIDEMIOLOGÍA, ESTRUCTURA Y PATOGENIA

- PARA CLÍNICOS. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(1), 14-19.
<https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.12.003>
- Dorado, G. (2020). 44. Amplificación de DNA mediante PCR. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*, 18.
<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf>
- Ezpeleta, D., & Azorín, D. G. (2020). Manual COVID-19 para el neurólogo general. *Sociedad Española de Neurología*, 78. <http://www.edicionessen.es>
- García, F., Melón, S., Navarro, D., Paño, J. R., & Galán, J. C. (2020). Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1, 16.
<https://covid19.seimc.org/index.php/diagnostico-sars-cov-2/>
- Goldschmidt, P. (2020). Dificultades en la detección de genomas del nuevo coronavirus 2 (SARS CoV-2). *REVISTA ARGENTINA DE SALUD PÚBLICA Suplemento COVID-19*, 7.
<https://doaj.org/article/194e7dfdc03941b6a5a2b97f4b465a64>
- González, O. H. (2020). Aproximación a los distintos tipos de muestreo no probabilístico que existen. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 3(37), 3. <https://orcid.org/0000-0001-7230-9996>
- Goodrick, D. (2014). Estudios de caso comparativos. *Office of Research-Innocenti*, 12(Nº9), 13. florence@unicef.org www.unicef-irc.org
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., De Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536-544.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- INS. (2019). *Obtención, conservación y envío de muestras para el diagnóstico de virus respiratorio* ITT-CNSP-385.
file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/ITT-CNSP-385%20ED.02-virus%20respiratorios-c%20(1).pdf
- INSN-SB. (2020). *GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRA DE SECRECIÓN NASOFARÍNGEA – SARS COV-2*.
- Juárez, J., & David, J. (2021). *Estudio comparativo de la carga viral de SARS-CoV-2 de pacientes confirmados con PCR en tiempo real de los distritos de Juanjui y Tocache de la Región San Martín; mayo – setiembre 2020*. [Tesis, UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO].
<http://creativecommons.org/licenses/by-ns-sa/2.5/pe/>

- Kucirka, L. M., Lauer, S. A., Laeyendecker, O., Boon, D., & Lessler, J. (2020). Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Annals of Internal Medicine*, 173(4), 262-267. <https://doi.org/10.7326/M20-1495>
- Lam, E. R., León, A. O., León, K. B., Llamo, G. L., López, R. M., Luzuriaga Tirado, E. D. R., Mendoza Blas, A. M., & Huamán Saavedra, J. J. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417-432. <https://doi.org/10.25176/RFMH.v21i1.3327>
- Leon, I. (2021, agosto 23). *¿Cómo encontrar un método de extracción de ARN que funcione para tu laboratorio?* AllScience. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/como-encontrar-un-metodo-de-extraccion-de-arn-que-funcione-para-tu-laboratorio>
- Lopez, P., Ballesté, R., & Seija, V. (2020). Diagnóstico de laboratorio de COVID-19. <https://doi.org/10.29193/rmu.36.4.7>. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-03902020000400131&script=sci_arttext
- Miñano Rivera, S. M. (2022). *Implementación de la Trazabilidad en la RT-PCR en Tiempo Real por el Método Semiautomatizado de Perlas Magnéticas* [Tesis, UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO]. <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Mi%C3%B1ano%20Rivera,%20Sole%20dad%20Milagros.pdf>. <http://creativecommons.org/licenses/by-nsa/2.5/pe/> .
- Montalvo, M. C. M., Valdés, O., Menes, D., Núñez, L., Naranjo, C., & Figueredo, C. (2023). Evaluación de medios de transporte para el diagnóstico del SARS-CoV-2 a partir de muestras clínicas. *CIENCIAS BIOMÉDICAS*, 13(1). <http://scielo.sld.cu/pdf/aacc/v13n1/2304-0106-aacc-13-01-e1209.pdf>
- Morales, C., González, R., Martín, G., Ramírez, A., Gonzalo, M., & Rodríguez, A. (2020). Toma de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de COVID-19. *Revista ORL*, 11(4), 389-394. <https://doi.org/10.14201/orl.2307910.14201/orl.23079>
- Oliva, J. E. (2020). SARS-CoV-2: Origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 3(2). <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- Pampa, J. J., & Quispe, P. (2022). *Comportamiento de la infección por SARS-COV 2 en relación a los valores de CT en pruebas RT-PCR del personal de salud médico de la Libertad* [Tesis, UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO]. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/PampaEspinoza_QuispeSalvador.pdf

- Pan, Y., Long, L., Zhang, D., Yuan, T., Cui, S., Yang, P., Wang, Q., & Ren, S. (2020). Potential False-Negative Nucleic Acid Testing Results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Thermal Inactivation of Samples with Low Viral Loads. *Clinical Chemistry*, 66(6), 794-801. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa091>
- Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331-337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Pavez, D., Pérez, R., Cofré, J., & Rodríguez, J. (2019). Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento etiológico de la faringoamigdalitis aguda estreptocócica en pediatría. *Revista chilena de infectología*, 36(1), 69-77. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000100069>
- Peña, B. O., Rincón, B., & Castillo, J. J. (2020). SARS-CoV-2: Generalidades bioquímicas y métodos de diagnóstico. *Nova*, 18(35), 11-33. <https://doi.org/10.22490/24629448.4183>
- Perret, C., Abarca, K., Solari, S., Aguilera, P., García-Huidobro, D., Olivares, F., Palma, C., Contreras, A. M., Martínez-Valdebenito, C., & Ferrés, M. (2022). Detección del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR utilizando saliva en pacientes ambulatorios con estudio de COVID-19. *Revista chilena de infectología*, 39(4), 372-381. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182022000400372>
- Quiroz, H. R., Chimoy, P. J., Vértiz, J. J., & Bazán-Mayra, J. E. (2022). Correlación entre el umbral de ciclo de la RPC en tiempo real y la clasificación clínica de la COVID-19. *Revista chilena de infectología*, 39(1), 35-44. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182022000100035>
- Ramos, C. (2021). Editorial: Diseños de investigación experimental. *CienciAmérica*, 10(1), 1-7. <https://doi.org/10.33210/ca.v10i1.356>
- Rodríguez, R., Rodríguez, A., & Ángel, M. (2021). Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina; UNAM*, 12. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Ruiz, A., & Jiménez, M. (2020). SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 61(2), 63-79. <http://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i2.15177>.
- Russo, A., Minichini, C., Starace, M., Astorri, R., Calò, F., & Coppola, N. (2020). Current Status of Laboratory Diagnosis for COVID-19: A Narrative Review. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 2657-2665. <https://doi.org/10.2147/IDR.S264020>
- Sandoval, D. C., Socasi Dioses, E. G., & Medina Jadan, E. J. (2023). Técnicas genéticas y moleculares para el diagnóstico de SARS – Cov-2.

- RECIMUNDO, 7(1), 87-98.
[https://doi.org/10.26820/recimundo/7.\(1\).enero.2023.87-98](https://doi.org/10.26820/recimundo/7.(1).enero.2023.87-98)
- Santos, N. F., & Salas, R. (2020). Origin, structural characteristics, prevention measures, diagnosis and potential drugs to prevent and COVID-19. *Medwave*, 20(08), e8037-e8037.
<https://doi.org/10.5867/medwave.2020.08.8037>
- Serrano, O. R. (2020). Predicción de la inmunogenicidad de la proteína del SARS-CoV-2 responsable de la infección COVID-19 en humanos. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 45(3), Article 3.
<http://www.revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/2270>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo. *INVESTIGACIÓN EN DISCAPACIDAD*, 2(2), 70-78.
<http://www.medigraphic.com/rid>
- Torres, L. (2021). *Optimización del control interno de calidad de RT-PCR en tiempo real para detección de SARS-COV-2* [Tesis, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ].
 file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/T010_42578281_D.pdf
- Ulloa, S., Bravo, C., Parra, B., Ramirez, E., Acevedo, A., Fasce, R., & Fernandez, J. (2020). A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. *Journal of Virological Methods*, 285, 113960. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113960>
- Vargas, A. K., Schreiber, V., Ochoa, E., & López, A. (2020). SARS-CoV-2: Una revisión bibliográfica de los temas más relevantes y evolución del conocimiento médico sobre la enfermedad. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 79(3), 185-196. <https://doi.org/10.35366/96655>
- Vásquez, R., Guadrón Meléndez, A. A., Cruz Aguilar, R. D. J., & Vásquez Rodríguez, E. A. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 4(1), 31-39.
<https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>

ANEXOS

Anexo 1. Carta de autorización del CIEI DIRESA en la región Huancavelica, 2022.


GOBIERNO REGIONAL
HUANCAVELICA

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Huancavelica, 11 de abril 2022

CARTA N° 240 -2022/GOB.REG.HVCA/GRDS-DIRESA

Señor:
Bach. Roger Orlandini CUBA QUISPE

Presente.-

ASUNTO : AUTORIZACION PARA TRABAJO DE CAMPO PROPUESTA DE INVESTIGACION TITULADO "VERIFICACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL DEL SARS-COV-2 PARA GARANTIZAR UN DIAGNOSTICO CERTERO"

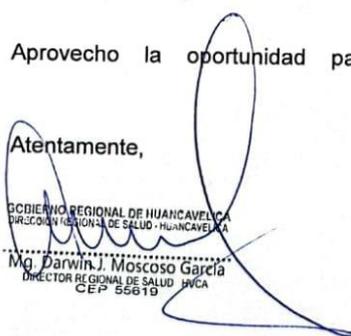
Ref. : Acta del CIEI DIRESA de fecha 13 de abril 2022
Reglamento del Comité Institucional de Ética en Investigación DIRESA.

Es grato dirigirme a Usted, para saludarlo cordialmente a nombre de la Dirección Regional de Salud, en referencia al documento, el Comité Institucional de Ética en Investigación CIEI DIRESA, autoriza el trabajo de campo propuesta de investigación titulado "VERIFICACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL DEL SARS-COV-2 PARA GARANTIZAR UN DIAGNOSTICO CERTERO". El cual se desarrollará en el Laboratorio Referencial de la Dirección Regional de Salud Huancavelica.

Por lo que, se invoca cumplir con los aspectos éticos recomendados en el trabajo de campo; asimismo precisar que, los resultados encontrados deberá socializar obligatoriamente en esta representada.

Aprovecho la oportunidad para expresarle mi especial consideración.

Atentamente,


GOBIERNO REGIONAL DE HUANCAVELICA
DIRECCION REGIONAL DE SALUD - HUANCAVELICA
Mg. Darwin J. Moscoso García
DIRECTOR REGIONAL DE SALUD HVCA
CEP 55619

DMG/acav/matl
C.c.
Archivo

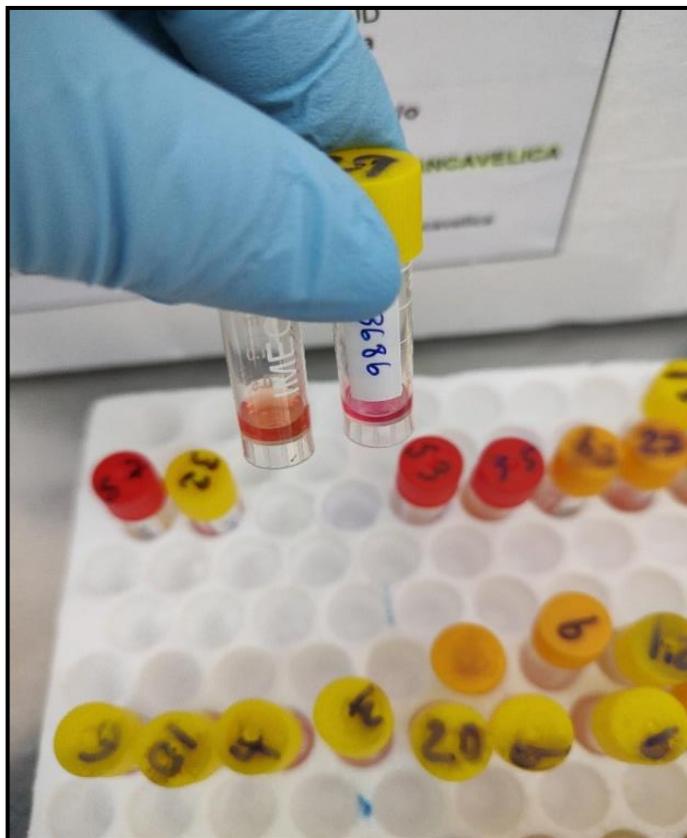
REG. DOC.	2215886
REG. EXP.	1638594

Av. Andrés A. Cáceres S/N-Huancavelica Tel. 067 - 453113 - Anexo -1603 Fax 067 - 451557 Anexo 1604

Anexo 2. Selección de las muestras de la Viroteca. Laboratorio de Biología Molecular de la región Huancavelica, 2022.



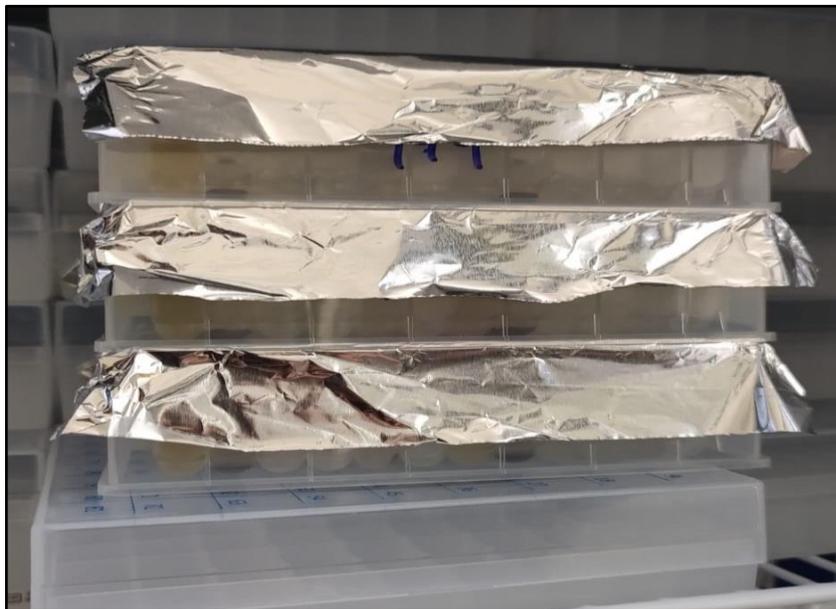
Anexo 3. Descongelamiento de las muestras con CT alto, medio y bajo, con contenido suficiente (1,600 ml). Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



Anexo 4. Área de extracción manual. Laboratorio Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



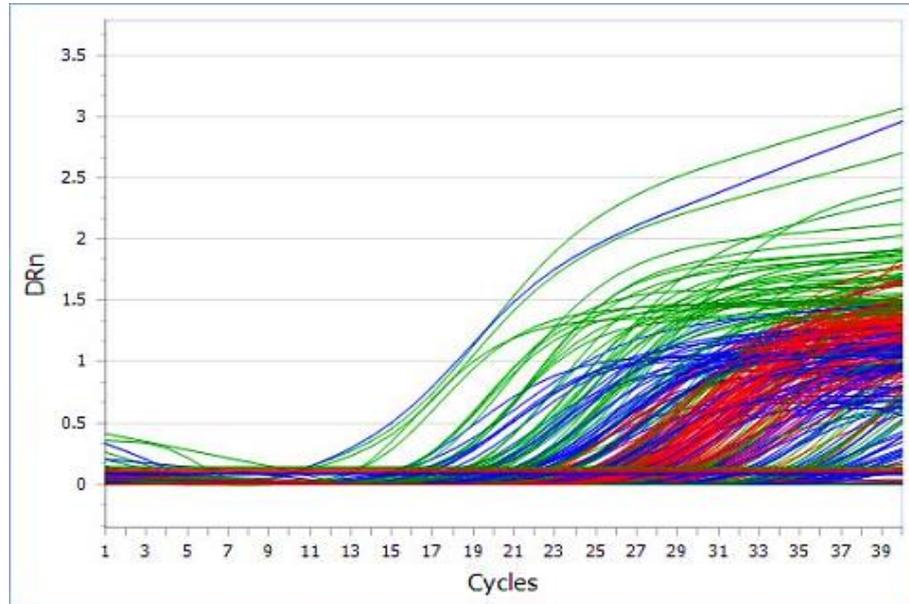
Anexo 5. Área de extracción semiautomatizada. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



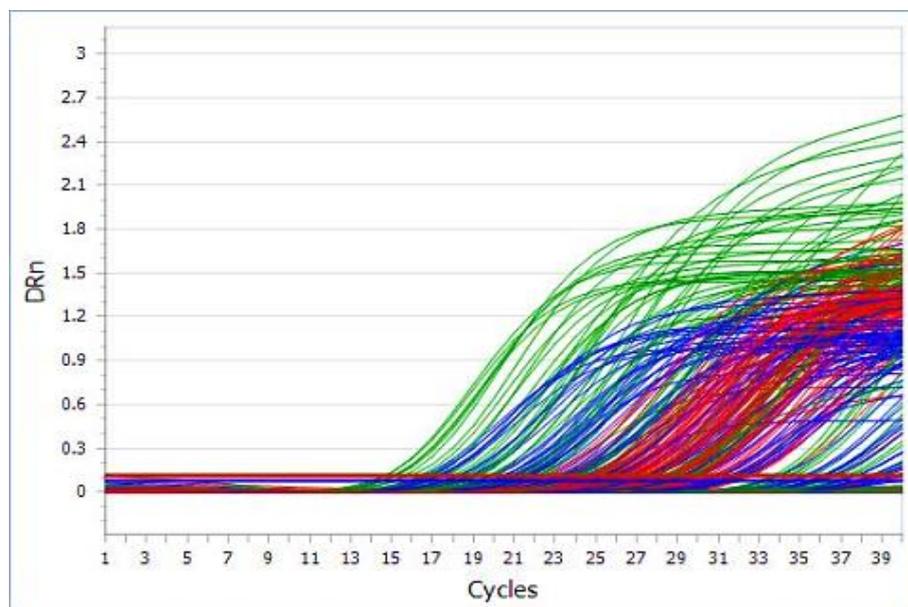
Anexo 6. Área limpia para la siembra de muestras. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



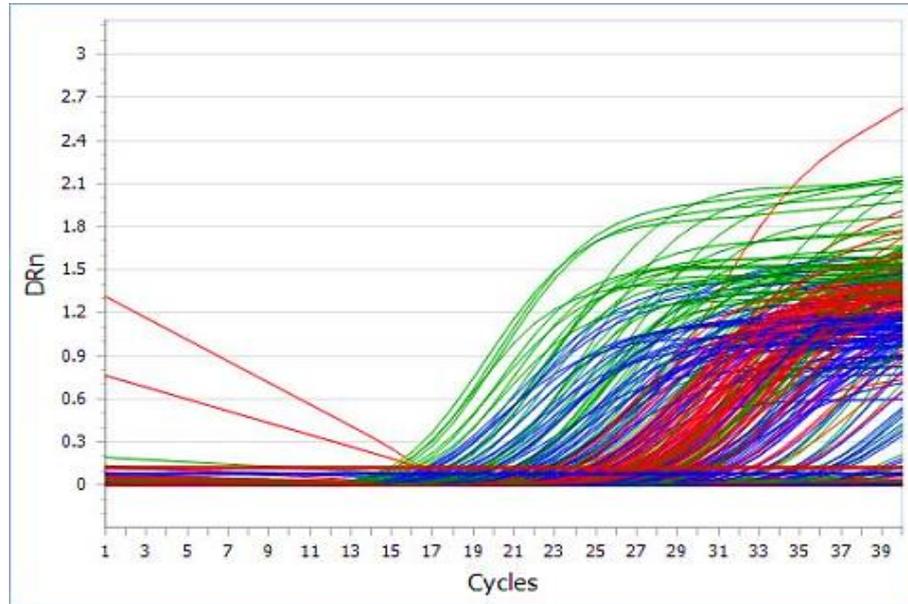
Anexo 8. Lectura de las curvas de los CT del día 0. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



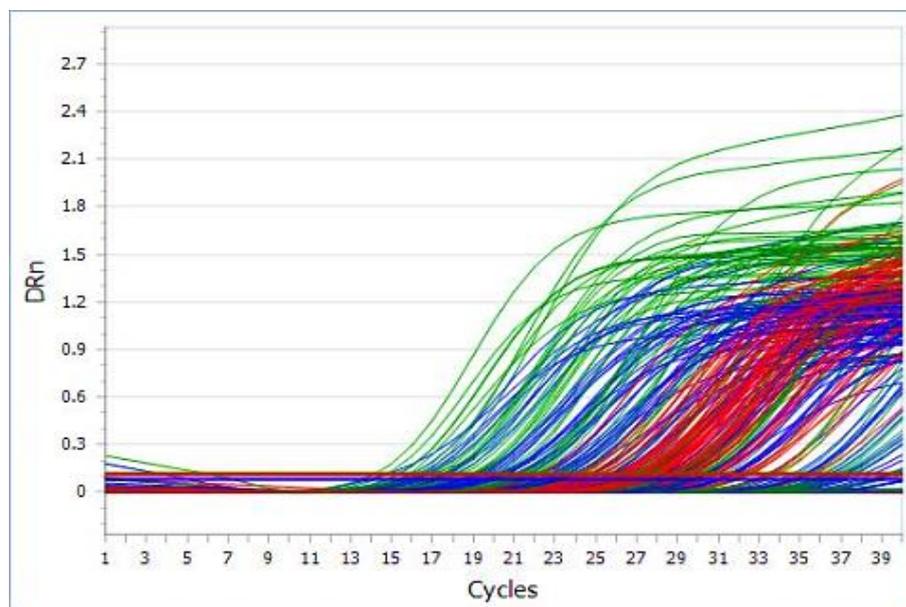
Anexo 9. Lectura de las curvas de los CT del día 5. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



Anexo 10. Lectura de las curvas de los CT del día 10. Laboratorio de Biología Molecular en la región Huancavelica, 2022.



Anexo 11. Lectura de las curvas de los CT del día 15. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.



Anexo 12. Selección de muestra positivas de acuerdo a la carga viral (bajos, medios y altos). Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Código interno por tesista	Código de Viroteca de Biología molecular	CT Gen	FAM ORF1ab	VIC N	CY5 Humano
1	5005	BAJO	17,18	16,63	25,95
2	3028	BAJO	14,12	10,88	24,84
3	2998	BAJO	17,36	17,08	23,73
4	4790	BAJO	15,23	14,36	25,57
5	3706	BAJO	14,36	12,02	23,22
6	3357	BAJO	18,37	17,1	25,61
7	3386	BAJO	18,9	18,21	23,08
8	3470	BAJO	17,89	19,96	24,76
9	3697	BAJO	17,31	20,23	25
10	3702	BAJO	19,22	18,25	24,04
11	3684	MEDIO	16,74	15,74	26,03
12	8325	MEDIO	18,74	17,05	26,03
13	5083	MEDIO	23,19	21,24	25,4
14	5042	MEDIO	21,83	20,2	25,31
15	4070	MEDIO	26,24	24,16	20,58
16	3635	MEDIO	29,45	28,73	25,19
17	3692	MEDIO	23,24	22,17	25,05
18	3712	MEDIO	21,69	20,61	26,59
19	3698	MEDIO	24,8	24,11	26,25
20	3705	MEDIO	20,93	20,57	24,02
21	3772	MEDIO	24,37	22,98	26,78
22	3855	ALTOS	29,45	27,41	23,61
23	4505	ALTOS	28,26	27,72	27,08
24	4046	ALTOS	36,62	35,51	26,26
25	5286	ALTOS	35,18	32,82	22,83
26	3472	ALTOS	30,74	30,18	24,34
27	3703	ALTOS	34,58	34,57	23,67
28	3686	ALTOS	33,22	37,72	24,76
29	3364	ALTOS	34,92	34,94	25,49
30	3700	ALTOS	35,03	34,68	22,91

Anexo 13. Temple de trabajo para la PRE RT-PCR. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Ensayo:	PRO: 0, 5, 10 y 15	Termociclador:	MOLARRAY MA-6000
Fecha:	julio-agosto	Master Mix:	VAZYME-7E652G2AA
Operadores:	Roger C- Jorge L		
Objetivo:	Detección por RT-PCR		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	16	24		1	9	17	24			
B	2	10	17	25		2	10	18	25			
C	3	11	18	26		3	11	19	26			
D	4	12	19	27		4	12	20	27			
E	5	13	20	28		5	13	21	28			
F	6	14	21	29		6	14	22	29			C.N
G	7	15	22	30		7	15	23	30			NTC
H	8	C.E	23	C.E		8	16	C.E	C.E			C.P

Rz Set Up sec. diana: sec. diana:

RX 1 67

PREPARACIÓN

Mezcla de RX 18,30 1,226.1

Enzima tubo tapa blanca (Enzimas) 1,70 113,9

Total 20,00 1,340

TOTAL, DE Rx: 67

Anexo 14. Preparación de los Reactivos Was A y Was B para la extracción manual.
Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Sec.	Etiquetas	Contenidos principales	No. (24 pruebas)
1	Tampón lisis	Sal de guanidina	5 mL/botella (1 botella)
2	Tampón de lavado A (WA)	Sal de guanidina	6,5 mL/botella (1 botella)
3	Tampón de lavado B (WB)	Trimetol aminometano	4.5 mL/botella (1 botella)
4	Tampón de elución	Trimetol aminometano	5 mL/botella (1 botella)
5	columna	-	24 piezas/bolsa (1bolsa)
6	Tubo de recogida	-	24 piezas/bolsa (1bolsa)

Anexo 15. Contenido de la placa para la extracción semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Paso	Bien	Nombre	Tiempo de mezcla (min)	Imán (Seg)	Tiempo de espera (min)	Vol. (µL)	Velocidad de mezcla (1-10)	Temp. (°C)
1	5	Extracción de materiales	0,1	10	0	600	8	0
2	1	Lisis	8	20	0	800	8	68
3	2	Lavado 1	0,5	10	0	600	8	0
4	3	Lavado 2	0,5	10	0	600	8	0
5	4	Lavado 2	0,5	10	4	600	8	0
6	6	Elución	3,4	10	0	100	8	60
7	2	Abandono de perlas magnéticas	0,1	0	0	600	8	0

Anexo 16. Pasos para la amplificación por RT-PCR del kit Lifotronic. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022

	Paso	Temperatura	Hora	Ciclos
1	Transcripción inversa	50°C	15 minutos	1
2	Pre – desnaturalización	95°C	1 minuto	1
3	Desnaturalización	95°C	10 segundos	42
4	Extensión	60°C	30 segundos	

Componentes Del Kit

- Solución de reacción (Contiene buffer primers y sondas para los 3 marcadores) (kit 96 Rx – 2 viales marrones de 880uL)
- Mezcla de enzimas (kit de 96 Rx – 1 vial de 170uL)
- Control positivo (1 vial de 100uL)
- Control negativo (1 vial de 100uL)

Anexo 17. Cuantificación del Gen N para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método manual.
Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Gen	N			
	0	5	10	15
Muestras/Días				
1	20,37	22,57	22,33	23,72
2	14,48	17,6	17,84	17,94
3	19,73	21,28	21,88	22,2
4	18,78	19,59	19,58	20,05
5	14,7	16,9	17,12	17,3
6	20,32	20,38	20,77	21,15
7	20,56	21,02	21,11	21,13
8	15,12	18,12	18,09	18,58
9	22,09	23,87	23,5	24,92
10	21,01	22,32	22,65	23,08
11	18,23	18,91	18,98	19,25
12	17,43	18,15	20,98	21,44
13	21,53	21,47	21,24	21,75
14	23,96	24,18	23,54	24,13
15	29,11	29,03	29,32	29,06
16	27,06	34,07	33,72	34,12
17	21,34	25,73	26,28	27,02
18	25,46	24,21	25,3	25,72
19	25,92	28,83	28,78	31,4
20	23,14	24,21	25,8	26,11
21	22,56	24,32	24,96	25,4
22	28,69	32,14	32,74	32,56
23	27,86	29,41	30,48	30,64
24	30,37	36,24	36,98	36,59
25	34,72	34,98		
26	32,35	33,79	34,5	34,74
27	36,5			
28	33,86	35,2	35,55	35,36
29	36,52	37,63	39,59	39,63
30	38,65	38,66	39,76	

Anexo 18. Cuantificación del Gen ORF1ab para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método manual.
Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Gen Muestras/Días	ORF 1ab			
	0	5	10	15
1	22,14	22,98	23,5	24,08
2	18,53	19,26	20,13	20,97
3	22,32	22,41	23,85	23,93
4	20,67	20,75	20,81	21,37
5	16,49	18,23	18,56	18,71
6	20,75	20,85	21,03	21,11
7	21,04	21,09	21,15	21,68
8	16,21	19,12	19,32	19,61
9	21,32	23,53	23,62	25,16
10	21,05	23,29	23,81	24,09
11	19,72	19,84	19,92	24,99
12	20,16	20,37	21,75	22,41
13	22,45	23,18	23,28	23,91
14	24,93	25,55	25,69	26,04
15	28,84	29,97	30,11	30,73
16	27,27	30,68	34,16	34,65
17	22,38	24,9	27,39	27,63
18	25,09	25,99	26,15	26,63
19	26,2	27,29	29,54	32,68
20	22,86	22,18	25,64	26,69
21	23,22	24,71	24,87	25,18
22	29,33	30,31	33,84	33,95
23	28,98	30,35	31,15	33,02
24	31,1	33,16	39,09	39,86
25	34,76	35,94		
26	34,44	34,48	34,73	38,98
27	38,7	38,75		
28	36,36	38,86	39,29	39,74
29	36,76	37,89	39,32	
30	39,85	39,51	40	

Anexo 19. Cuantificación del Gen N para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Gen	N			
	0	5	10	15
Muestras/Días				
1	18,46	19,25	19,38	19,57
2	14,52	15,21	14,81	15,97
3	17,49	17,22	17,69	16,97
4	11,89	15,75	16,08	16,55
5	15,61	15,84	15,7	16,26
6	16,53	16,51	17,22	18,64
7	16,2	16,1	16,45	17,12
8	14,09	14,79	15,11	15,85
9	20,31	21,02	21,67	21,94
10	18,32	19,13	19,23	20,04
11	15,71	15,25	15,12	16,41
12	12,76	15,33	15,38	18,35
13	14,55	19,34	19,56	20,66
14	19,38	21,54	21,58	21,35
15	20,81	22,65	24,94	25,84
16	19,61	29,56	29,73	29,83
17	22,52	21,92	22,74	24,24
18	21,75	21,86	21,98	22,15
19	20,58	22,03	27,66	28,34
20	22,16	22,28	22,26	24,76
21	17,66	21,23	21,05	21,88
22	20,41	24,75	27,69	27,45
23	26,76	27,01	27,25	27,41
24	27	34,96	34,82	35,04
25	29,36	34,11	38,44	38,87
26	22,89	25,95	30,32	30,35
27	22,99	31,65	36,86	37,04
28	33,52	36,3	37,31	38,58
29	31,49	34,63	35,09	36,3
30	34,27	37,08	36,4	35,93

Anexo 20. Cuantificación del Gen ORF1ab para el día: 0, 5, 10 y 15 por el método semiautomatizado. Laboratorio de Biología Molecular de la Región Huancavelica, 2022.

Gen	ORF 1ab				
	Muestras/Días	0	5	10	15
1		19,35	20,57	21,39	22,71
2		16,41	16,79	16,82	18,86
3		17,98	18,24	19,25	21,35
4		12,98	16,68	16,75	17,11
5		15,96	16,21	18,24	20,33
6		16,99	17,6	17,94	18,49
7		17,5	17,58	17,28	17,71
8		15,48	15,92	15,97	20,62
9		20,31	21,49	21,79	22,21
10		19,09	20,2	20,08	20,01
11		16,63	16,24	15,75	15,96
12		14,7	16,57	17,33	19,21
13		17,19	20,81	21,74	21,62
14		20,6	22,6	22,34	23,16
15		21,52	23,03	26,59	27,39
16		25,27	31,2	31,35	32,41
17		22,91	22,57	23,71	24,2
18		22,52	23,52	24,08	25,96
19		22,03	25,85	28,96	29,05
20		20,76	23,13	24,04	24,21
21		20,07	22,57	22,71	23,58
22		21,47	25,27	29,97	30,47
23		27,3	28,27	28,9	29,96
24		27,62	33,54	35,7	36,44
25		30,03	35,56	37,87	
26		23,48	31,22	31,75	32,89
27		23,77	39,13		
28		34,08	34,54	35,15	35,53
29		32,76	35,42	35,58	36,59
30		34,67	35,33	36,4	36,9

Anexo 21. Matriz de consistencia

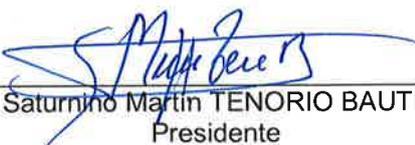
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Cuál será la influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante PCR-RT en tiempo real LRR-HUANCAVELICA 2022?	<p>General Comparar dos métodos de extracción de ARN viral para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en muestras positivas, considerando diferentes periodos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días) y expuestas a temperatura ambiente.</p> <p>Específicos 1. Evaluar la eficacia de la extracción manual en muestras positivas expuestas a temperatura ambiente durante 0, 5, 10 y 15 días. 2. Evaluar la eficacia de la extracción semiautomatizada para muestras positivas expuestas a temperatura ambiente durante 0, 5, 10 y 15 días.</p>	<p>H_0: No existirá una diferencia estadística entre el método de extracción de ARN viral: semiautomatizado y manual en la recuperación de genoma viral del SARS-CoV-2, expuestos a temperatura ambiente y evaluados en diferentes periodos 0, 5, 10 y 15 días.</p> <p>H_1: Existirá una diferencia estadística entre el método de extracción de ARN viral: semiautomatizado y manual en la recuperación de genoma viral del SARS-CoV-2, expuestos a temperatura ambiente y evaluados en diferentes periodos 0, 5, 10 y 15 días.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>V1: Influencia de carga viral.</p> <p>Indicadores: -CT altos. -CT medios. -CT bajos.</p> <p>V2: Extracción de ARN.</p> <p>Indicadores: -Extracción manual por columnas de sílice. -Extracción semiautomatizada por Perlas Magnéticas.</p> <p>Covariable</p> <p>V3: Conservación de muestras.</p> <p>Indicadores: -Días con retraso 0, 5,10,15 días.</p> <p>Variable dependiente - Diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR</p> <p>Indicadores: -Gen ORF1ab -Gen N</p>	<p>Tipo de investigación Básico – cuasi experimental</p> <p>Población Muestras de hisopado nasofaríngeo en aislamiento del virus del SARS-CoV-2, conservadas a -30°C en la Viroteca, procedentes las siete provincias de Huancavelica entre los periodos de marzo – abril del 2022</p> <p>Muestra 30 muestras positivas a SARS-CoV-2 en hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo. Muestreo no probabilístico – por conveniencia.</p> <p>Marco legal ético Permiso de la DIRESA HCVA</p> <p>Laboratorio</p> <ul style="list-style-type: none"> • Elección de muestras. • Preparación de Buffer. • Extracción de ARN: Manual y semiautomatizado. • Amplificación. <p>Análisis estadístico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prueba de normalidad. • Prueba U de Mann Whitney. • Diagrama de cajas y bigotes.

**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. ROGER ORLANDINI CUBA QUISPE
RESOLUCIÓN DECANAL N° 016-2024-UNSCH-FCB-D**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del dieciocho de enero del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA; Dr. Homero ANGO AGUILAR (Miembro-Jurado); Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ (Miembro-Jurado); Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH (Miembro - Jurado); Dr. Gilmar PEÑA ROJAS (Miembro - Asesor); actuando como secretario docente encargado el Mg. Luís Uriel MOSCOSO GARCÍA con Memorando N° 019-2024-UNSCH(IN) -FCB con fecha diecisiete de enero del dos mil veinticuatro; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **“Influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante PCR-RT en tiempo real. LRR-Huancavelica, 2022”**; presentado por el Bach. **ROGER ORLANDINI CUBA QUISPE**; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Culminada la exposición, el Presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones, cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Dr. Homero ANGO AGUILAR	18	18	18
Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ	18	17	18
Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH	19	18	19
		PROMEDIO	18

El sustentante alcanzó el promedio de 18 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis y cinco de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Presidente


Dr. Homero ANGO AGUILAR
Miembro – Jurado


Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ
Miembro – Jurado


Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH
Miembro - Jurado


Dr. Gilmar PEÑA ROJAS
Miembro - Asesor


Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA
Secretario – Docente (e)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

N° 17-2024-FCB-D

Yo, VÍCTOR LUIS CÁRDENAS LÓPEZ, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante la PCR-RT en tiempo real. LRR-Huancavelica, 2022 por ROGER ORLANDINI CUBA QUISPE**; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 10%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 7 de febrero de 2024.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA
Cardenas
Dr. Victor Luis Cardenas López
DIRECTOR

Influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante la PCR-RT en tiempo real. LRR-Huancavelica, 2022

por ROGER ORLANDINI CUBA QUISPE

Fecha de entrega: 07-feb-2024 09:57a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2288744051

Nombre del archivo: CUBA-QUISPE-_Roger_Orlandini-pregrado-2024-_TESIS-.docx (1.17M)

Total de palabras: 9607

Total de caracteres: 51283

Influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante la PCR-RT en tiempo real. LRR-Huancavelica, 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%	10%	3%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revistaccuba.cu Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD Trabajo del estudiante	1%
3	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	1%
5	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	labomersa.com Fuente de Internet	1%
7	dspace.ueb.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	portal.amelica.org Fuente de Internet	<1%

9	www.saludsavia.com Fuente de Internet	<1 %
10	Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador Trabajo del estudiante	<1 %
11	Tania Ethel Cuadra, Alexis Antonio Guadrón Meléndez, Rosario De Jesus Cruz Aguilar, Evelyn Alicia Vásquez Rodríguez. "Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19", Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud, 2021 Publicación	<1 %
12	Submitted to Universidad de Guadalajara Trabajo del estudiante	<1 %
13	www.minsalud.gov.co Fuente de Internet	<1 %
14	revcmhabana.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
15	www.studocu.com Fuente de Internet	<1 %
16	www.scielo.cl Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 30 words