## UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

### FACULTAD DE CIENCIAS

## ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Validación de una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para el diagnóstico de la COVID-19 producida por SARS-CoV-2 en la región del Cusco.

Tesis presentada por:

Bach. Brandon Jason Soto Chambi

Para optar al título profesional de Biólogo

ASESORA:

Dra. María Antonieta Quispe Ricalde

CO-ASESOR:

Blgo. José Luis Sierra Herrera

Tesis financiada por la UNSAAC

CUSCO-PERÚ

2022

La realización de la presente Tesis ha sido posible gracias a la concesión de la subvención del proyecto "Estudio de genomas de SARS-CoV-2 y su aplicación para el diseño de nuevos sistemas de diagnóstico adaptados a la región Cusco", Contrato Nº COVID-07-2020-UNSAAC aprobado por Resolución Nº R-540-2020-UNSAAC y ampliado por Resolución Nº R-0678-2021-UNSAAC.

### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde, por sus enseñanzas, orientación y sobre todo la confianza depositada en mí.

A Blgo. Jose Luis Sierra Herrera por su constante guía, aportes y sobre todo su amistad durante el desarrollo del presente trabajo.

A mi *alma mater* la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y a la distinguida plana docente de la Escuela Profesional de Biología por formarme como Biólogo.

Al laboratorio de referencia regional de la GERESA CUSCO en especial a la Mgt. Sonia Flores, al Blgo. Victor Zea y al Blgo. José Santacruz por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

A mis amigos David, Eli, Mila, Ciro, Cora y Christian, por su gran amistad y compañía durante tantos años.

A mi padrino Limberto Licona y a mi abuelo Rafael Chambi por motivarme y acompañarme desde mi niñez.

## DEDICATORIA

A mi padre Edward Soto quien desde el cielo puede ver este logro.

A mi madre Eufrasina Chambi por ser una fuente de inspiración y nunca rendirse a pesar de las adversidades.

A Aydee Llancay con quien siempre estaré agradecido porque sin su apoyo incondicional no hubiese alcanzado esta meta.

> A mis hermanos Kevin Arnold y Edward Alberto.

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	111
JUSTIFICACIÓN	IV
OBJETIVOS DE ESTUDIO	V
HIPÓTESIS	VI
CAPITULO I MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	7
1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.	7
1.2. GENERALIDADES	. 10
1.2.1. CORONAVIRUS TIPO 2 DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO SEVERO (SARS COV-2)	) . 10
1.2.2. Ubicación taxonómica	. 10
1.2.3. Estructura del SARS CoV-2.	. 11
1.2.4. Genoma del SARS CoV-2	. 11
1.2.5. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2	. 12
1.2.6. Variantes del SARS-CoV-2	. 14
1.2.6.1. Variantes de interés (VOI)	. 14
1.2.6.2. Variantes de preocupación (VOC)	. 14
1.2.7. Epidemiología del SARS-CoV-2 en el Perú y la región del Cusco	. 15
1.2.7.1. Transmisión	. 16
1.2.7.2. Periodo de incubación	. 16
1.2.7.3. Variantes circulantes en la región del Cusco	. 17
1.3. PRUEBAS RAPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE COVID 19	. 19
1.3.1. Pruebas rápidas COVID IgM/IgG	. 19
1.3.2. Prueba rápida para la detección de antígenos de SARS CoV-2	. 20
1.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	. 20
1.5. VARIANTES DE LA PCR	. 21
1.5.1. PCR en tiempo real	. 21
1.5.2. Nested PCR	. 22
1.6. DISEÑO DE CEBADORES	. 22
1.7. VALOR DIAGNOSTICO DE UNA PRUEBA	. 24
1.7.1. Validez interna	. 25
1.7.2. Validez externa	. 26
<b>1.8. VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS DEL SARS CoV-2.</b>	. 23

# ÍNDICE

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS	27
2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	27
2.2. ÁREA DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PACIENTES	27
2.3. LUGAR DE EJECUCIÓN	28
2.4. MATERIAL BIOLÓGICO	28
2.5. MATERIAL DE LABORATORIO	29
2.5.1. Equipos	29
2.5.2. Reactivos	29
2.5.3. Consumibles y Fungibles	30
2.5.4. Herramientas bioinformáticas online	30
2.5.5. Programas informáticos	30
2.5.6. Bases de datos	30
2.6. METODOLOGÍA	31
2.6.1. Diseño y selección de cebadores	31
2.6.1.1. Selección de cebadores	31
2.6.1.2. Diseño de cebadores	31
2.6.2. Diseño de la SEMI-NESTED-PCR	32
2.6.2.1. FLUJOGRAMA	32
2.6.2.2 Ensayo Preliminar de los Cebadores Diseñados	33
2.7.3. Ensayo preliminar de la SEMI-NESTED-MULTIPLEX PCR	39
2.7.4. Estandarización de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR	45
2.7.4.1. Determinación de la concentración de enzima ADN polimeras	a
en la 1ra PCR	45
2.7.4.2. Determinación de la concentración de cebadores en la 1 <sup>ra</sup> PC	R46
2.7.4.3. Determinación de temperatura de la 2 <sup>da</sup> PCR	46
2.7.5. Electroforesis y visualización de los productos de PCR	47
2.7.6. Validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR	47
2.7.7. Valor diagnóstico de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.	48
2.7.8. Concordancia entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT- dPCR	50
2 7 9 Límite de detección de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR	50
2.7.7. Validación del cebador F. F26080 diseñado en la investigación	50
	51
3.1. DISEÑO Y SEI ECCIÓN DE CEBADORES	51
3.2. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LOS CEBADORES DISEÑADOS	

3.2.1. Cebadores dirigidos al gen E52	2
3.2.1.1. Análisis de estructura secundaria (HAIRPIN)	2
3.2.2. Cebadores dirigidos al gen N54	4
3.2.2.1. Análisis de Estructura Secundaria (HAIRPIN) de los cebadores dirigidos al Gen N58	5
3.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE SARS CoV-2	6
3.4. DISEÑO DE LA SEMI-NESTED-PCR 59	9
3.4.1. Resultados del ensayo preliminar de los cebadores	9
3.4.2. Resultados del ensayo preliminar de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR60	0
3.4.3. Estandarización de la semi-nested MULTIPLEX PCR62	2
3.4.3.1. Determinación de concentración de enzima ADN polimerasa en la 1ª PCR62	2
3.4.3.2. determinación de la temperatura de hibridación de los cebadores en la 2 <sup>da</sup> PCR63	3
3.4.3.3. Determinación de la concentración de cebadores en la 1 <sup>ra</sup> PCR64	4
3.5. LÍMITE DE DETECCIÓN70	D
3.6 VALIDACION DE LA SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR	1
3.7. RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DE LOS GENES E Y N EN MUESTRAS POSITIVAS PARA SARS-CoV-274	4
3.8. VALIDACIÓN DEL CEBADOR F_E2608074	4
3.8 DISCUSIÓN	6
CONCLUSIONES	9
RECOMENDACIONES	D
BIBLIOGRAFÍA81	1
ANEXOS	7

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variantes de interés de SARS-CoV-2	.14
Tabla 2. Variantes de preocupación de SARS-CoV-2	.15
Tabla 3. Muestras secuenciadas por regiones del Perú hasta el mes de julio del2022	18
Tabla 4. Análisis de una prueba diagnóstica	.23
<b>Tabla 5.</b> Conjuntos de Cebadores dirigidos al gen E y N para cada sistema de reacción	.32
Tabla 7. Componentes y concentraciones de la transcripción reversa	.33
Tabla 9. Componentes y concentraciones del ensayo preliminar 1ra PCR	.34
Tabla 10. Condiciones de amplificación del ensayo preliminar 1ra PCR	35
Tabla 12. Componentes y concentraciones del ensayo preliminar 2da PCR	.36
Tabla 13. Condiciones de amplificación del ensayo preliminar 2da PCR	.37
Tabla 14. Conjuntos de cebadores del ensayo preliminar SEMI-NESTED-MULTIPLEX-PCR	.38
Tabla 16. Componentes y concentraciones en la transcripción reversa de la SEMINESTED-MULTIPLEX-PCR.	- .39
Tabla 18. Componentes y concentraciones de la 1ra PCR MULTIPLEX	.40
Tabla 19. Condiciones de amplificación de la 1ra PCR MULTIPLEX	.41
Tabla 21. Componentes y concentraciones en la 2da PCR MULTIPLEX	.42
Tabla 22. Condiciones de amplificación de la 2da PCR MULTIPLEX	43
<b>Tabla 23.</b> Estandarización de la concentración de los cebadores en la 1ra PCR MULTIPLEX	.44
<b>Tabla 24.</b> Estandarización de la temperatura de hibridación de los cebadores en la 2da PCR MULTIPLEX	a .45
Tabla 25. Análisis de una prueba diagnóstica	.46

Tabla 26. Valoración del coeficiente kappa48	3
Tabla 27. Conjunto de cebadores seleccionados y diseñados4	9
Tabla 28. Análisis de los cebadores dirigidos al gen E	0
Tabla 29. Análisis de estructuras secundarias de los cebadores dirigidos al gen E.5	1
Tabla 30. Análisis de los cebadores dirigidos al gen N	2
Tabla 31. Análisis de estructuras secundarias de los cebadores dirigidos al gen N.5	3
Tabla 32. Conjunto de cebadores de la 2da PCR del ensayo preliminar5	8
Tabla 33. Condiciones de amplificación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR64	ł
Tabla 34. Componentes y concentraciones de la SEMI-NESTED MULTIPLEX   PCR63	5
Tabla 35. Tabla comparativa entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT-qPCR72	2
Tabla 36. Positividad de los genes E y N74	4
Tabla 37. Tabla comparativa entre la RT-qPCR y la SEMI-NESTED MULTIPLEXPCR utilizando el cebador F_E260807	5

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura del virión de SARS CoV-2	11
Figura 2. Esquema del genoma de SARS CoV-2	.12
Figura 3. Infección y replicación del SARS CoV-2	.13
Figura 4. Distribución espacial de casos COVID en Cusco	16
Figura 5. Interpretación de resultados de las pruebas rápidas inmunocromatográficas	.19
Figura 6. Representación gráfica de la Nested PCR	.22
Figura 7. Alineamiento del cebador E_SARBECO_F	.54
Figura 8. Alineamiento del cebador F_E26268	.55
Figura 9. Alineamiento del cebador F_N28147	.55
Figura 10. Alineamiento del cebador R_N28466	.56
Figura 11. Electroforesis de la 1ra PCR del ensayo preliminar de los cebadores	.57
Figura 12. Electroforesis de la 2da PCR del ensayo preliminar de cebadores	.57
Figura 13. Ensayo preliminar de la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR	59
Figura 14. Análisis de muestra positiva 1ra PCR MULTIPLEX	.59
Figura 15. Análisis de muestra positiva 2da PCR MULTIPLEX	60
<b>Figura 16.</b> Determinación de concentración de enzima ADN polimerasa, electroforesis 2 <sup>da</sup> PCR MULTIPLEX	.61
Figura 17. Estandarización de la temperatura de hibridación de la 2da PCR	.62
Figura 18. Electroforesis de la 1ra PCR MULTIPLEX con 0.1uM de cebadores	.63
Figura 19. Electroforesis de la 1ra PCR MULTIPLEX con 0.4uM de cebadores	.63
Figura 20. Electroforesis de la 1ra PCR MULTIPLEX con 0.8uM de cebadores	.64
Figura21. Límite de detección del gen N	.70
Figura 22. Límite de detección del gen E	70

Figura 23. Electroforesis de la 2 <sup>da</sup> PCR de las muestras 33-40	71
Figura 24. Electroforesis de la 2 <sup>da</sup> PCR de las muestras 101-110	72
<b>Figura 25.</b> Electroforesis de la 2 <sup>da</sup> PCR de las muestras 101-110 utilizando el cebador F_E26080	74
Figura 26. Límite de detección del gen E utilizando el cebador	
F_E26080	75

### ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico Mensajero

**CP:** Control positivo

**CN:** Control negativo

Ct: (Cycle Threshold). Ciclo de umbral

ΔG: Energía libre de Gibbs

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RT-qPCR: Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PCR: (Polymerase chain reacción) Reacción en cadena de la polimerasa

STN RT-PCR: Single-tube nested RT-PCR

Tm: Temperatura de melting

SARS CoV-2: (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) Coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo

GAPDH: (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa

ACTB: Beta-actina

ECA2: Enzima conversiva de la angiotensina 2

RdRp: (RNA-dependent RNA polymerase) ARN dependiente de ARN polimerasa

E: (Envelope) Envoltura

N: (Nucleocapsid) Nucleocápside

S: (Spike) Espiga

- VP: Verdadero positivo
- VN: Verdadero negativo

FP: Falso positivo

FN: Falso negativo

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

TBP: Proteína de unión a TATA

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico 18S

#### RESUMEN

La presente tesis se encuentra dentro del marco del proyecto "Estudio de genomas de SARS-CoV-2 y su aplicación para el diseño de nuevos sistemas de diagnóstico aplicados a la región de Cusco" concedido a través del Convenio Nº 007-2020-UNSAAC. En el presente trabajo se realizó la estandarización y validación de una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para el diagnóstico de COVID-19 en la región del Cusco, para este propósito se seleccionó un conjunto de cebadores dirigidos a los genes de la envoltura (E) y la nucleocápside (N) de SARS CoV-2; adicionalmente se diseñó 2 cebadores dirigidos al gen (E) utilizando la herramienta bioinformática primer3plus, los cebadores diseñados y seleccionados se analizaron utilizando la herramienta bioinformática oligoanalyzer, la estandarización de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se realizó utilizando una muestra de ARN sintético de SARS CoV-2 y una muestra positiva para COVID-19.

Posteriormente se realizó la validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR analizando 152 muestras (39 positivas y 113 negativas), los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se calcularon comparando los resultados de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR con la prueba estándar de oro RT-qPCR, la concordancia entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT-qPCR se determinó calculando el coeficiente de kappa.

La SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR obtuvo una sensibilidad de 92.31%, especificidad de 96.46%, VPP 90.00%, VPN 97.32%, el coeficiente de kappa fue de 0.89 lo que indica una concordancia muy buena entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT-qPCR, seguidamente se realizó la validación del cebador diseñado F\_E26080 analizando 25 muestras positivas y 47 muestras negativas obteniendo una sensibilidad de 96%, especificidad de 97.8%, VPP 96%, VPN 98.83% y coeficiente de kappa de 0.93. Se consiguió estandarizar y validar una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR que amplifique con éxito regiones de los genes E y N de SARS CoV-2 como una alternativa para el diagnóstico de la COVID-19 en la región del Cusco.

Palabras clave: SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR, SARS CoV-2, PCR, COVID\_19.

#### INTRODUCCIÓN

El COVID-19 es una infección respiratoria aguda severa producida por el virus SARS-CoV-2 perteneciente a la familia *Coronaviridae*, el COVID-19 fue declarado como pandemia en marzo del 2020 por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020), el SARS CoV-2 forma parte de los siete coronavirus capaces de infectar al ser humano y se transmite mediante secreciones infectantes como las gotículas que se expulsan al momento de hablar, toser o estornudar. La rápida diseminación del virus puso en alerta los sistemas de salud de todo el mundo, particularmente en el Perú desde el inicio de la pandemia hasta el 26 de setiembre del 2022 se han registrado 4 142 104 de casos positivos, el 5.2% de estos casos terminaron en defunciones confirmadas por COVID-19 (INS, 2022).

A nivel regional según la Gerencia Regional de Salud Cusco se tienen 205 195 casos positivos, 2.6% de defunciones en la región, el total de muestras procesadas fue de 1 197 187 de las cuales solo el 7.29 % fueron confirmados por pruebas moleculares desde el inicio de la pandemia hasta el 26 de setiembre del 2022 (GERESA-CUSCO, 2022). El interés de este trabajo viene dado por la importancia del uso de pruebas moleculares para el diagnóstico de SARS-CoV-2, debido a su capacidad para detectar infecciones asintomáticas o con baja carga viral, las pruebas moleculares tienen un rol fundamental para la identificación oportuna del virus, la principal limitante que presenta la RT-qPCR es la poca accesibilidad que tienen los laboratorios a un termociclador de PCR en tiempo real por lo que el diagnóstico molecular se encuentra saturado y son pocas las personas que tienen acceso a una prueba molecular, lo que influye negativamente en la descentralización del diagnóstico.

Según la organización mundial de la salud para que una muestra se considere positiva para SARS CoV-2 por diagnóstico molecular se debe amplificar dos regiones del genoma del virus, por lo tanto el presente trabajo pretende desarrollar una nueva prueba molecular basada en la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR utilizando un conjunto de cebadores dirigidos a los genes E y N del virus SARS-CoV-2, de esta forma se pretende contribuir a la descentralización del diagnóstico en centros de salud de la región del Cusco que no cuenten con equipos especializados para realizar pruebas como la RT-qPCR. El diagnóstico acertado de infecciones producidas por SARS CoV-2 contribuye a la aplicación de estrategias que disminuyan transmisión e

incidencia del virus en la población, así como al tratamiento oportuno de la enfermedad.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la pandemia de COVID 19 es una emergencia de salud pública, según la gerencia regional de salud en el departamento del Cusco, desde el inicio de la pandemia hasta setiembre del 2022 se realizaron 1 197 187 pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 de las cuales solo el 7.29% fueron pruebas moleculares (GERESA-CUSCO, 2022).

Para apoyar el diagnóstico y vigilancia epidemiológica se viene usando pruebas rápidas inmunocromatográficas, pero la aplicación de estas depende de la etapa de la infección que tiene el paciente al momento de ser empeladas por lo que aumenta el riesgo de obtener falsos negativos, asimismo no ofrecen un alto grado de sensibilidad y especificidad como las pruebas moleculares.

La principal prueba molecular que se realiza tanto a nivel regional como a nivel nacional es la RT-qPCR pero la complejidad del equipo y el elevado costo de los reactivos que se necesita es una limitante que obliga a la centralización del diagnóstico molecular de COVID 19, debido a la gran demanda y la falta de equipamiento para realizar RT-qPCR, el diagnóstico molecular de COVID 19 se encuentra saturado por lo que se necesita una alternativa más accesible que contribuya descentralizar el diagnóstico molecular, por lo tanto se presenta a la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR como una alternativa más accesible para el diagnóstico de COVID 19. En base a lo expuesto generamos la siguiente interrogante:

¿La SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR dirigida a los genes de la nucleocápside y la envoltura podría ser versátil para el diagnóstico de SARS-CoV-2?

### JUSTIFICACIÓN

Debido a la pandemia causada por el virus SARS CoV-2 se puso en evidencia la falta de acceso a pruebas moleculares para el diagnóstico de COVID 19 en la región del Cusco y a nivel nacional, la importancia de las pruebas moleculares viene dada por su elevada sensibilidad y especificidad, las pruebas moleculares son capaces de detectar infecciones asintomáticas y con baja carga viral que podrían contribuir a la propagación del virus, en base a lo expuesto se evidencia la necesidad de una prueba molecular altamente sensible y de mayor acceso para los centros de salud de la región del Cusco.

En el presente trabajo se desarrolló una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR utilizando cebadores dirigidos a los genes E y N del virus SARS-CoV-2, este método utiliza más de dos cebadores y consiste en una amplificación inicial seguida de una segunda amplificación utilizando cebadores internos ubicados dentro del primer segmento amplificado, esta segunda amplificación le añade mayor sensibilidad a la técnica en comparación con otros tipos de PCR. la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR representa una alternativa más accesible que la RT-qPCR debido a que utiliza un termociclador convencional y reactivos de menor costo.

Para contribuir con la vigilancia epidemiológica y descentralización del diagnóstico molecular del COVID-19, el presente trabajo propone a la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR como una prueba molecular alternativa y de mayor acceso para tener resultados oportunos y confiables en la detección del virus SARS CoV-2.

## **OBJETIVOS DE ESTUDIO**

## **Objetivo general:**

• Validar una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para el diagnóstico de la COVID-19 producida por SARS-CoV-2, en la región del Cusco.

### **Objetivos específicos:**

- Diseñar y seleccionar cebadores dirigidos a la amplificación de fragmentos de los genes E y N, utilizando secuencias del genoma del virus SARS-CoV-2 reportados en el NCBI.
- Estandarizar la técnica de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para la amplificación de fragmentos de los genes E y N del virus SARS-CoV-2.
- Determinar el límite de detección de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.
- Determinar el valor diagnóstico de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la concordancia con la RT-qPCR.

## HIPÓTESIS

La SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR detecta al virus SARS CoV-2 y tiene una muy buena concordancia con la RT-qPCR.

### Variables Independientes

- Cebadores seleccionados y diseñados.
- Concentración de los cebadores.
- Concentración de ADN polimerasa
- Temperatura de hibridación de los cebadores en la reacción de SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.
- Cantidad de muestra a amplificar.

### Variables Dependientes

- Tamaño de los productos de amplificación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.
- Número de copias/reacción detectadas.
- Sensibilidad.
- Especificidad.

### CAPITULO I

#### MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.

La Rosa et al. (2021). Describieron un ensayo de RT-PCR anidado capaz de identificar las variantes Alfa, Beta, Gamma y Delta de SARS CoV-2 en Italia. Diseñando cebadores específicos dirigidos a las mutaciones en el gen de la espícula (S), analizaron 31 muestras clínicas fueron obtenidas por hisopado (7 fueron secuenciadas mientras que las 24 restantes no estaban caracterizadas), identificaron exitosamente el 93% de las muestras procesadas (29 muestras), concluyendo que los ensayos de PCR anidados son una buena alternativa para la identificación rápida de variantes de SARS CoV-2 en muestras con baja cantidad y calidad de ARN.

**Corman et al. (2020).** En Inglaterra desarrollaron un protocolo de RT-PCR en tiempo real utilizando grupos de cebadores diseñados a partir de los genes RdRp, E, y N. Determinaron que para trabajos de rutina es recomendable la amplificación del gen E seguido de una prueba de confirmación mediante la amplificación del gen RdRp, establecieron que el límite de detección de los conjuntos de cebadores fue de 5,2 copias/reacción para el gen E y 3,8 copias/reacción para el gen RdRp.

**Ishige et al. (2020).** En Japón desarrollaron una metodología de RT-PCR MULTIPLEX en tiempo real utilizando cebadores diseñados a partir del gen E (E\_Sarbeco) específico del sarbecovirus, el gen N (NIID-N) específico del SARS-CoV-2 y el gen ABL1 humano como control interno. Determinaron que NIID-N y E\_Sarbeco son una buena combinación para detectar dos regiones del genoma del SARS-CoV-2 con alta sensibilidad. Recomendaron el uso del gen ABL1 humano como control interno sobre otros genes como ACTB y GAPDH de *Homo sapiens*, debido a que estos últimos se expresan más abundantemente que ABL1, y en PCR múltiplex esto podría reducir la sensibilidad de la prueba. Resaltaron también que la sensibilidad de la PCR se ve afectada por factores como el método de extracción de ácidos nucleicos, los reactivos de RT-PCR de un solo paso y los conjuntos de cebadores y sondas.

**Park et al. (2020).** En República de Corea desarrollaron una serie de protocolos de PCR basados en la PCR convencional, qPCR, PCR MULTIPLEX y qPCR MULTIPLEX, utilizando cebadores diseñados a partir de los genes diana (RdRP, N, E y S) de Sars CoV-2. Para el control de amplificación del ADNc diseñaron cebadores a partir de los genes ACTB, TBP, ARNr 18S y GAPDH de Homo sapiens. Para evaluar la precisión y eficacia de los cebadores realizaron una PCR usando 5 ng de ADNc de SARS-CoV-2 y una temperatura de hibridación creciente de 50 °C a 65 °C en base a las Tm de cada juego de cebadores.

Concluyendo que los cebadores diseñados deben ser optimizados para evitar resultados falsos positivos y que los protocolos basados en la qPCR permiten ver la amplificación de la reacción en tiempo real, pero requiere un termociclador más costoso mientras que los protocolos basados en PCR convencional son de mayor acceso y fácil disponibilidad, pero requieren adicionar un paso de electroforesis en gel.

Yip et al. (2020). Desarrollaron dos protocolos de Single-tube nested RT-PCR (STN RT-PCR) en tiempo real para la detección de Sars CoV-2 en la República Popular China, utilizaron cebadores diseñados a partir de los genes RdRp / Hel (STN COVID-19-RdRp/Hel) y del gen N (STN COVID-19-N). Entre 108 muestras que dieron negativo para ensayos COVID-19-RdRp/Hel no anidado, 28 muestras dieron positivo para SARS-CoV-2 cuando fueron sometidas a los ensayos anidados STN COVID-19-RdRp/Hel o STN COVID-19-N. Para evaluar el rendimiento de los ensayos STN crearon 4 grupos de 50 muestras cada uno, cada grupo estaba conformado por 1 muestra positiva de baja carga viral y 49 muestras negativas, donde, el ensayo COVID-19-RdRp/Hel no anidada logró detectar la muestra positiva en sólo uno de los 4 grupos, mientras que ambos ensayos STN lograron detectar la muestra positiva en dos de los 4 grupos de muestras. Concluyeron que los ensayos de RT-PCR en tiempo real se ven limitados por muestras que poseen carga viral baja, esta limitante puede ser superada con la alta especificidad y sensibilidad que ofrece la PCR anidada (nested PCR).

**Wang et al. (2020).** En la República Popular China desarrollaron un nuevo ensayo de RT-PCR en tiempo real anidado de un solo paso basado en el ácido nucleico bloqueado (OSN-qRT-PCR) para la detección de SARS CoV-2 dirigido a los genes ORF1ab y N. Evaluaron el rendimiento del ensayo OSN-qRT-PCR en 181 muestras, donde, la RT-PCR en tiempo real detectó 25 positivas, mientras que el ensayo OSN-qRT-PCR detectó 39 positivas. Concluyendo que la RT-PCR en tiempo real puede dar resultados falsos negativos que pueden ser detectados gracias a la mayor sensibilidad de la PCR anidada.

**Nalla et al. (2020).** En los Estados Unidos de América realizaron una comparación de los ensayos de detección de SARS-CoV-2 utilizando siete juegos de cebador-sonda diferentes, denominados: N-gen, RdRp, E-gen Corman, CDC N1, CDC N2, CDC N3 y RdRp UW. Para todos los conjuntos de cebador-sonda, realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real usando el kit AgPath-ID One Step RT-PCR. Concluyeron que, si bien todos los ensayos fueron altamente específicos, los que utilizan los conjuntos de sonda-cebador de CDC N2 y E- gen Corman son más sensibles que el resto.

**Reina & Suarez. (2020).** En España evaluaron la capacidad de detección del SARS-CoV-2 mediante la amplificación de los genes N, RdRp y E por RT-PCR en tiempo real, realizaron la toma de muestra a 200 pacientes positivos para SARS-CoV-2 al inicio y al final de la infección, y evidenciaron que, al inicio de la infección, la amplificación de los genes E y RdRp es mayor a la del gen N, pero, estos papeles se invierten en etapas finales de la infección, donde la amplificación del gen N es mayor a la de los genes E y RdRp, Reina & Suarez sugieren que en la cinética replicativa del SARS-CoV-2 la disminución de la detección del gen RpRd indica la perdida de la capacidad replicativa del virus en etapas finales de la infección mientras que el incremento en la detección del gen N se debe a restos de virus no viables.

### 1.2. GENERALIDADES

## 1.2.1. CORONAVIRUS TIPO 2 DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO SEVERO (SARS COV-2).

Según la Organización Mundial de la Salud, el SARS-CoV-2, forma parte de los siete coronavirus capaces de infectar al hombre, en comparación con los coronavirus HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E y HCoV-OC43 que producen infecciones leves, el SARS-CoV-2, MERS-CoV y SARS-CoV-1 además de ser de origen zoonótico son mucho más virulentos que el resto de coronavirus.

#### 1.2.2. Ubicación taxonómica.

La familia *Coronaviridae* está conformada por los géneros: *Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*, estos virus poseen ARN de cadena simple y sentido positivo, además pueden causar infecciones digestivas, hepáticas, respiratorias con un grado de virulencia variable en diversas especies animales incluyendo al hombre, entre los virus de la familia Coronaviridae destaca el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), ambos pertenecientes al género *Betacoronavirus* (Cortés, 2020), desde el 2020 el Comité Internacional De Taxonomía De Virus ha incluido al SARS CoV-2 en el género de los *Betacoronavirus*.

Ubicación taxonómica del SARS CoV-2 según el Comité Internacional De Taxonomía De Virus (ICTV, 2020).

Reino: Orthornavirae Phylum: Pisuviricota Clase: Pisoniviricetes Orden: Nidovirales Suborden: Cornidovirineae Familia: Coronaviridae Subfamilia: Orthocoronavirinae Género: Betacoronavirus Subgénero: Sarbecovirus Especie: SARS CoV-2

### 1.2.3. Estructura del SARS CoV-2.

El virión de SARS CoV-2 mide de 60nm a 140nm de diámetro y presenta espigas de 9nm a 13nm de longitud (Zhu *et al.*, 2020), las principales proteínas estructurales son: la proteína de membrana, la proteína de la espiga y la proteína de la envoltura, estas proteínas se encuentran en la envoltura externa conformada por una bicapa de fosfolípidos donde se encuentra insertada la nucleocápside que encierra el genoma viral, la estructura del virión de SARS CoV-2 se muestra en la figura 1 (Pastrian, 2020).

### Figura 1.



Estructura del virión de SARS CoV-2.

Nota. Obtenido de "SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento", de Santos *et al*, 2020.

## 1.2.4. Genoma del SARS CoV-2.

El genoma de SARS CoV-2 mide cerca de 27 000 y 30 000 pb, en el extremo 5' presenta un capuchón metilado y una cola poli A en el extremo 3' semejante al ARN mensajero eucariota, la proteína no estructural ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se encuentra codificada en los dos primeros tercios del genoma por los ORF1a y ORF1b, mientras que las proteínas estructurales de membrana (M), spike (S), nucleocápside (N) y envoltura (E) se encuentran codificadas en el último tercio del genoma junto a otras proteínas accesorias como la proteína 7a y Hemaglutinina Esterasa (HE), el esquema del genoma de SARS CoV-2 se presenta en la figura 2 (Pastrian, 2020).

## Figura 2.

Esquema del genoma de SARS CoV-2.



Nota. Obtenido de "SARS coronavirus 2: from genoma to infectome", de Rastogi et al., (2020).

## 1.2.5. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2.

La proteína de la espiga del SARS CoV-2 interacciona con la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA2), debido a esto se presentan cambios estructurales que posibilitan la unión de la membrana viral que ingresa a la célula del hospedero por endocitosis, una vez el virión se encuentra en el citoplasma libera el genoma viral, los ribosomas traducen el genoma de SARS CoV-2 dando origen al complejo proteico llamado ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) el cual está conformado por una variedad de proteínas no estructurales, el RdRp replica el ARN genómico del virus para la progenie y transcribe el ARM mensajero del SARS CoV-2 para dar origen a las proteínas estructurales que conforman al virión (Saltigeral & León, 2020), el mecanismo de infección y replicación del SARS CoV-2 se representa en la figura 3.

## Figura 3.

Infección y replicación del SARS CoV-2.



Nota. Adaptado de "Mecanismo de infección por coronavirus y ciclo de replicación.", de Acter *et al.* (2020).

### 1.2.6. Variantes del SARS-CoV-2.

La organización mundial de la salud (WHO, 2021), ha clasificado las variantes del SARS-CoV-2 en dos grupos:

### 1.2.6.1. Variantes de interés (VOI)

Se caracterizan por cambios genéticos que según se pronostica podrían alterar propiedades del virus como transmisión, gravedad de la infección, escape inmunológico, del diagnóstico u otros factores epidemiológicos que indiquen un riesgo para la salud pública. Las variantes del SARS-CoV-2 que se clasifican como VOI se presentan en la tabla 1 (WHO, 2021).

### Tabla 1.

Etiqueta	Pango	Primeras muestras	Fecha de		
OMS	linajes	documentadas	designación		
Eta	B1.525	Varios países, diciembre	17 de marzo del		
		del 2020	2021		
lota	B526	Estados Unidos de	24 de marzo del		
		América, noviembre del	2021		
		2020			
Карра	B.1.617.1	India, octubre del 2020	4 de abril del		
			2021		
Lambda	C.37	Perú, diciembre del 2020	14 de junio de		
			2021		
Mu	B.1.621	Colombia, enero del	30 de agosto		
		2021			

Variantes de interés de SARS-CoV-2.

## 1.2.6.2. Variantes de preocupación (VOC)

Son variantes de SARS-CoV-2 previamente clasificadas como VOI que tras ser evaluadas han demostrado tener relación con el aumento de la transmisión, gravedad de la infección. Como consecuencia se observa una disminución de la eficiencia de tratamientos, vacunas o medidas sociales. Hasta el 6 de julio del 2021 se tienen 6 variantes de SARS-CoV-2 clasificadas como VOC, las cuales se detallan en la tabla 2 (WHO, 2021).

### Tabla 2.

Etiqueta OMS	Pango linajes	Primeras muestras documentadas	Fecha de designación			
Alpha	B.1.1.7	Reino Unido, septiembre 2020	17 de marzo del 2021			
Beta	B.1.351 B.1.351.2 B.1.351.3	Sudáfrica, mayo 2020	24 de marzo del 2021			
Gamma	P.1 P.1.1 P.1.2	Brasil, noviembre 2020	4 de abril del 2021			
Delta	B.1.617.2 AY.1 AY.2	India, octubre 2020	14 de junio de 2021			
Omicrón	B.1.1.529	Varios países, noviembre 2021	26 de noviembre del 2021			

Variantes de preocupación de SARS-CoV-2.

## 1.2.7. Epidemiología del SARS-CoV-2 en el Perú y la región del Cusco

Según cifras del ministerio de salud MINSA-PERÚ desde el inicio de la pandemia hasta el 26 de setiembre del 2022 se han muestreado a un total de 35 092 019 de personas, de las cuales se tiene registrado 4 142 104 casos sintomáticos positivos para SARS-CoV-2 con 216 526 defunciones (Ministerio De Salud-MINSA, 2022).

Según la Gerencia Regional de Salud Cusco se ha registrado un total de 205 195 casos positivos con una tasa de letalidad de 2.25 %, la distribución espacial por número de casos en la región del Cusco se muestra en la figura 4 (MINSAdirección general de epidemiologia, 2022).

## Figura 4.



Distribución espacial de casos COVID en Cusco.

Nota. Adaptado de Distribución temporal y espacial de los casos de covid-19 en Cusco, de Dirección general de epidemiologia (2022).

### 1.2.7.1. Transmisión

La organización mundial de salud señala que, según los datos científicos actuales el SARS-CoV-2 se transmite de una persona a otra mediante contacto directo, indirecto o cercano, principalmente por secreciones infectantes como las goticulas que se expulsan cuando una persona habla, canta, tose o estornuda en espacios cerrados con muy poca ventilación (WHO, 2020).

### 1.2.7.2. Periodo de incubación

Las manifestaciones clínicas de personas infectadas con SARS CoV-2 varían y pueden ir desde infecciones asintomáticas, con síntomas leves o hasta muy graves. Los principales síntomas que aparecen son: fiebre, fatiga, tos, dificultad para respirar, escalofríos, dolor de garganta, náuseas, dolor de cabeza, perdida de olfato y gusto, los síntomas se presentan entre el día 2 y 14 después de la exposición (CDC, 2021).

El SARS CoV-2 se encuentra en las vías respiratorias superiores hasta 3 días después de presentarse los síntomas posteriormente la presencia del virus disminuye gradualmente.

## 1.2.7.3. Variantes circulantes en la región del Cusco

Hasta julio del 2022 el Instituto Nacional de Salud del Perú ha realizado el secuenciamiento 17120 genomas de SARS CoV-2 clasificadas como VOC y 4101 genomas clasificados como VOI, las variantes de SARS CoV-2 que circulan en el territorio nacional son:

Variantes de interés (VOI). Lambda y Mu.

Variantes de preocupación (VOC). Gamma, Delta, alfa y ómicron. En la región del Cusco se observa la predominancia de la variante lambda con 179 muestras y Delta con 143 muestras. La variante de interés lambda y la variante de preocupación Delta son las más abundantes tanto a nivel regional como nacional tal como muestra la tabla 3. (INS, 2022).

# Tabla 3.

Muestras secuenciadas por regiones del Perú hasta el mes de julio del 2022.

CLASIFICACIÓN		Variant	tes de Prec	cupación		Varian	tes de In	terés	Variant seguii	es bajo niento	total
REGIÓN	ALFA	DELTA	GAMMA	OMICRON	Total	LAMBDA	MU	Total	IOTA	Total	
Amazonas	0	102	53	119	274	90	2	92	0	0	366
Ancash	0	222	26	322	572	175	4	179	0	0	751
Apurimac	0	128	64	235	428	102	1	103	0	0	531
Arequipa	0	155	91	302	548	431	6	437	0	0	985
Ayacucho	1	161	21	116	299	138	16	154	0	0	453
Cajamarca	0	343	79	310	734	187	34	221	0	0	955
Callao	0	216	44	137	398	61	8	69	2	2	469
Cusco	0	143	48	477	670	179	1	180	0	0	850
Huancavelica	0	58	13	96	167	35	1	36	0	0	203
Huanuco	0	122	50	124	296	107	1	108	0	0	404
lca	0	268	39	199	506	105	8	113	0	0	619
Junin	1	272	61	340	674	163	8	171	0	0	845
La libertad	0	212	48	195	455	169	8	177	1	1	633
Lambayeque	0	296	65	140	502	115	7	122	0	0	624
Lima	3	1738	484	4430	6680	814	107	921	1	1	7602
Loreto	0	19	238	107	365	10	0	10	0	0	375
Madre de Dios	1	90	25	203	319	147	11	158	0	0	477
Moquegua	0	129	22	157	308	129	11	140	1	1	449
Pasco	0	148	40	91	279	72	0	72	0	0	351
Piura	1	392	25	515	938	143	1	144	3	3	1085
Puno	1	33	6	52	92	58	0	58	0	0	150
San Martin	0	78	160	53	291	86	1	87	0	0	378
Tacna	0	288	29	286	604	157	6	163	0	0	767
Tumbes	11	125	21	122	279	121	8	129	0	0	408
Ucayali	0	104	105	211	421	57	0	57	0	0	478
TOTAL	19	5842	1857	9339	17100	3851	250	4101	8	8	21208

## 1.3. PRUEBAS RAPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE COVID 19.

## 1.3.1. Pruebas rápidas COVID IgM/IgG.

Las pruebas rápidas COVID IgM/IgG son ensayos cualitativos que se sustentan en la detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS CoV-2, dichos anticuerpos se detectan en muestras de sangre, suero o plasma, el casete contiene antígenos específicos que reaccionan con los anticuerpos presentes en la sangre, para que se forme el complejo antígeno-anticuerpo la muestra se desplaza por una membrana de nitrocelulosa hasta encontrarse con las bandas que contienen anti IgG e IgM humana, la interpretación de los resultados se muestra en la figura 5 (INS, 2020).

### Figura 5.

Interpretación de resultados de las pruebas rápidas inmunocromatográficas.



Nota. Obtenido de Instituto nacional de salud (2020).

#### 1.3.2. Prueba rápida para la detección de antígenos de SARS CoV-2.

Por lo general las pruebas rápidas para la detección de antígeno de SARS CoV-2 se basan en la inmunodetección tipo sándwich, se utiliza un casete de plástico que contiene una matriz de nitrocelulosa, donde se encuentran anticuerpos específicos dirigidos principalmente al antígeno de la nucleocápside del virus, generalmente se aplica cuando el virus se encuentra en las vías respiratorias superiores, entonces la muestra es obtenida por hisopado nasal. Una vez obtenida la muestra los resultados pueden interpretarse entre los 10 y 30 minutos después de ser aplicada en el casete dependiendo de las instrucciones del kit (WHO, 2021).

## **1.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima ADN polimerasa, los oligonucleótidos o primers en concentraciones de 0.1 a 0.5 mM, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) de 0.2 a 1mM, el ión magnesio (Mg <sup>+2</sup>) en concentraciones entre 0.5 a 2.5 mM, una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Bolivar & Rojas, 2014).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios, et al. 2013).

### **1.5. VARIANTES DE LA PCR.**

### 1.5.1. PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real es una modificación de la PCR convencional, la principal ventaja de esta técnica viene dada por la detección de los productos amplificados que se da en cada ciclo de amplificación, también es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, por lo tanto, no es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa como en la PCR convencional. Cuando la plantilla es ADN propiamente dicho se denomina qPCR, pero cuando la plantilla es ARNm, se requiere un paso adicional de transcripción reversa del ARN para obtener ADNc adoptando la denominación de RT-qPCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La observación de los amplicones se da mediante la detección de:

**Agentes intercalantes** principalmente SYBR Green que presentan afinidad por el ADN y emiten fluorescencia al unirse a la doble cadena, la fluorescencia emitida es proporcional al amplicón obtenido en cada ciclo.

**Sondas específicas**. Están basadas en el principio Flourescence Resonance Energy Transfer (FRET) que consiste en la transferencia energética entre un donador y un aceptor que cuando se aproximan emiten fluorescencia a diferente longitud de onda, el aceptor absorbe la fluorescencia del donador y al separarse dicha fluorescencia es captada por el fotodetector. Los sistemas de detección son por sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla.

El valor Ct (Cycle threshold) o ciclo umbral, es el número de ciclos de PCR a partir del cual la señal de fluorescencia es detectable, el valor Ct indica cuantos ciclos son necesarios para detectar el ADN. Entre mayor sea la cantidad de ADN en la muestra el valor Ct será menor.

Según la Organización Mundial de la Salud (2020), para diagnosticar una muestra como positiva para SARS CoV-2 la amplificación debe ir dirigida a dos regiones diferentes del genoma, los principales genes diana son N, E, S y RdRp.

### 1.5.2. NESTED PCR.

La Nested PCR es una modificación de la PCR convencional, la principal ventaja que presenta este método es el aumento de sensibilidad y especificidad de la PCR, se utiliza principalmente cuando se amplifica ADNc de un ARNm presente en muy baja cantidad, generalmente en una muestra clínica que contiene diferentes tipos de células (Sambrook & Russel, 2012).

La Nested PCR se basa en dos amplificaciones sucesivas, donde, la primera reacción de amplificación se realiza utilizando cebadores externos, el producto resultante de la primera reacción de amplificación es utilizado como plantilla de ADN para una segunda amplificación, la segunda amplificación utiliza cebadores internos complementarios a secuencias que se encuentran dentro del primer segmento amplificado, este proceso se muestra en la figura 6.

#### Figura 6.

Representación gráfica de la Nested PCR.



En la SEMI-NESTED-PCR el cebador *forward* de la primera PCR es utilizado de igual manera en la segunda amplificación, se utiliza un cebador *reverse* diferente al de la primera PCR para obtener un producto de menor tamaño que el de la primera PCR.

## **1.6. DISEÑO DE CEBADORES**

Según Sambrook & Russel (2012), los cebadores óptimos deben cumplir con ciertas características tales como un contenido de CG entre 40 y 60%, los cebadores deben tener una longitud entre 18 y 30 pb debido a que una longitud inferior a 18 nucleótidos tiende a unirse de forma inespecífica al ADN molde y una longitud mayor a 30 nucleotidos tiende a formar estructuras secundarias como bucles u horquillas, Sambroock & Russel (2012) indican que la

Temperatura de melting (Tm) también no debe diferir en más de 3°C entre los cebadores

Park *et al.*, (2020), sugieren que como primer paso para el diseño de Cebadores se debe seleccionar la secuencia diana a amplificar, como segundo paso se debe verificar *in silico* el cebador para descartar la formación de estructuras secundarias, para estimar la tendencia que tienen los cebadores a formar estructuras secundarias se debe calcular el valor de la energía libre de Gibbs siendo así que un valor cercano a 0 indica que la formación de estructuras secundarias no ocurrirá de forma espontánea, como tercer y último paso se debe optimizar experimentalmente la temperatura de hibridación de los cebadores entre 50 y 65 °C.

## 1.7. VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS.

Según Márquez *et al.* (2015) La validación de las pruebas diagnósticas debe seguir varias etapas, dentro de las que se encuentran las siguientes:

**Etapa 1. Determinación de las características analíticas:** En este paso se determina la especificidad analítica, que permite separar el analito buscado y los componentes de la muestra, y la sensibilidad analítica (límite de detección). la detección directa puede ser el número de copias del genoma.

**Etapa 2. Determinación de las características diagnósticas:** En esta etapa se realiza una validación retrospectiva, en este caso la muestra contiene una representación adecuada del espectro del proceso que se diagnostica. Este diseño puede evaluar la capacidad discriminativa. Los valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas son los parámetros más importantes en la validación de la prueba. Estas estimaciones son la base para el cálculo de otros parámetros utilizados para sacar conclusiones sobre los resultados de las pruebas (por ejemplo, los valores predictivos de los resultados positivos y negativos de las pruebas).

**Etapa 3. Determinación de la Reproducibilidad:** Este estudio se lleva a cabo en sujetos todavía sin diagnosticar, constituyendo una cohorte que, tras la realización de la prueba a validar, se sigue hasta alcanzar el diagnóstico definitivo por otros medios.

Según Carnero (2005) al terminar la validación de Fase 3, suponiendo que las 3 fases se hayan superado satisfactoriamente, la prueba puede considerarse "validada para

el propósito inicial deseado". El que se mantenga esta designación depende de si se lleva a cabo un seguimiento continuo del rendimiento de la prueba para asegurar que se conservan las características de rendimiento tal como se definieron durante la validación.

Según el "Documento técnico: lineamientos de validación de procedimientos diagnósticos del SARS CoV-2" emitido por el INS (2020), los estudios para determinar el desempeño de un procedimiento diagnóstico son:

A. Los estudios de validación de desempeño analítico

B. Los estudios de validación del desempeño clínico.

Los estudios de validación del desempeño analítico evalúan la capacidad de un procedimiento diagnóstico para detectar o medir un analito en particular, entre los parámetros que se evalúan se encuentra la sensibilidad analítica que se entiende como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad.

Los estudios de validación de desempeño clínico evalúan la capacidad del método o procedimiento para producir resultados que estén correlacionados con una condición en una población objetivo y usuario previsto, los parámetros que se evalúan son: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

El número recomendado de muestras a analizar para la validación analítica del procedimiento es 150, de las cuales 50 (mínimo de 25) son positivas a la prueba de referencia y 100 (mínimo de 50) son negativas a la prueba de referencia.

## **1.8. VALOR DIAGNOSTICO DE UNA PRUEBA**

Según Santabárbara (2016). la evaluación de una prueba diagnóstica se debe realizar comparando los resultados con un patrón de referencia el cual es una prueba de eficacia conocida denominada estándar de oro, la relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de la enfermedad se realiza en base a la tabla 4.
## Tabla 4.

Análisis de una prueba diagnóstica.

		Verdadero diagnóstico		
		Patrón de referencia		
		enfermo	sano	TOTAL
Prueba diagnóstica	positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)	VP+FP
	negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)	FN+VN
	TOTAL	VP+FN	FP+VN	VP+FN+FP+VN

Nota. Relación de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de la enfermedad.

## Donde:

Verdadero positivo (VP): La enfermedad está presente y la prueba lo clasifica como positivo.

Falso positivo (FP): La enfermedad no está presente y la prueba lo clasifica como positivo.

**Verdadero negativo (VN):** La enfermedad no está presente y la prueba lo clasifica como negativo.

Falso negativo (FN): La enfermedad está presente y la prueba lo clasifica como negativo.

En ese sentido las condiciones exigibles para determinar la validez de una prueba diagnóstica son:

## 1.7.1. Validez interna

La validez interna es el grado en que una prueba diagnóstica clasifica correctamente a los individuos enfermos y sanos, la validez interna de la prueba diagnóstica está determinada por la sensibilidad y especificidad.

**Sensibilidad:** Es la probabilidad que tiene la prueba de clasificar a un individuo enfermo con un resultado positivo.

#### Sensibilidad

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

**Especificidad:** Es la probabilidad que tiene la prueba de clasificar a un individuo sano con un resultado negativo.

#### Especificidad

$$Es = \frac{VN}{VN + FP}$$

#### 1.7.2. Validez externa

La validez externa se refiere al grado en que los resultados de una prueba diagnóstica pueden generalizarse a otros grupos de estudio o poblaciones, la validez externa está determinada por el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.

**Valor predictivo positivo:** Se define como la probabilidad de que un individuo presente la enfermedad si obtuvo un resultado positivo en la prueba.

#### Valor predictivo positivo

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

**Valor predictivo negativo:** Se define como la probabilidad de que un individuo no presente la enfermedad si obtuvo un resultado negativo en la prueba.

#### Valor predictivo negativo

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

#### CAPITULO II

#### MATERIALES Y METODOS.

La realización del presente estudio se encuentra enmarcado dentro del proyecto de investigación "Estudio de genomas de SARS-CoV-2 y su aplicación para el diseño de nuevos sistemas de diagnóstico aplicados a la región de Cusco", concedido por el Vicerrectorado de investigación a través del Convenio Nº 007-2020-UNSAAC, y en el cual participan diversas instituciones como son la Gerencia Regional de Salud de Cusco, el Instituto Nacional de Salud de Perú, la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (México), la Universidad de La Laguna (España), la empresa Nertalab (España), la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima) y la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. La realización de los estudios cuenta con la aprobación del director de la Gerencia de Salud de Cusco, y con la aprobación del Comité de Bioética Institucional en investigación de la UNSAAC.

Las 152 muestras empleadas en el presente estudio han sido proporcionadas por el laboratorio de biología molecular para el diagnóstico de COVID-19 de la GERESA como parte del diagnóstico realizado a las personas con síntomas o sin ellos, bajo orden médica y han acudido a realizarse a los diferentes centros de salud de la región.

## 2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

La presente investigación fue de tipo experimental.

## 2.2. ÁREA DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Las 152 muestras utilizadas en el presente trabajo de investigación fueron obtenidas y procesadas de acuerdo a los protocolos de la GERESA-CUSCO, el diagnóstico por biología molecular (RT-qPCR) fue realizado por los profesionales de la salud del laboratorio de Biología Molecular del centro de salud de Accamana (San Jerónimo, Cusco), siguiendo los protocolos estándar de diagnóstico de SARS-CoV-2, la extracción de ARN fue realizada por el personal de salud de la GERESA-CUSCO con el kit TANbead (TANbead, Taiwan T.O.C) como parte del diagnóstico realizado de rutina.

#### 2.3. LUGAR DE EJECUCIÓN.

Los procedimientos de estandarización y validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se realizaron en el laboratorio de genética y biotecnología microbiana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

## 2.4. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico fue proporcionado por la GERESA-CUSCO, siguiendo los parámetros descritos en el "Documento técnico: lineamientos de validación de procedimientos diagnósticos del SARS CoV-2" emitido por el INS (2020), se seleccionaron 152 muestras de ARN que estaban conformadas de la siguiente forma: 39 muestras de ARN extraído de pacientes positivos por RT-qPCR y 113 muestras de pacientes negativos para COVID-19 por RT-qPCR, las 152 muestras fueron recolectadas y transportadas en hielo seco entre el 13 y 17 de agosto del 2021.

## 2.5. MATERIAL DE LABORATORIO

#### 2.5.1. Equipos

- Termociclador (Marca: Eppendorf, Modelo: Mastercycler nexus gradient)
- Cabina de bioseguridad (Marca: Biobase, modelo: BSC-1300IIA2-X)
- Centrifuga (Marca: Eppendorf, Modelo: Centrifuge 5418)
- Balanza analítica (Marca: Ohaus)
- Fuente de poder (Marca: Cleaver, Modelo: Power Pro-300)
- Congelador -20°C
- Micropipetas de 10µL, 20µL, 100µL y 1000µL (Marca: Epependorf).
- Transiluminador UV (Marca: Vilder Lourmat)
- Molde para electroforesis de 20x15cm (Cleaver Scientific)

## 2.5.2. Reactivos

- 2019-nCoV-PCR-Enzyme Mix (kit Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit PCR-Fluorescence Probing, Sansure biotech)
- ARN sintetico de SARS CoV-2 (Biorad)
- Nova Taq Hot Start DNA polimerase (Novagen)
- Cloruro de magnesio MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Novagen)
- Buffer de PCR 10X (Novagen)
- Buffer TBE 5X
- Desoxirribonucleótidos: dATP; dGTP; dCTP; dTTP (Promega)
- Agarosa (Agarosa Estándar media EEO, OmniPur)
- Tampón de Carga 6X (Promega)
- Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen)
- DNA Ladder 100pb (Promega)
- SYBR Safe DNA gel stain (invitrogen)
- Agua bidestilada estéril
- Cebadores diseñados y seleccionados (Merk)

## 2.5.3. Consumibles y Fungibles

- Guantes de nitrilo
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Puntas con filtro para micropipetas de 0.5 -10  $\mu$ L, 10 100  $\mu$ L y de 100 1000  $\mu$ L
- Tubos de PCR de 0.2 ml.

## 2.5.4. Herramientas bioinformáticas online

- https://primer3plus.com/.
- https://www.idtdna.com/calc/analyzer.
- http://insilico.ehu.es/mini\_tools/PCR/

## 2.5.5. Programas informáticos

- Mega X versión 11.0.10
- IBM SPSS statistics 21

## 2.5.6. Bases de datos

• National Center for Biotechnology Information (NCBI)

## 2.6. METODOLOGÍA

## 2.6.1. Diseño y selección de cebadores

## 2.6.1.1. Selección de cebadores

- Se seleccionó un conjunto de cebadores dirigidos a los genes E y N reportados en las investigaciones de Corman et al. (2020); Jalali *et al.* (2020); Guan *et al.* (2020); Hogan *et al.* (2021); Hadjinicolaou *et al.* (2011); Lu *et al.* (2021); Chaibun *et al.* (2020); Lopez *et al.* (2021).

## 2.6.1.2. Diseño de cebadores

- El diseño de cebadores se realizó considerando las pautas sugeridas por Park *et al.* (2020).

- Se diseñaron 2 cebadores forward en base al gen E de la secuencia de referencia reportada en Wuhan con código de acceso NCBI: NC\_045512.2, se utilizó la herramienta bioinformática en línea primer3plus (https://primer3plus.com/).

 Para analizar la presencia de estructuras secundarias como homodímeros y heterodímeros que pueden provocar secuestro de los cebadores se utilizó la herramienta bioinformática online Oligoanalyzer (https://www.idtdna.com/calc/analyzer).

 Para determinar los tamaños de los amplicones esperados, los cebadores seleccionados y diseñados se analizaron con la herramienta bioinformática en línea http://insilico.ehu.es/mini\_tools/PCR/ (anexo 8).

- Finalmente para corroborar que las secuencias de los cebadores no difieran con sus respectivas secuencias diana, se compararon los cebadores seleccionados y diseñados con 86 secuencias de SARS CoV-2 reportadas para Perú en el NCBI con el programa bioinformático MEGA X versión 11.0.10.

El conjunto total de cebadores dirigidos al gen E y N fueron sintetizados y entregados por MERK PERUANA S.

## 2.6.2. Diseño de la SEMI-NESTED-PCR

La preparación de las mezclas maestras para la retrotranscripcion, 1<sup>ra</sup> PCR y 2<sup>da</sup> PCR se realizó en la cabina de bioseguridad clase II (BIOBASE) previamente irradiada con luz UV por 15 minutos, para cada uno de los ensayos se utilizó una muestra de ARN sintético de SARS-CoV-2.

## 2.6.2.1. FLUJOGRAMA



#### 2.6.2.2 Ensayo Preliminar de los Cebadores Diseñados

Según el análisis bioinformático de los cebadores se seleccionaron 4 cebadores *forward* y 4 cebadores *reverse* dirigidos al gen E, se combinaron en 12 conjuntos de cebadores para determinar cuál de las combinaciones tenía una amplificación exitosa en la SEMI-NESTED-PCR, de igual forma se probó 1 cebador *forward* y 2 cebadores *reverse* dirigidos al gen N, las combinaciones de los cebadores que se utilizaron en cada ensayo se muestran en la tabla 5. Cada sistema de reacción está conformado por 3 pasos:

- A. Transcripción reversa
- B. Primera PCR
- C. Segunda PCR

## Tabla 5.

Conjuntos de cebadores dirigidos al gen E y N para cada sistema de reacción.

CONJUNTO	TRANSCRIPCION REVERSA		1 <sup>ra</sup> PCR			2 <sup>da</sup> PCR	
DE CEBADORES	CEBADOR REVERSE	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE EXTERNO	TAMAÑO DEL AMPLICON	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE INTERNO	TAMAÑO DEL AMPLICON
P1	R_E26176	F_E26080	R_E26176	116pb	F_E26080	R_E26161	101pb
P2	E_SARBECO_R	F_E26080	E_SARBECO_R	127pb	F_E26080	R_E26176	116pb
P3	R_E26268	F_E26080	R_E26268	213pb	F_E26080	E_SARBECO_R	127pb
P4	R_E26176	F_E26085	R_E26176	111pb	F_E26085	R_E26161	96pb
P5	E_SARBECO_R	F_E26085	E_SARBECO_R	122pb	F_E26085	R_E26176	111pb
P6	R_E26268	F_E26085	R_E26268	208pb	F_E26085	E_SARBECO_R	122pb
P7	R_E26176	E_SARBECO_F	R_E26176	102pb	E_SARBECO_F	R_E26161	87pb
P8	E_SARBECO_R	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb	E_SARBECO_F	R_E26176	102pb
P9	R_E26268	E_SARBECO_F	R_E26268	199pb	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb
P10	R_E26176	F_E26131	R_E26176	65pb	F_E26131	R_E26161	50pb
P11	E_SARBECO_R	F_E26131	E_SARBECO_R	76pb	F_E26131	R_E26176	65pb
P12	R_E26268	F_E26131	R_E26268	162pb	F_E26131	E_SARBECO_R	76pb
P13	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb

Los conjuntos de cebadores P1 hasta P12 tienen como diana el gen de la envoltura (E) mientras que el conjunto de cebadores P13 está dirigido al gen de la nucleocápside (N), los tamaños de los amplicones fueron calculados utilizando la herramienta en línea http://insilico.ehu.es/mini\_tools/PCR/.

## A. Transcripción Reversa

Para obtener ADNc a partir de las muestras de ARN se utilizó el mix de enzimas del *kit Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*, buffer de PCR 10 X (Promega) de uso comercial y dNTPs 25mM (Promega) de uso comercial.

Para asegurar que el ADNc obtenido corresponda a las secuencias de interés, se realizaron 13 reacciones independientes de retrotranscripción utilizando todos los cebadores *reverse* dirigidos al gen E y 1 cebador externo dirigido al gen N tal como se muestra en la tabla 5.

La reacción de retrotranscripción se realizó utilizando 5 µl de ARN sintético de SARSCoV-2, los componentes y concentraciones de la reacción de transcripción reversa se encuentran detallados en la tabla 6.

#### Tabla 6.

Transcripción Reversa				
Componentes	Concentración	Concentración Concentración		
	stock	final	1 reacción	
H2O			2.6 µl	
Buffer	10 X	1 X	1 µl	
dNTPs	10 mM	0.5 mM	0.5 µl	
Cebador reverse	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	
Mix de enzimas (retrotranscriptasa)			0.5 µl	
ARN			5 µl	
Volumen final			10 µl	

Componentes y concentraciones de la transcripción reversa.

La reacción de retrotranscripción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante a 50°C por 30 minutos.

## B. Primera PCR

El ADNc obtenido en la transcripción reversa, se utilizó para realizar 13 reacciones independientes para cada uno de los conjuntos de cebadores que se muestran en la tabla 5.

Para las reacciones de amplificación se utilizó el *kit comercial Nova Taq Hot Start DNA Polimerase*, las concentraciones iniciales de los componentes de la mezcla maestra se muestran en la tabla 7.

## Tabla 7.

1 <sup>ra</sup> PCR				
Componentes	Concentración Concentración		Volumen por 1	
	stock	final	reacción	
H <sub>2</sub> O			9 µl	
Buffer	10 X	1 X	2.5 µl	
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2.5 µl	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5 µl	
Forward	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Reverse externo	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Nova Taq Hot Start DNA Polimerase	5 U	2.5 U	0. 5 µl	
ADNc			5 µl	
Volumen total			25 µl	

Componentes y concentraciones del ensayo preliminar 1ra PCR.

## Condiciones de amplificación de la primera PCR

La enzima *Nova Taq Hot Start DNA Polimerasa* al ser una enzima de inicio en caliente requiere un tratamiento térmico adicional de 7 a 10 minutos a 95°C, el tratamiento térmico se realizo en todas las reacciones de amplificación.

El termociclador fue programado siguiendo las instrucciones del fabricante, las condiciones de amplificación que se detallan en la tabla 8.

## Tabla 8.

Condiciones de amplificación						
Tratamiento térmico	95°C	10 minutos				
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos				
	94°C	30 segundos				
30 Ciclos	64°C	30 segundos				
	72°C	30 segundos				
Extensión final	72°C	5 minutos				

Condiciones de amplificación del ensayo preliminar 1<sup>ra</sup> PCR.

## C. Segunda PCR

En la segunda ronda de amplificación se utilizó 1 µl del producto de la primera PCR de igual forma se realizaron 13 reacciones independientes con distintos conjuntos de cebadores como se muestran en la tabla 5.

Para las reacciones de amplificación se realizó un ensayo preliminar utilizando el kit comercial *Nova Taq Hot Start DNA Polimerase*, las concentraciones iniciales de los componentes de la mezcla maestra se muestran en la tabla 9.

#### Tabla 9.

ENSAYO PRELIMINAR DE LA 2 <sup>da</sup> PCR					
Componentes	Concentración	Concentración	Volumen por 1		
	stock	final	reacción		
H <sub>2</sub> O			9.4 µl		
Buffer	10 X	1 X	2.5 µl		
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2.5 µl		
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl		
Forward	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Reverse interno	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Nova Taq Hot Start DNA Polimerase	5 U	0.5 U	0. 1 µl		
Amplicon de la 1 <sup>ra</sup>			1 µl		
PCR					
Volumen total			25 µl		

Componentes y concentraciones del ensayo preliminar 2<sup>da</sup> PCR.

## Condiciones de amplificación de la segunda PCR

Se programó el termociclador según las condiciones de amplificación que se detallan en la tabla 10.

#### Tabla 10.

Condiciones de amplificación						
Tratamiento térmico	95°C	10 minutos				
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos				
	94°C	30 segundos				
30 Ciclos	64°C	30 segundos				
	72°C	30 segundos				
Extensión final	72°C	5 minutos				

Condiciones de amplificación del ensayo preliminar 2<sup>da</sup> PCR.

## 2.7.3. Ensayo preliminar de la SEMI-NESTED-MULTIPLEX PCR

Cada conjunto de cebadores dirigidos al gen E se combinaron con los cebadores F\_N28147, R\_N28742, R\_N28466 dirigidos al gen N tal como se muestra en la tabla 11, cada conjunto de cebadores se trabajó en reacciones independientes para determinar cuál de las combinaciones MULTIPLEX amplifica simultáneamente los dos genes diana.

# Tabla 11.

# Conjuntos de cebadores del ensayo preliminar SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.

	TRANSCRIPCION REVERSA		1 <sup>ra</sup> PCR			2 <sup>da</sup> PCR	
CEBADORES	CEBADOR REVERSE	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE EXTERNO	TAMAÑO DEL AMPLICON	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE INTERNO	TAMAÑO DEL AMPLICON
P1	R_E26176	F_E26080	R_E26176	116pb	F_E26080	R_E26161	101pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P2	E_SARBECO_R	F_E26080	E_SARBECO_R	127pb	F_E26080	R_E26176	116pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P3	R_E26268	F_E26080	R_E26268	213pb	F_E26080	E_SARBECO_R	127pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P4	R_E26176	F_E26085	R_E26176	111pb	F_E26085	R_E26161	96pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P5	E_SARBECO_R	F_E26085	E_SARBECO_R	122pb	F_E26085	R_E26176	111pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P6	R_E26268	F_E26085	R_E26268	208pb	F_E26085	E_SARBECO_R	122pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P7	R_E26176	E_SARBECO_F	R_E26176	102pb	E_SARBECO_F	R_E26161	87pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P8	E_SARBECO_R	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb	E_SARBECO_F	R_E26176	102pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
Р9	R_E26268	E_SARBECO_F	R_E26268	199pb	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P10	R_E26176	F_E26131	R_E26176	65pb	F_E26131	R_E26161	50pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P11	E_SARBECO_R	F_E26131	E_SARBECO_R	76pb	F_E26131	R_E26176	65pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb
P12	R_E26268	F_E26131	R_E26268	162pb	F_E26131	E_SARBECO_R	76pb
	R_N28742	F_N28147	R_N28742	613pb	F_N28147	R_N28466	339pb

## A. Transcripción Reversa

Para obtener ADNc de los dos genes de interés E y N, se combinaron los cebadores reverse externos dirigidos al gen E con el cebador reverse externo dirigido al gen N en 12 reacciones independientes tal como se muestra en la tabla 11.

Los componentes y concentraciones de la reacción de transcripción reversa se encuentran detallados en la tabla 12.

## Tabla 12.

Transcripción Reversa Componentes Concentración Concentración Volumen por final 1 reacción stock H<sub>2</sub>O 2.2 µl \_\_\_ \_\_\_ Buffer 10 X 1 X 1 µl dNTPs 10 mM 0.5 mM 0.5 µl **Reverse N** 10 µM 0.4 µM 0.4 µl **Reverse E** 10 µM 0.4 µM 0.4 µl Mix de enzimas 0.5 µl \_\_\_ \_\_\_ (retrotranscriptasa) ARN 5 µl Volumen final 10 µl

Componentes y concentraciones en la transcripción reversa de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.

La reacción de retrotranscripción se realizó a 50°C por 30 minutos.

## B. Primera PCR

A partir de 5 µl de ADNc que contenía regiones de los genes de interés E y N, Se realizaron reacciones independientes para cada una de las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 11.

Para las reacciones de amplificación se utilizó el kit comercial Nova Taq Hot Start DNA Polimerase. las concentraciones iniciales de los componentes de la mezcla maestra se muestran en la tabla 13.

## Tabla 13.

1'ª PCR				
Componentes	Concentración	Concentración	Volumen por 1	
	stock	final	reacción	
Buffer	10 X	1 X	2.5 µl	
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2.5 µl	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5 µl	
Forward E	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Reverse externo E	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Forward N	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Reverse externo N	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Nova Taq Hot				
Start DNA	5 U	2.5 U	0. 5 µl	
Polimerase				
H <sub>2</sub> O			5 µl	
ADNc			5 µl	
Volumen total			25 µl	

Componentes y concentraciones de la 1<sup>ra</sup> PCR MULTIPLEX.

## Condiciones de amplificación de la primera PCR

La enzima *Nova Taq Hot Start DNA Polymerase* al ser una enzima de inicio en caliente requiere un tratamiento térmico adicional de 7 a 10 minutos a 95°C, el Termociclador se programó según las condiciones de amplificación que se detallan en la tabla 14.

## Tabla 14.

Co	ondiciones de amplificació	n
Tratamiento térmico	95°C	10 minutos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
	94°C	30 segundos
30 Ciclos	64°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos

Condiciones de amplificación de la 1ra PCR MULTIPLEX.

## C. Segunda PCR

A partir de 1 µl del producto de la primera PCR que contenía amplicones correspondientes a los genes de interés E y N, Se realizaron reacciones independientes para cada una de las combinaciones de cebadores que se muestran en la tabla 211.

Para las reacciones de amplificación se realizó un ensayo preliminar utilizando el kit comercial *Nova Taq Hot Start DNA Polymerase*, las concentraciones iniciales de los componentes de la mezcla maestra se muestran en la tabla 15.

## Tabla 15.

SEGUNDA PCR					
Componentes	Concentración	Concentración	Volumen por 1		
	stock	final	reacción		
Buffer	10 X	1 X	2.5 µl		
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2.5 µl		
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl		
Forward E	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Reverse interno E	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Forward N	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Reverse interno N	10 µM	0.8 µM	2 µl		
Nova Taq Hot Start	5.11	0.5.11	0.1		
DNA Polimerase	50	0.5 0	υ. τ μι		
H <sub>2</sub> O			9.4 µl		
Producto de la 1 <sup>ra</sup>			4		
PCR			τμι		
Volumen total			25 µl		

Componentes y concentraciones en la 2<sup>da</sup> PCR MULTIPLEX.

## Condiciones de amplificación de la segunda PCR

E l termociclador fue programado según las condiciones de amplificación que se detallan en la tabla 16.

## Tabla 16.

	Condiciones de amplificación	
Tratamiento térmico	95°C	10 minutos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
	94°C	30 segundos
30 Ciclos	64°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos

Condiciones de amplificación de la 2<sup>da</sup> PCR MULTIPLEX.

#### 2.7.4. Estandarización de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR

En los ensayos preliminares se observó que el conjunto de cebadores **P9** fue el único que amplificó con éxito los dos genes diana de SARS CoV-2, con el fin de eliminar los dimeros de cebadores y los productos de la primera ronda de amplificación presentes en la 2<sup>da</sup> PCR, se seleccionó el conjunto de cebadores P9 para realizar la optimización de concentración de ADN polimerasa, determinación de la temperatura de hibridación y determinación de la concentración de cebadores tomando en cuenta los valores y concentraciones descritos por Bolivar & Rojas (2014).

## 2.7.4.1. Determinación de la concentración de enzima ADN polimerasa en la 1ra PCR

Para determinar la concentración de enzima ADN polimerasa se utilizó ARN sintético de SARS CoV-2 como muestra biológica, se llevó a cabo 3 reacciones con concentraciones de 0.5 U, 1.25 U, 2.5 U tomando como referencia las concentraciones descritas por Bolivar & Rojas (2014).

#### 2.7.4.2. Determinación de la concentración de cebadores en la 1<sup>ra</sup> PCR

La determinación de la concentración de cebadores se realizó utilizando una muestra positiva para SARS CoV-2 con Ct=15, se realizaron 3 reacciones independientes con las concentraciones estándares descritas por Bolivar & Rojas (2014), las 3 reacciones contenían de 0.1  $\mu$ M, 0.4  $\mu$ M y 0.8  $\mu$ M respectivamente tal como se presenta en la tabla 17.

#### Tabla 17.

Estandarización de la concentración de los cebadores en la 1<sup>ra</sup> PCR

CEBADORES				CONCENTRACIÓN POR 1 REACCIÓN	
<b>P</b> 9	E_SARBECO_F	R_E26268	6268 199pb 0.1 µM		
- 5	F_N28147	R_N28742	613p		
<b>P</b> 9	E_SARBECO_F	R_E26268	199pb	0.4 uM	
	F_N28147	R_N28742	613p		
Þ٩	E_SARBECO_F	R_E26268	199pb	0.8 uM	
. •	F_N28147	R_N28742	613p		

MULTIPLEX.

## 2.7.4.3. Determinación de temperatura de la 2<sup>da</sup> PCR

Se realizo un ensayo para determinar la temperatura optima de hibridación de los cebadores de la segunda PCR, se realizaron diluciones seriadas de 1, 1/10, 1/100 de una muestra positiva con Ct=15, cada una de las diluciones fue sometida a reacciones con temperatura de hibridación de 64°C, 66°C y 69°C (tabla 18).

## Tabla 18.

Estandarización de la temperatura de hibridación de los cebadores en la 2da PCR MULTIPLEX.

CEBADORES				Temperatura de hibridación
БО	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb	64%C
ГJ	F_N28147	R_N28466	339p	04 C
DO	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb	66%0
P9	F_N28147	R_N28466	339p	00°C
DO	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb	60%0
<b>P</b> 9	F_N28147	R_N28466	339p	69°C

## 2.7.5. Electroforesis y visualización de los productos de PCR.

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se mezcló 2 g de agarosa con 100 ml de buffer TBE 0.5X.
- La mezcla se llevó a calentar al microondas para diluir la agarosa en el buffer TBE 0.5X hasta obtener una mezcla transparente.
- Se añadió 0.5 µl de SYBR SAFE GEL DNA GEL STAIN y se homogenizó.
- Se vertió la mezcla en un molde para geles de 15 x 20cm previamente ensamblado y se esperó 15 minutos para la gelificación.
- Posteriormente se llevó el gel a la cámara electroforética donde se sumergió en buffer TBE 0.5X.
- Se añadió 5 μl de tampón de carga a cada tubo de PCR y se cargó 10 μl de la mezcla en cada pozo.
- Se utilizó 10 µl de Perfect DNA<sup>™</sup> 50 bp Ladder como marcador de peso molecular
- Se programo la fuente de poder a 90 voltios constantes durante 70 minutos.
- Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en el transiluminador de luz UV.

## 2.7.6. Validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR

Para la validación se siguió el "Documento técnico: lineamientos de validación de procedimientos diagnósticos del SARS CoV-2" (INS,2020), se analizaron 39 muestras positivas y 113 muestras negativas para SARS-CoV-2, las muestras de ARN fueron proporcionadas por la Gerencia Regional de Salud Cusco, posteriormente

los resultados del análisis con la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se compararon con los resultados de la prueba de oro RT-qPCR.

## 2.7.7. Valor diagnóstico de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.

Los resultados de la validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se analizaron mediante estadística descriptiva, se determinó como positivos para SARS CoV-2 toda muestra que amplificó por lo menos uno de los dos genes diana.

El valor diagnóstico se evaluó siguiendo la guía descrita por Santabarbara (2016) mediante las fórmulas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo a partir de la tabla 19.

## Tabla 19.

Análisis de una prueba diagnóstica.

		Verdadero d (patrón de r RT-qF		
		enfermo	sano	TOTAL
(prueba diagnóstica)	positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)	VP+FP
Semi nested PCR	negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)	FN+VN
	TOTAL	VP+FN	FP+VN	VP+FN+FP+ VN

Nota. Relación de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de la enfermedad.

## Sensibilidad

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

## Especificidad

$$Es = \frac{VN}{VN + FP}$$

Valor predictivo positivo

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor predictivo negativo

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

## 2.7.8. Concordancia entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT-qPCR

La concordancia entre la prueba de oro RT-qPCR y la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se determinó mediante la índice kappa utilizando el programa estadístico SPSS y los valores descritos por Landis & Koch (1977) que se presentan en la tabla 20.

#### Tabla 20.

Valoración del coeficiente kappa.

Valor kappa	Fuerza de la
	concordancia
0.00-0.20	Pobre
0.21-0.40	Débil
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1.00	Muy buena

#### 2.7.9. Límite de detección de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR

Para determinar el límite de detección se utilizó el método efectuado por Wang, *et al* (2020), se realizaron diluciones seriadas de una muestra de ARN sintético de SARS CoV-2 con carga viral conocida, las diluciones seriadas contenían 10, 1 y 0.5 copias de genoma viral/reacción, el análisis se realizó de forma independiente para cada gen diana.

#### 2.7.7. Validación del cebador F\_E26080 diseñado en la investigación.

Para analizar la eficacia del cebador F\_E26080 se utilizó el protocolo de SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR ya estandarizado donde se reemplazó el cebador E\_SARBECO\_F por el cebador F\_E 26080, siguiendo el "Documento técnico: lineamientos de validación de procedimientos diagnósticos del SARS CoV-2" (INS,2020), se examinaron un total de 71 muestras de ARN, las cuales estaban conformadas de la siguiente manera: 25 muestras positivas y 46 muestras negativas para SARS-CoV-2, posteriormente se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el índice kappa para determinar la concordancia de los resultados con la RT\_PCR.

## CAPITULO III

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES

Para el gen N se seleccionaron 2 cebadores reverse y 1 cebador forward de investigaciones previas. Para el gen E se seleccionaron 4 cebadores reverse y 2 cebadores forward de investigaciones anteriores, adicionalmente se diseñaron 2 cebadores forward, Los cebadores seleccionados y diseñados se muestran en la tabla 21.

#### Tabla 21.

GEN	NOMBRE DEL	SECUENCIA	REFERENCIA
DIANA	CEBADOR	(5´→3´)	
	E_SARBECO_F		Corman <i>et al</i> .
		ACAGGIACGITAATAGITAATAGCGI	2020
	E_SARBECO_R		Corman <i>et al</i> .
			2020
	F_E26085	TEGGAAGAGAGAGGTACGTT	Jalali <i>et al</i> .
E		SECUENCIA (5´→3`) ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT ATATTGCAGCAGTACGCACACA TCGGAAGAGAGACAGGTACGTT GTACGCACACAATCGAAGCG CCAGAAGATCAGGAACTCTAGAAGA AAGCGCAGTAAGGATGGCTA - - TTTGGTGGACCCTCAGATTC CAAAGCAAGAGCAGCATCAC GCCGTCTTTGTTAGCACCAT	2020
	R_E26176	GTACGCACACAATCGAAGCG	Guan <i>et al</i> .
			2020
	R_E26268		Hogan <i>et al</i> .
		CCAGAAGATCAGGAACTCTAGAAGA	2021
	R_E26161		Hadjinicolaou
			<i>et al</i> . 2011
	F_E26080	-	Diseño propio
	F_E26131	-	Diseño propio
	F_N28147	TTTGGTGGACCCTCAGATTC	Lu <i>et al</i> . 2021
	R_N28742		Chaibun <i>et al</i> .
Ν			2020
	R_N28466	GCCGTCTTGTTAGCACCAT	Lopez <i>et al</i> .
			2021

Conjunto de cebadores seleccionados y diseñados.

Nota. Las secuencias de los cebadores F\_E26080 y F\_E26131 no serán presentadas por protección intelectual.

## 3.2. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LOS CEBADORES DISEÑADOS

El análisis de las secuencias de los cebadores dirigidos al gen de la envoltura (E) y la nucleocápside (N) de SARS CoV-2 se realizó con la herramienta online Oligoanalyzer (https://www.idtdna.com/calc/analyzer). Para predecir la posible formación de estructuras secundarias se tomo en cuenta la energía libre de Gibbs ( $\Delta$ G), los valores de  $\Delta$ G cercanos a cero indican que la reacción no ocurrirá de forma espontánea.

## 3.2.1. Cebadores dirigidos al gen E.

En la tabla 22 se observa que los cebadores dirigidos al gen E tienen una longitud mínima de 20 pb y máxima de 26 pb, el porcentaje de CG se encuentra entre 34.6 % y 55 %, la Tm mínima es de 63.5°C y máxima de 66.3°C

#### Tabla 22.

CEBADOR	LONGITUD (pb)	CONTENIDO DE CG (%)	Tm ( <sup>o</sup> C)
F_E26080	21	47.6	64.2
F_E26085	20	50	64.1
E_SARBECO_F	26	34.6	63.5
F_E26131	22	40.9	64.5
R_E26161	20	50	65.2
R_E26176	20	55	65.1
E_SARBECO_R	22	45.5	66.3
R_E26268	25	44	64.2

Análisis de los cebadores dirigidos al gen E.

Nota. Todos los cebadores dirigidos al gen E cumplen con los parámetros que debe presentar un cebador optimo descritos por Sambrook & Russel (2012).

## 3.2.1.1. Análisis de estructura secundaria (HAIRPIN).

Todos los cebadores dirigidos al gen E presentaron posible formación de estructuras secundarias (tabla 23), sin embargo, cada una de estas estructuras secundarias tenía una variación de  $\Delta$ G entre -1.78 y -0.05 cercano a cero y

valores de Tm muy por debajo de la temperatura de hibridación de los cebadores a la secuencia diana.

CEBADOR	HAIRPIN	∆G kcal.mol <sup>-1</sup>	Tm ( <sup>o</sup> C)
F_E26080	32	-1.78	42
	5	-0.39	34.9
	ŝ	-0.23	29.3
F_E26085	R	-0.05	25.7
	6780	0.58	16.1
	Caller C	-1.56	37.9
E_SARBECO_F	Cardon Cardon	-0.78	31.1
	and the	-0.74	30.4
F_E26131	Ş	-0.21	27.5
	Ŷ.	-1.02	42.1
R_E26161	PL .	-0.34	27.9
	R	-0.21	27.8

Tabla 23.

Análisis de estructuras secundarias de los cebadores dirigidos al gen E.

CEBADOR	HAIRPIN	ΔG kcal.mol <sup>-1</sup>	Tm ( <sup>o</sup> C)
R_E26176	Q.,	-2.59	53.7
	Ŝ.	-1.57	48.6
E_SARBECU_R	R.	-0.68 34.3	
	Ça-	-0.72	36.8
	Ölera-	-0.43	29.1
R_E26268	රංගය.	-0.4	28.3
	61674 <u>6</u> 100	-0.27	27.2
	Ç.	-0.15	31.5

## 3.2.2. Cebadores dirigidos al gen N.

En la tabla 24 se muestra que los 3 cebadores dirigidos al gen N tienen una longitud de 20 pb, contenido de CG=50% y Tm mínima de 63.3°C y máxima de 64.6°C.

## Tabla 24.

Análisis de los cebadores dirigidos al gen N.

CEBADOR	LONGITUD (pb)	CONTENIDO DE CG (%)	Tm ( <sup>o</sup> C)
F_N28147	20	50	63.3
R_N28742	20	50	63.5
R_N28466	20	50	64.6

Nota. Los cebadores dirigidos al gen N cumplen con los parámetros que debe presentar un cebador optimo descritos por Sambrook & Russel (2012).

# 3.2.2.1. Análisis de Estructura Secundaria (HAIRPIN) de los cebadores dirigidos al Gen N.

Como se puede observar en la tabla 25 las posibles estructuras secundarias tuvieron un valor  $\Delta$ G entre -0.7 y 0.9, la Tm se encuentra entre -48.1°C y 2.5°C muy por debajo de la temperatura de hibridación de los cebadores a su secuencia diana, por consiguiente, se determinó que los cebadores pueden ser utilizados en los ensayos de laboratorio.

#### Tabla 25.

Análisis de estructuras secundarias de los cebadores dirigidos al gen N

CEBADOR	HAIRPIN	ΔG kcal.mol <sup>-1</sup>	Tm ( <sup>o</sup> C)
E N20447	30	-0.73	35.4
F_N20147	50	-0.7	35.5
D N28742	5	-1.6	48.1
K_N20742	8	-0.83	36.6
	Ġ_5	0.09	23.6
	58	0.49	16.7
R_N28466	Ŝ,	0.68	11.5
	$\langle \hat{\gamma} \rangle$	0.71	11.8
	5	0.9	2.5

## 3.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE SARS CoV-2.

Las secuencias de cada uno de los 11 cebadores fueron comparadas con 86 secuencias de SARS-CoV-2 reportadas para Perú en la base de datos del NCBI, como se observa en la figura 7. los cebadores **E\_SARBECO\_F** no muestran ningún desajuste con sus respectivas secuencias diana, de igual forma los cebadores **E\_SARBECO\_R**, **F\_E26085**, **R\_E26176**, **F\_E26080**, **R\_N28742**, **F\_E26131** y **R\_E26161** no presenten ningún desajuste con sus respectivas secuencias diana (Anexo 5).

## Figura 7.

Alineamiento del cebador E\_SARBECO\_F.

Des in init dipensi die Sport Taria der	
白甸縣口(田和田)田島上生、中日秋田米谷(水石)川州 教学生会	
1994 September 2 Analasi Foren Bearran	
3MARANITY	
of support is to serve a support support of the local support is an effective support of the support	CONTRACT TAL TANTA AT A NEW CONTRACT CONTRACT
of control in the second statement of a second of the second statement of the second	CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR
at michail investment states a process write to Jacob 2011 DV Jonate COUL and the price a TTCCTTTCCESSEE	CLAST CONTRACTOR TO A CONTENT AND THE CONTENT OF TH
IS 19/1021 ( Down and Headers in Source and Source Additional Date of the Source Official Additional Provider and the Source of	LABSTACOTTAL TROTTRE FERENTECTIC TOTTOTOT
20 Million / Constant in August in August and Decomposition (Second Constant Second Constant Second August Aug	LEAST ADDITESTINTENT AND ADDITESTICATION ADDITESTICATION
of which could great in an analysis of a structure of the could be could be an analysis of the proof of the could be a structure of the struct	A ROOTADDITAATARTTAATAOOOLAOITOTTTTTTTT
22 mol 2027 / Server some represent in at the Construction of the Const	READOTACOTTANTANTANTANTANTACTIOTECTECTEC
of any 2020 Means non-relation and the borderer (assessment) for the border border to the border of	A # 0 0 1 A 0 0 1 1 # 4 7 # 1 17 # 8 7 # 0 0 0 1 A 0 1 T 0 1 F T T T T T T T T T T T T T T T T T T
(i) any description of the product of the constraint of the product of the pro	1140014041744744744744740667
HE REPORT FOR THE DATA FOR THE PARTY OF THE	ALAERIADUREA PRAEDRAA TAILOR ADPROVADA ADR
THE PROFILE IN THE READER WITH AND AND AND AN ADDRESS AND ADDRESS AND ADDRESS AND ADDRESS ADDRES	CARDONAL STANDARD AND AND AND ADDRESS AND ADDRE
A Instant Linear adversaries a some for serve to serve the set off division exponentiation using prove 4410 at 170 at 8.4 (3.3)	· 这些你说是我这样是你的你是我想想是我我还能够能想来 <mark>我也有我们</mark> 你的人们也能能能能能
TO REPORT FRANCE AND ADDRESS OF ADDRESS OF ADDRESS OF ADDRESS OF ADDRESS ADDRES	· 上开留着我的名词形式来来的来说这才开始准确的新闻的公式中心的方式在外生态的中
	ALARETPERATERIA A CARDITA A CAREER ACCEDENCES SECOND
Th LOW DOM: I there your request requests the second of the DM December Republic second s	erablerardet faat af te belende bestertet te bester
11. INVESTIGATION AND A CONTRACT OF A DESCRIPTION OF A DE	CARRENT ACTIVATION TARGET ACTIVATION
The International Physics and a strength and the strength of t	A ARTAC ATTAATA ATAA MARKATAA CTTCTTTTTTTTTT
M MAXAMA Like you wanter magnetic concerner are under addition (Channel Maxametri 2000) income your ALTICATICATICATICATICATICATICATICATICATICA	AABATAANTFAATAATTANTNIANTACTTCTTTTTTTT
(1) UNANDE / Deveryone setting operations are not a 2 basis high. DeV 2 house PROVED using the general ATT COATTEC B & \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$	LEARPTACETTANIES TANK AND A TANK A LOTTOFF TTTEET
A set [2] In 1 Second and respects in approximation 2 international Second States in Second States and S Second States and Second Stat Second States and Second States and	INTERTACTION TANKS IN TAIL OF A CT TO THAT A TH
The strend With it does not the second strend on the strend and the does not does not does not does not strend and the does not the strend and th	CRONTAGATIANTANTIANTAATAACOTACTICITETE
of PTICL (Section and and and an environment of the Section Section Concerning Section And a section of the Section Sectio	FERDING TRAFFERING FAMILY OF ACTION TO THE FRAME
A service state and a service of the present of the test test test test to be a service of the s	KERGATROBTERATER TEROOTAOTTOTESSES
AL WITH THE READ AND A VERY AND A V	COTHERTS AT A STAR THREE AT AT TATTE AND A LODGED
TO RECEIPT I THE AND INTERPORT IN A CONTRACT OF THE DATE OF CALLS AND PARTY AND PARTY AND PARTY AND PARTY AND A THE OT THE OT A CONTRACT OF THE OT A CONTRAC	ABSTRUCTION FOR ANTINATION VALUE AND TRUCTED
or strength international matters in the second or international company strength in part prices of the second strength in the second str	CABREACTIVE A TERT TERRAT ACTICITION
IN PRESENT A DATA ON A DATA OF	CARRENT STREET SATISATION ACTIVITIES
THE PROTECTION OF A DESCRIPTION OF A DES	CARDING TRANSPORTER AND A STATE AND TOT TITISTIC
If an addition where we are a state to react the state of	CONSTRUCTION OF A CONSTRUCTION OF A CONSTRUCT OF A
In control of the second spaces spaces as an end of the last last the control of the second space of the second seco	CAREFORNY IN A THE AND A T
Dell Dell Della Concel	Sendowe Trite Bu
Note La seguencia diana del sebeder E CARRECO. E se encuen	tre receltede con enerille

Nota. La secuencia diana del cebador E\_SARBECO\_F se encuentra resaltada con amarillo.

En la figura 8 se observa que el cebador **F\_E26268** presenta un desajuste en el nucleotido 26281 del genoma con numero de acceso **MW030279.1** 

#### Figura 8.

Alineamiento del cebador F\_E26268.

Den bit Send Ayrent bit tepner Tara Ha	1
CHERCERE LE VOXDAR440454525	
DISA Sequences / Tuesdadud Poteser Taquetues	
Taxaalian	TIMES AND ADDRESS.
HIS INVESTIGATION OF A DATA AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN	TOTALACTARS
AD MARKYOC TEALS AND TO TAKE THE TAKE TAKE THE TAKE THE TAKE THE TAKE TAKE TAKE TAKE	TETRANCORACTARS
at month() [] [] areas and memory and on construct,] areas SAR(c)/[] areas All prove (2000) couple prove [] 0 [] 1 4 4 4 4 4 1 (] 1 0 4 4 7 1 1 1 4 1 4 4 4 1 (] 1 1 4 1 4 4 4 4 1 (] 1 4 4 4 1 (] 1 4 4 4 1 (] 1 4 4 4 1 (] 1 4 4 1 (] 1 4 4 1 (] 1 4 4 1 (] 1 4 4 1 (] 1 4 4 1 (] 1 4 1 (]	TOTAAACOAAOTABE
E) INVESTATIONAL TO TAXABLE AND ADDRESS DEPARTMENT OF TAXABLE TO TAXABLE T	TOTAAACOAACTARE
III WOODST THE READ WARREN AND WARREN AND WARREN AND WARREN AND WARREN AND WARREN AND THE TAXABLE TO TAXABLE T	TOTAAACOAACTAAA
ex. Microsoft file rear each reactions containing 2 asses (aAS) 2 yr 2 hunard (Accepted) 2000 ungers prove TGTTAAAAATCTGAAATTRTTCTCAAATTTTTTTTTTTTT	TOTARACORACTARE
al. MINUTER Throw and managements on a same fails on Jonard Record and any property of the sector of	TETAAACOAACTAAA
al MODINE Thread and regiment and you demonstrate the Contract Contract Contract of Contract Contract of Contract Contra	TETAABCOABCTABB
AT MODELS I Rent Automation and was tendered a same ball Col Journal Reprod 20000 internet and To To A a same To To A a to To To A a same To To To A a same tendered and the same tendered and the same tendered and the same tendered and to To A a same tendered and the same tendered and to A a same tendered and the same tendered and to A a same tendered and tendered an	TUTAAACOAACTAAA
W WWWWW I Berns scar majorno undow innova 2 some SANCev 2 name Micropet20000 insper price TottAAAAATCTOAATTCTAAAAATCTOATTCTTAAAAA	TOTAABCOABCTABB
IN INVESTIGATION 1 Development on the interview intervie	TETRABEBOAETAAA
10 MM00021 Upters instruments underscience 2 man MAS 24/2 man Minister 01000 inspect protect 011 TAAKAAT CTO AAT 12 TTO TAAKAAT TO COMPANY TO COMPANY.	*ETAAACEAACTAAA
TI MAX20011 Beren scan mianto and verantiza 2 scan birth Col 2num Himan (2000) langest genese TOTTAA 4 AATCTOA ATTTOTA TOTTA A AATCTOA ATTTOTA COLORADO AND	*ETAABCDAAD FAAA
12 MW0009k1 Deter inderesander sederes inderesander 2 kalle 5456 CaV 2 hand FB Could 10000 Langer groupe TOTTAAkAATCTOAATTCTOAATTCTOAAKTTCTOAAKTTCTOAAKTTCTOAAKTTCTOAAKT	TETAAACDOAL TAAB
TI MWXXXXXX T Deven and managery and one concerned a 2 water SARD-CaV-2 summASD content (10,17,4,4,4,4,7,1,1,1,1,4,4,4,4,7,1,1,1,1,	TETAAACBASITAAS
TA INVICEDENT DEVENTION AND CONTRACT AND AND CONTRACT AND	TETRAACQANDTAAN
To Invision 1 development of the second state of the second s	TETAAACBASSTNAA
TREASURED TO TARABASE AND A TOTAL TRADE OF TRADE OF TARABASE AND A TOTAL TRADE OF TARABASE TO TARABASE AND A TOTAL TRADE OF TARABAS	TETRAACSAASTAAR
TR. MINISTER 1 (Reversion) and one concerns 2 wave SARS Cold 2 Surger TROUGH TRADE preserve T 0 T T A A A A A T C T 0 A A T T T T T T T T T T T T T T T T	TETRARCOASCIASE
The Analysis of Development of the Analysis of the	TETRAACQAASTAAA
TO TAXATCOM AND	TETBRACTANETERA.
IN MINISTRATING WARRANTING DISCOMPANY AND	AAATCAAGCAAATCT
ye MAXSUTELEBARRANDER START AND THE START AND A START	TOTAASDRASTARA
SC WARDEN AT DEVERTIGE OF A SAME TO TELL AND THE AND T	RANCONNETARATAT
32. SNU22171 1 Several active multiling and the states into 2 is all SARS-Cav 2 how of 5 Cave Section process (0.1.7.4.4.4.4.7.5.1.0.4.4.7.5.1.0.4.4.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5	CTARAC GARCTEART
DA MARDETS F DAVANT AND	TOTHARCORACTARA
AL AMMONDTY 1 Development programs strate state SAGE Card Analysis (Score Section 2010) (Section	TOTAARCBAACTARA
10 HOVER LORING AND INCOME STATE AND A STATE AND CONTRACT AND A STATE AND A ST	AALTIGARGIALATII
IN MEMORY 10 FOR ALL PROPERTY AND THE PROPERTY AND THE ADD COVER AND COVER ADD COVER A	TETAAACBEACTAES
In Protocol States and subjects	TETRASCEASTARA
Site 19 2 Onto Onlynn	Selected genetic code Standard

Nota. La secuencia diana del cebador **F\_E26268** se encuentra resaltada con amarillo.

En la figura 9 Se observa que el Cebador **F\_N28147** presenta un desajuste en el nucleótido 28154 del genoma con numero de acceso MW030267.1.

## Figura 9.

Alineamiento del cebador F\_N28147.

Des pie ferte Marrier des Separtes faute des Canit des main des La	
Ohi Sepamer Senided Video Teponen	
Tenned Market Control of Control	CONTRACTOR OF CONTRACT
W 10/2010 1/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2/2	CTRCIACTANICATA
The UNITARY INTERNATIONAL CONTRACTOR DATABASED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN	CTOCLACTANICASA
IN DESCRIPTION OF A DES	CTRECASTRACCASE
	CTOSCASTANCCASA
	CTOSCASTRACCASE
	CTOCCASTRACCADE
	CTOSCASTRATCAS.
	CTONTROTONCE -
	C. C
	CIDELNGIANLENGS
In additional information and registery and the contained a sease of the second sequerization of the second sequences of the s	CTBGERSTRALCADA
	LTBUERGTRAECADA
	CTOSEAGTAATEAGA
Te AMODER I de una este registro montene comerce à acade CARD-Gru Anaren Millenper Million propés prime a A A T & C & C E E E E A T T A E S T E F A E A E E E E E E E E E E E E E E E	ETSGEAGTABECAGA
The MACAGET I Garnes and registery surdame containing a subtraction of Aurent Macaget Macaget Macaget A a 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	CTRELASTAALCARA
TELEVISION LIGENER AND	CTRELAGTAALCASA
TT ANNUALE ( Denore and respective produces 2 and a SADUCE) 200 and SADUCED confide press A A A T D C A C C C C L C A T T A C D T T L C A T C C T L A L A T C C T C T L A L A T C C T C T L A L A T C C T C T C T C T C T C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C C T C	CTBELAGTALECARA
TE MEDIATE I Server auto registry syndrom contacts 2 index SAID-CaV-ShureofElizopatiSECCC complex parters A A A 7 D C A C C C C C L C A 7 A C A C C C C C A C A C C C C C A C A	CTUSEASTAASEABA
The institute of the second se	CTUSEASTANEE45A
IN INTERNET (Server and events) y undered produced a server SARD-OV Storewith Second S	CTUSCASTANCCASA
21. MINICIPLE Forwary and a contracting gradiente particular d'antide SARD-Col-Discover/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCOVE/MERCo	LTUSCAS7 ADDELOSA
E2 MINISTRAT Barrer and a registery syndrome partnering 2 miles SARD-CoV 2 surger/ERDiscopete 2000 company genere	STASTAATEASAATS
mill Ministric 1, 1 Server and a magnifulty workness Lancaurus 2 and an SARS Cold Drumovil Mission Bell Cold Samples general A A T C C + L C C C C C A C + T + C C + T C C + C C C C + C + C +	<b>TSQCADTRACSABAA</b>
54. MINISTRY 15 years acute regenerative conditioner structure 2 asses XARS Cov 2hume/15 Nov perSet2020 condexing an interactive 2 A C C C C C C C C C C C C C C C C C C	CTREENSTANCENCA
EL MURIETTI (Severa acuta insuratory endorme tanatariya 2 acuta SARS-OLV-Division/EXionane/EXIOD) containe parenta (A & A TO C A C C C C C C C A T A D O TO C C A C C C T C A D O TO C C A C A C T C C A C A C C C C C C A C A	CTREEAS*AALEAGA
10. REACTION F Server acts resumany contents represented by an AAS Cry Journey Relative ANTIGN comparis A A A T Q C A C C C C C C C C + T A C A T A C A C A C A C A C A C A C A	CTOSCASTAALCAGA
	CTRECKSTRASCASA
	and the second second
The second secon	Searcher Server's code (prostress

Nota. La secuencia diana del cebador F\_N28147 se encuentra resaltada con amarillo.

En la figura 10 se observa que el cebador **R\_N28466** presenta un desajuste en el nucleótido 28482 de los genomas con numero de acceso **MW030208.1**, **MW030209.1**, **MW030210.1**, **MW030228.1** y un desajuste en el nucleótido 28476 de los genomas con numero de acceso **MW030244.1** y **MW030251.1** 

## Figura 10.

Alineamiento del cebador R\_N28466.

Der Die Bench Bildenen Bei jednich jehn Deb	
DNA Separate Xetalated Pedan Separate	
Spenality	
15, RMXR2511 Server and registery sectore treasure (ARS-Cel 2harde/REcound/2000 creater proce CCADAACTTCCCTACACTTCCCTACTACTACTACTACTAC	Tetodettecesc
IN READON I Server a serve and you contained a serve SASCOL drawn PRovid Microbio servers prove (CCASASCTTCCCTATOCTACTACTACTACAAACA	Tetossttbcast
17 INVOICES SERVICES AND A STREAM AND A ST	14TBGBTTBCARC
In sector210 Inferent autor representation and an anti-AAA Cal-Abaran Parceland Calaba Street and Cala	JANSSTTSSAAC
IN WORKER THE WEAR AND A DEPARTMENT OF A DEPARTMENT	ATBBERTSCAACT
20 INVESTIGATION AND THE ADDRESS STATES AND THE ADDRESS STATES ADDRESS ADDRES	JAADESTTEEAAC
21 MINIORETET Bever auto regenerary synthemeteriae 2 datase SARS-Cel-2human/Filosoper/Filos	AT5SSTTECAAC
2 mint block fillerer aute regenerer synthese terraining 2 actes 5455 Cel 2 forest filler ogen (7420) congets generer (0.4.6.4.4.0.1.7.0.5.4.0.1.7.5.2.0.1.8.1.0.1.7.4.2.4.4.0.4.5.5.0.2.4.7.6.7.7.1.0.1.0.1.0.0.0.0.0.0.0.0.0.0.0.0.0	LTDBETTELAST
20 WHORE TRAVER SUBTING AND THE PROPERTY AND THE AND T	FATBBBTTSCAAC
Displant ADDress Televises and a response survey on particular and a set of	FATBRETTECAAC
25 MIXXXX77 (Severalize registrary sold residues (Antarias 2 water SARLOG) 25 water PD (2010) (separate prices LCA) AAA (CTO QAS TTO CST AT UP TO TAAL AAA AAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	ATBRETTECAAC
36 MARCENT Flower and a regarding spectrum of a construction 2 Annual Contraction 20000 (in party process); A C = A C = T C = A C = T C = A C = T A C = A C = A C = T A C = A C = T A C = A	1750.677.00.4AC7
2 A 1 A 2 A 1 A 2 A 2 A 2 A 2 A 2 A 2 A	LATONETTOCANC
28 WHATCH I THE ALL MARKED AND ALL MARKED AND ALL AND	LATOSSITTECAAC
2 million from and manage baddee contains 2 man halfs Cov 2 function (100000 compare general C C A S A = S C C C C C C C C C C C C C C C C C C	ATRESTICASC .
A PROVIDENT (Seven acute requests) to down states was taken to 2 a see tak	14TDSSTTDCARC
In minimized (deven water reasoning and over constances 2 access SARLOW 26 water B10000 constant general (COADALDEEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDED	SANJETTERATE.
It mitsible riteres conversions underess and the later table of the second block constraints prove to 0.4.1.7.7.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1	1.4.4.5.7.5.4.0.0.4.0.5
2) IN HIGH THE AND	14TBESTTOCA4C
	ATDESTIDEALE
It in indicate the encounter produm sensitive 2 leave SARLOY During Through (200) sensitive processing of the ABCT (10) CT (CC) T (CD) T (20) T (2	14TØBBTTOCARC
W WHORE TRAVER SHARE SHARE SHARE SHARE SHARE SHARE SAVE SAVE SAVE SAVE SAVE SAVE SAVE SAV	I=TOBETTOCARC
12 milditizes i deven ante resource unative presentes pages SARL (or Draws Person pages group ) C = # 4 A B C T B O A C T F C ( ) T # T O B T D T A A C A B B T O B T O B T A A C A B B T O B T	I=TROBITOCALC
IS INVOX251 Fileware and required intervent 2 ages 340 Cov2numer#Except#05220 program group (CC = E + + 0 C 7 = 0 + C 7 F C + C 7 = 0 + C + F + C + C + C + C + C + C + C + C	34420TTEE66tel
IN INVICTOR A DEPARTMENT OF THE ADDRESS OF THE ADDRESS AND ADDRESS	14T00STTSCARC
au minimiza i fineme anne mandeu voni me contante 2 anale 3495 (av grunnar Microsoft 1200 contante plante 0.0 a 1.4 a 3.0 T 10.0 A 0.7 T 0.0 C 0.7 a 7.6 a	1470BBTTBCARC
at INFORMATING TRANSPORT OF A TO CONTAIN A STATE AND	14TOBDTTDCARC
(c) white the set was supported in the set of the se	147000TTDCA4C
ing minimum linear each manney and the amount of a safe 14PG coll Share PD population of an end of a set C 2 3 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 5 4 5 1 7 2 C C C 7 4 1 7 2 C C C 7 4 1 7 2 C C 7 7 2 C C 7 4 1 7 2 C C 7 7 2 C C 7 7 2 C C 7 7 2 C C 7 7 2 C C 7 7 2 C C 7 7	1470107705445
instanting a linear ear maximum events and the GAUCAL Transformation of the second distance	A+DBBBTTBDC++D
Ster 13 S Out Column	lected perietic code (transland

Nota. La secuencia diana del cebador **R\_N28466** se encuentra resaltada con amarillo.

Se determinó que el desajuste de 1 nucleótido en un número reducido de secuencias

no es causa excluyente por lo que se prosiguió con los ensayos de laboratorio.

## 3.4. DISEÑO DE LA SEMI-NESTED-PCR

### 3.4.1. Resultados del ensayo preliminar de los cebadores.

Para evaluar los productos de amplificación de los cebadores diseñados se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la primera y segunda PCR, tal como se muestra en la figura 11, los amplicones de la primera PCR solo fueron visibles para el conjunto de cebadores P8 y de forma muy leve para los conjuntos de cebadores P7 y P9, los amplicones visibles en la figura 11 corresponden al gen E y coinciden con los tamaños calculados con la herramienta online http://insilico.ehu.es/mini\_tools/PCR/ presentados en la tabla 32.

## Figura 11.

Electroforesis de la 1ra PCR del ensayo preliminar de los cebadores



**Nota. M1:** marcador de peso molecular de 100pb, **M2:** marcador de peso molecular de 50pb, **P1-P12:** conjunto de cebadores dirigidos al gen E, **P13:** conjunto de cebadores dirigidos al gen N.

Como se puede apreciar en la figura 12. En la electroforesis de la segunda PCR del ensayo preliminar, se observa que cada conjunto de cebadores obtuvo los amplicones esperados que se detallan en la tabla 26.

## Figura 12.

Electroforesis de la 2da PCR del ensayo preliminar de cebadores.



Nota. M1: marcador de peso molecular de 100pb, M2: marcador de peso molecular de 50pb, P1: 101pb, P2: 116pb, P3: 127pb, P4: 96pb, P5: 111pb, P6: 122pb, P7: 87pb, P8: 102pb, P9: 113pb, P10: 50pb, P11: 65pb, P12: 76pb, P13: 339pb.

#### Tabla 26.

		2 <sup>da</sup> PCR	
	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE INTERNO	TAMAÑO DEL AMPLICON
P1	F_E26080	R_E26161	101pb
P2	F_E26080	R_E26176	116pb
P3	F_E26080	E_SARBECO_R	127pb
P4	F_E26085	R_E26161	96pb
P5	F_E26085	R_E26176	111pb
P6	F_E26085	E_SARBECO_R	122pb
P7	E_SARBECO_F	R_E26161	87pb
P8	E_SARBECO_F	R_E26176	102pb
P9	E_SARBECO_F	E_SARBECO_R	113pb
P10	F_E26131	R_E26161	50pb
P11	F_E26131	R_E26176	65pb
P12	F_E26131	E_SARBECO_R	76pb
P13	F_N28147	R_N28466	339pb

Conjunto de cebadores de la 2<sup>da</sup> PCR del ensayo preliminar.

Nota. Los tamaños de los amplicones presentados en la tabla fueron calculados utilizando la herramienta online http://insilico.ehu.es/mini\_tools/PCR/

#### 3.4.2. Resultados del ensayo preliminar de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR

El Control positivo compuesto por ARN sintético de SARS-CoV-2 fue analizado con distintas combinaciones de cebadores, no se visualizaron bandas en la primera PCR MULTIPLEX. Tal como se presenta en la **figura 13**, al realizar la electroforesis de la segunda PCR, el conjunto de cebadores P9 fue el único que consiguió amplificar con éxito los genes E de 113 pb y N de 339 pb, mientras que los conjuntos de cebadores P1, P4 y P12 amplificaron únicamente el gen E con un tamaño de 127 pb, 122 pb y 76 pb respectivamente. Considerando que la OMS (2020) indica que el diagnóstico de infecciones por SARS CoV-2 debe ir dirigida a 2 regiones diferentes del genoma, se seleccionó el conjunto de cebadores P9 para continuar con los pasos de estandarización debido a que fue la única combinación que amplifico con éxito los genes E y N simultáneamente.
## Figura 13.

Ensayo preliminar de la seminested multiplex PCR.



Nota. M1: marcador de peso molecular de 100pb, M2: marcador de peso molecular de 50pb, P1: gen E 127pb, P4: gen E 122pb, P9: gen E 113pb y gen N 339pb, P12: gen E 76pb.

Posteriormente se seleccionó el conjunto de cebadores P9 para analizar una muestra positiva con un valor Ct=15. Los resultados de la 1ra PCR fueron los esperados, se obtuvo un amplicon de 613pb correspondiente al gen N y un amplicon de 199pb correspondiente al gen E tal como se muestra en la figura 14.

#### Figura 14.

Análisis de muestra positiva 1<sup>ra</sup> PCR MULTIPLEX.



Nota. M: Marcador de peso molecular 100pb, 1: Muestra positiva, B: Blanco de reacción.

En la segunda PCR se visualizaron los amplicones de 339pb y 113pb correspondientes a los genes E y N, adicionalmente se observó que los amplicones de 613pb y 199pb correspondientes a la primera PCR aún estaban presentes, además se presentó un producto inespecífico de 1500pb y dímeros de cebadores de 50pb tal como se muestra en la figura 15.

#### Figura 15.

Análisis de muestra positiva 2<sup>da</sup> PCR MULTIPLEX.



Nota. M: Marcador de peso molecular 100pb, 1: Muestra positiva.

#### 3.4.3. Estandarización de la semi-nested MULTIPLEX PCR

El ensayo preliminar de la SEMI-NESTED MULTIPLEX-PCR tuvo los resultados esperados cuando se analizó el control positivo de ARN sintético que contenía 100 copias/reacción, por lo que se utilizó este mismo control positivo para estandarizar la concentración de la enzima ADN polimerasa, por otra parte, la estandarización de la temperatura de hibridación y la concentración de los cebadores se realizaron utilizando una muestra de ARN positiva para SARS-CoV-2 con valor Ct igual a 15.

# 3.4.3.1. Determinación de concentración de enzima ADN polimerasa en la 1ra PCR.

Para optimizar la concentración de ADN polimerasa de la primera PCR se realizaron 3 reacciones independientes con concentraciones de 0.5U, 1.25U y 2.5U, al realizar una electroforesis de la segunda PCR se observó que la reducción de enzima en la primera PCR MULTIPLEX no disminuye la intensidad de las bandas en la segunda PCR MULTIPLEX (figura 16), por consiguiente, se estableció utilizar 0.5U en la primera PCR MULTIPLEX.

#### Figura 16.

Determinación de concentración de enzima ADN polimerasa, electroforesis 2<sup>da</sup> PCR MULTIPLEX.



Nota. M: Marcador de peso molecular 100pb, 1: 0.5U, 2: 1.25U, 3: 2.5U.

# 3.4.3.2. determinación de la temperatura de hibridación de los cebadores en la 2<sup>da</sup> PCR.

Para estandarizar la temperatura de hibridación de los cebadores y eliminar la presencia de productos inespecíficos se formaron 3 grupos de 3 tubos de reacción cada uno, cada grupo estaba compuesto por el producto de la primera PCR y diluciones seriadas del mismo (1, 1/10 y 1/100), cada grupo fue sometido a diferentes temperaturas de hibridación (64°C, 66°C y 69°C) tal como se muestra en la figura 17.

### Figura 17.

Curva de temperatura de la 2da PCR.



La temperatura de hibridación de 64°C tiene buena amplificación, pero no reduce la presencia de productos inespecíficos.

La temperatura de hibridación de 66°C tiene buena amplificación, desvanece el subproducto de 1500pb, pero aún son visibles los dímeros de cebadores de 50pb.

la temperatura de hibridación de 69°C desvanece el subproducto de 1500pb, aún son visibles los dímeros de cebadores de 50pb.

Al realizar diluciones seriadas de 1/10 y 1/100 se produce la desaparición del amplicón correspondiente al gen E (113pb). Se determinó utilizar la temperatura de 66°C debido a que a mantiene la amplificación del gen N (339pb) hasta la dilución 1/100 mientras que la Tm de 69°C solo consigue amplificación hasta del gen N (339pb) hasta la dilución 1/10.

#### 3.4.3.3. Determinación de la concentración de cebadores en la 1<sup>ra</sup> PCR

Con el fin de reducir los productos inespecíficos como dímeros de cebadores, los cebadores de la primera PCR fueron probados en concentraciones de 0.8  $\mu$ M, 0.4  $\mu$ M y 0.1  $\mu$ M en reacciones independientes, posteriormente se realizó una electroforesis de la segunda PCR MULTIPLEX.

La concentración de 0.1 µM de cebadores reduce drásticamente la reacción de amplificación por lo que no se pudieron visualizar los amplicones esperados (figura 18).

### Figura 18.

Electroforesis de la 2<sup>da</sup> PCR multiplex con 0.1µM de cebadores.



Nota. M: Marcador de peso molecular de 100pb, 1: Muestra positiva.

La concentración de 0.4  $\mu$ M redujo la intensidad de los amplicones de la primera PCR, no obstante, aun fue visible el amplicón de 613pb, se logró disipar los dímeros de cebadores de 50pb (figura 19).

### Figura 19.

Electroforesis de la 2<sup>da</sup> PCR multiplex con 0.4µM.



Nota. M: Marcador de peso molecular de 50pb, 1: Muestra positiva.

En la concentración de 0.8  $\mu$ M se pueden visualizar los amplicones de 613pb y 199pb correspondientes a la primera PCR, también se observó dímeros de cebadores de 50pb tal como se muestra en la figura 20.

## Figura 20.

Electroforesis de la 2<sup>da</sup> PCR multiplex con 0.8µM de cebadores.



Nota. M: Marcador de peso molecular de 50pb, 1: Muestra positiva.

Finalmente, las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 27 los componentes y concentraciones del sistema de reacción quedarían estandarizados como se muestra en la tabla 28.

### Tabla 27.

Condiciones de amplificación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.

CONDICIONES DE AMPLIFICACION DE LA SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR						
1ra	PCR			2da PCR		
Tratamiento térmico	95°C	10 minutos	95°C	10 minutos		
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	94°C	5 minutos		
	94°C	30 segundos	94°C	30 segundos		
30 Ciclos	64°C	30 segundos	66°C	30 segundos		
	72ºC	30 segundos	72°C	30 segundos		
Extensión final	72ºC	5 minutos	72°C	5 minutos		

## Tabla 28.

Componentes y concentraciones de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR.

	COMPONENTES Y CONCENTRACIONES DE LA SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR							
	1 <sup>ra</sup> PCF	R		2 <sup>ra</sup> PCR				
Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen por 1 reacción	Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen por 1 reacción	
H <sub>2</sub> O Buffer dNTPs MgCl <sub>2</sub>	 10 X 2 mM 25 mM	 1 X 0.2 mM 1.5 mM	12.4 µl 2.5 µl 2.5 µl 1.5 µl	H2O Buffer dNTPs MgCl2	 10 X 2 mM 25 mM	 1 X 0.2 mM 1.5 mM	8.9 μΙ 2.5 μΙ 2.5 μΙ 2 μΙ	
E_SARBECO_F	10 µM	0.4 µM	1 µl	E_SARBECO_F	10 µM	0.8 µM	2 µl	
R_E26268	10 µM	0.4 µM	1 µl	E_SARBECO_R	10 µM	0.8 µM	2 µl	
F_N28147	10 µM	0.4 µM	1 µl	F_N28147	10 µM	0.8 µM	2 µl	
R_N28742	10 µM	0.4 µM	1 µl	R_N28466	10 µM	0.8 µM	2 µl	
Nova Taq Hot Start DNA Polimerase	5 U	0.5 U	0.1 µl	Nova Taq Hot Start DNA Polimerase	5 U	0.5 U	0.1 µl	
ADNc			2 µl	Producto de la 1 <sup>ra</sup> PCR			1 µl	
Volumen total			25 µl	Volumen total			25 µl	

## 3.5. LÍMITE DE DETECCIÓN.

El límite de detección se determinó analizando el ARN sintético en diluciones seriadas que contenían 10, 1 y 0.5 copias/reacción, el análisis se realizó de forma independiente para cada gen diana, en las figuras 21 y 22 se observa que la amplificación fue posible hasta la concentración de 1 copia/reacción para ambos genes, por consiguiente, se estableció que el límite de detección es de 1 copia/reacción.

#### Figura 21.

Límite de detección del gen N.



**Nota. M:** marcador de peso molecular de 50pb, **1:** reacción con 10 copias de genoma viral, **2:** reacción con 1 copia de genoma viral, **3:** reacción con 0.5 copias de genoma viral.

### Figura 22.

Límite de detección del gen E.



**Nota. M:** marcador de peso molecular de 50pb, **1:** reacción con 10 copias de genoma viral, **2:** reacción con 1 copia de genoma viral, **3:** reacción con 0.5 copias de genoma viral.

### 3.6 VALIDACION DE LA SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR

Se analizaron un total de 152 muestras de ARN previamente sometidas a la RTqPCR, el ensayo fue a doble ciego y se consideró como positiva toda muestra que amplificó al menos uno de los dos genes diana de SARS CoV-2, en la figura 23 se observa que las muestras 36 y 40 amplificaron con éxito los genes E y N mientras que las muestras 33 y 36 amplificaron unicamente el gen E, las muestras 34, 35, 37 y 38 posiblemente presentaron formacion de dimeros pero no amplificaron niguno de los genes de interes por lo cual se consideran como negativas, el resto de muestras utilizadas en la validacion se encuentran en el anexo 5.

#### Figura 23.

Electroforesis de la 2<sup>da</sup> PCR de las muestras 33-40.



Nota. M: Marcador de peso molecular de 50pb; CP: gen E 113pb y gen N 339pb; 33 y 39: gen E 113pb; 36 y 40: gen E 113pb y gen N 339pb; 34, 35, 37, y 38: Muestras negativas; B: Blanco de reacción; CN: Control negativo.

Las muestras con elevada carga viral (106, 107, y 109) aun presentaban 4 amplicones, 2 de los cuales correspondían a los amplicones de la 1<sup>ra</sup> PCR figura 24.

### Figura 24.

Electroforesis de la 2<sup>da</sup> PCR de las muestras 101-110.



Nota. M: Marcador de peso molecular de 100pb; CP: gen E 113pb y gen N 339pb; 101, 102 y 104: gen E 113pb; 106, 107 y 109: gen E 113pb y gen N 339pb; 103, 105, 108 y 110: Muestras negativas; B: Blanco de reacción; CN: Control negativo.

Para comparar la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR con la prueba de oro se elaboró una tabla de contingencia (tabla 29).

#### Tabla 29.

Tabla de contingencia entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RT-qPCR.

		Verdade diagnós (patrón de ref RT-qPC	ero tico ferencia) CR	
		enfermo	sano	TOTAL
		36	4	40
SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR	positivo	(VP)	(FP)	40
(prueba diagnóstica)		3	109	110
	negativo	(FN)	(VN)	112
	TOTAL	39	113	152

Nota. VP: Verdadero positivo, FP: Falso positivo, FN: Falso negativo, VN: Verdadero negativo.

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se calcularon con las siguientes formulas:

#### Sensibilidad

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{36}{36 + 3} = 92.31\%$$

#### Especificidad

$$Es = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{109}{109 + 4} = 96.46\%$$

Valor predictivo positivo

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{36}{36 + 4} = 90.00\%$$

#### Valor predictivo negativo

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} = \frac{109}{109 + 3} = 97.32\%$$

Se determinó que la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR tiene una sensibilidad de 92.31 %, especificidad de 96.46%, valor predictivo positivo 90.00 %, valor predictivo negativo 97.32%.

El valor del coeficiente kappa se calculó utilizando el programa IBM SPSS statistics 21 y fue igual a 0.89, según los valores descritos por Landis & koch (1977) la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la prueba de oro RT-qPCR tienen una muy buena concordancia.

## 3.7. RESULTADOS DE LA AMPLIFICACION DE LOS GENES E Y N EN MUESTRAS POSITIVAS PARA SARS-CoV-2.

El gen E amplificó exitosamente en el 92.30% de las muestras positivas estudiadas mientras que el gen N amplificó exitosamente en el 53.87%, el 56.41 % de las muestras amplificó los dos genes, el 33.33% amplificó únicamente el gen E y el 2.56% amplificó únicamente el gen N, estos resultados se detallan en la tabla 30.

#### Tabla 30.

Positividad de los genes E y N.

Positividad de cada uno de los genes diana					
gen E gen N No (%					
+	+	22 (58.97%)			
+	-	13 (30.76%)			
-	+	1 (2.56%)			
-	-	3 (7.6%)			
36 (92.30)	23 (53.97)	39			

### 3.8. VALIDACIÓN DEL CEBADOR F\_E26080.

Se examinaron un total de 72 muestras de ARN conformadas por 25 muestras positivas y 47 muestras negativas, tal como se muestra en la figura 25. no se observó amplificación del gen N en la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR que incluía el cebador F\_E26080.

### Figura 25.

Electroforesis de la  $2^{da}$  PCR de las muestras 101-110 utilizando el cebador F\_E26080.



Nota. M1: Marcador de peso molecular de 100pb; M2: Marcador de peso molecular de 50pb CP: gen E 113pb; 101,102, 104, 106, 107 y 109: gen E 113pb; 103, 105, 108 y 110: Muestras negativas;
B: Blanco de reacción; CN: Control negativo.

De acuerdo a los datos de la tabla 31, al incluir el cebador F\_E26080 en la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se obtuvo una sensibilidad de 96%, especificidad de 97.8%, VPP 96%, VPN 98.83%, el coeficiente de kappa se calculó con el programa IBM SPSS statistics 21 teniendo como resultado el valor de 0.93, según los valores descritos por Landis & koch (1977) la RT-qPCR y la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR tienen una concordancia muy buena utilizando el cebador F\_E26080.

### Tabla 31.

Tabla comparativa entre la RT-qPCR y la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR utilizando el cebador F\_E26080.

SEMI-NESTED	RT-qI ESTANDAR	TOTAL	
MULTIPLEX-PCR	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	24	1	25
NEGATIVO	1	45	46
TOTAL	25	47	72

Tal como se muestra en la figura 26, al reemplazar el cebador E\_SARBECO\_F por el cebador F\_E26080 el límite de detección del gen de la envoltura se mantuvo en 1 copia/reacción.

### Figura 26.

Límite de detección del gen E utilizando el cebador F\_E26080.



**Nota. M:** Marcador de peso molecular de 50pb, **1:** reacción con 10 copias de genoma viral, **2:** reacción con 1 copia de genoma viral, **3:** reacción con 0.5 copias de genoma viral.

#### 3.8 DISCUSIÓN

Para el diseño y optimización de los cebadores se consideraron las pautas sugeridas por **Park** *et al.* **(2020),** pero, adicionalmente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias para verificar que la región diana de los cebador sea homogénea y no presente variación entre los diferentes genomas reportados para Perú, se comprobó que la no optimización de la Tm y concentración de los cebadores puede generar productos inespecíficos y dímeros de cebadores que generan la posibilidad de resultados falsos positivos.

Los resultados de sensibilidad y especificidad de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR fueron de 92.31 % y 96.46% respectivamente, estos resultados indican que un paciente enfermo tiene un 92.31% de probabilidad de tener un resultado positivo mientras que un paciente sano tiene un 96.46% de probabilidad de obtener un resultado negativo. Por otro lado, los resultados del valor predictivo positivo y negativo fueron de 90.00% y 97.32%, estos resultados indican que la probabilidad de que un paciente tenga la enfermedad si obtuvo un resultado positivo es del 90%, mientras que la probabilidad de que un paciente no tenga la enfermedad si obtuvo un resultado negativo es del 97.32%.

La SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR logró detectar como positivas 4 muestras que previamente fueron reportadas como negativas por RT-qPCR, estos resultados coinciden con los obtenidos por **Yip et al. (2020) y Wang et al. (2020)** quienes determinaron que debido a su sensibilidad los ensayos basados en PCR anidada reducen la posibilidad de obtener falsos negativos en casos de muestras con escasa carga viral, el límite de detección de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR fue de 1 copia/reacción al igual que **Wang et al. (2020)**, haciéndola más sensible que los ensayos no anidados realizados por **Ishige et al. (2020)** (21 copias/reacción) y **Corman et al., (2020)** (5.2 copias/reacción), a diferencia de los ensayos desarrollados por **Yip et al. (2020) y Wang et al. (2020)**. La SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR no está ligada a la tecnología de la PCR en tiempo real, lo que permite que sea más accesible para los laboratorios que cuenten con tecnología de PCR convencional.

En el presente trabajo el 58.97% de las muestras estudiadas amplificaron exitosamente el gen de la envoltura y la nucleocápside, de forma independiente el 92.30% de las muestras positivas amplificaron exitosamente el gen de la envoltura mientras que el 53.97% amplifico exitosamente el gen de la nucleocápside (tabla

37), teniendo en cuenta que las muestras utilizadas en la presente tesis fueron tomadas entre los 3 y 4 días posteriores al inicio de síntomas, los resultados obtenidos guardan relación con los obtenidos por **Reina & Suarez. (2020).** quienes al analizar 200 muestras positivas para SARS-CoV-2 que fueron tomadas al inicio de la infección, consiguieron amplificación del gen E y N en el 94% y 86.55% de muestras respectivamente, al igual que **Reina & Suarez. (2020)** se observó que la amplificación del gen E se ve más favorecida en etapas iniciales de la infección, no se pudo verificar que la amplificación del gen N sea más abundante en etapas finales de la infección debido a que no se analizaron muestras en etapas finales de la infección, pero, estos resultados demuestran la importancia de un diseño MULTIPLEX donde se incorpora más de un conjunto de cebadores dirigidos a regiones diferentes del genoma para reducir la posibilidad de reportar falsos negativos.

Inicialmente el diseño de cebadores se realizó en noviembre del 2020 (Anexo 7), sin embargo, la adquisición de los cebadores fue posible en mayo del 2021 para lo cual los cebadores **R\_E26268**, **F\_N28147 y R\_N28466** ya habían sido reportados por **Hogan** *et al.* 2021, Lu *et al.* 2021 y Lopez *et al.* 2021, Los cebadores **F\_E26080 y F\_E26131** aún permanecen como propios del presente trabajo, el cebador **F\_E26131** fue desestimado debido a que el tamaño de los amplicones resultantes se encontraba entre los 50 pb y los 76 pb, lo que podría generar confusión con los dímeros formados, no obstante se recomienda el uso del cebador **F\_E26131** con otros cebadores reverse que permitan obtener un amplicon de mayor tamaño.

Al utilizar el cebador **F\_E26080** en la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR no se logró obtener amplificación del gen N en ninguna de las 72 muestras analizadas, la no amplificación del gen N indica que el cebador **F\_E26080** no es un buen candidato para realizar reacciones MULTIPLEX al ser combinado con los cebadores **F\_N28147**, **R\_N28742 y R\_N28466**, sin embargo el límite de detección del gen E se mantuvo en 1 copia/reacción, a pesar de que no se obtuvo amplificación del gen N, al utilizar el cebador **F\_E26080** se obtuvo una sensibilidad de 96%, especificidad de 97.8% y coeficiente de kappa igual a 0.93 (tabla 20) lo que indica una buena capacidad diagnostica para detectar el gen de la envoltura de SARS-CoV-2.

Aunque en la estandarización de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se consiguió eliminar la presencia de dímeros, durante el proceso de validación algunas reacciones de PCR presentaron dímeros de 50pb, dichos dímeros no interferían

con la interpretación de resultados debido a que el tamaño de los amplicones del gen E y N estaban bien definidos y superaban los 100pb, la presencia de dímeros en un número reducido de reacciones no afectó el valor diagnóstico de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR, la no amplificación de 3 muestras que fueron positivas por RT-qPCR puede estar ligada a la rápida degradación del ARN al ser manipulado.

Se consiguió establecer un flujo de trabajo para llevar a cabo una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para el diagnóstico de COVID-19 utilizando cebadores reportados en investigaciones previas y utilizando el nuevo cebador **F\_E26080** diseñado en la presente tesis.

#### CONCLUSIONES

- Se validó una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para el diagnóstico de la COVID-19 producida por SARS-CoV-2, en la región del Cusco.
- El cebador diseñado FE\_26080 de 21 pb, 47.6 % de CG y Tm de 64.2°C amplifica con éxito el gen de la envoltura de SARS CoV-2.
- Se estandarizó una SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR para la amplificación de los genes E y N de SARS CoV-2, donde se incorporan 0.4 μM y 0.8 μM de cebadores en la primera y segunda PCR multiplex, las temperaturas de hibridación de los cebadores son de 64°C y 66°C en la primera y segunda PCR multiplex respectivamente.
- El límite de detección de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR es de 1 copia de genoma viral por reacción.
- La SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR tiene una sensibilidad de 92.31 %, especificidad de 97.35%, valor predictivo positivo 92.31 %, valor predictivo negativo 97.35% y valor del coeficiente kappa de 0.89 lo cual indica muy buena concordancia entre la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR y la RTqPCR.

#### RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar estudios sobre el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en la región del Cusco.
- Debido a la elevada sensibilidad analítica de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR se recomienda tomar precauciones para evitar la contaminación entre las muestras en la segunda ronda de amplificación.
- Para evitar la degradación de las muestras de ARN se recomienda tomar precauciones tales como trabajar en cadena de frio y almacenar las muestras de ARN a -80°C.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Acter, T., Uddin, N., Das, J., Akhter, A., Choudhury, T. R., & Kim, S. (2020). Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. In Science of the Total Environment (Vol. 730, p. 138996). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138996
- Bolívar AM, Rojas A, Garcia, P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en Biomedicina 2014; 3: 25-33
- Carnero, Cristóbal. (2005). Evaluación de las pruebas diagnósticas. Revista De Neurología. 40. 641-643. 10.33588/rn.4011.2005288.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (23 de julio de 2021). Obtenido de https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html
- Chaibun T, Puenpa J, Ngamdee T, Boonapatcharoen N, Athamanolap P, O'Mullane AP, Vongpunsawad S, Poovorawan Y, Lee SY, Lertanantawong B. 2021. Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2. Nature Communications 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-21121-7.
- Corman, V., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M., Mulders, D., Haagmans, 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
- Cortés, M. (2020). Coronavirus como amenaza a la salud pública. Revista Médica de Chile, 148(1), 124–126. https://doi.org/10.4067/S0034-98872020000100124
- Dirección general de epidemiologia (26 de setiembre del 2022). dge.gob.pe. Obtenido de https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/covid-19/covidcajas/situacion-del-covid-19-en-el-peru/

Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf

- Gerencia Regional de Salud Cusco. (2022). Sala Situacional COVID19 por Provincias. Obtenido de https://sites.google.com/view/geresacusco/inicio
- Guan, Q., Sadykov, M., Mfarrej, S., Hala, S., Naeem, R., Nugmanova, R., Al-Omari, A., Salih, S., Al Mutair, A., Carr, M. J., Hall, W. W., Arold, S. T., & Pain, A. (2020). A genetic barcode of SARS-CoV-2 for monitoring global distribution of different clades during the COVID-19 pandemic. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 100, 216–223. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.052
- Hadjinicolaou, A. V., Farcas, G. A., Demetriou, V. L., Mazzulli, T., Poutanen, S. M., Willey, B. M., Low, D. E., Butany, J., Asa, S. L., Kain, K. C., & Kostrikis, L. G. (2011). Development of a molecular-beacon-based multi-allelic real-time RT-PCR assay for the detection of human coronavirus causing severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV): a general methodology for detecting rapidly mutating viruses. Archives of virology, 156(4), 671–680. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0906-7
- Hogan, C. A., Huang, C., Sahoo, M. K., Wang, H., Jiang, B., Sibai, M....Pinsky, B.
  A. 2021. Strand-Specific Reverse Transcription PCR for Detection of Replicating SARS-CoV-2. Emerging Infectious Diseases, 27(2), 632-635. https://doi.org/10.3201/eid2702.204168.
- Instituto Nacional de Salud. (2021). DOCUMENTO TÉCNICO LINEAMIENTOS DE VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS DEL SARS CoV-2. Obtenido 23 julio, 2021, de https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/en/biblio-1118684
- Instituto Nacional De Salud (INS). (2020). Cómo hacer la prueba de COVID-19 Obtenido diciembre 7, 2020, de https://web.ins.gob.pe/es/saludpublica/como-hacer-prueba-covid19.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2020). Virus Taxonomy. Obtenido 28, 2020, de https://talk.ictvonline.org/taxonomy/

- Ishige, T., Murata, S., Taniguchi, T., Miyabe, A., Kitamura, K., Kawasaki, K., Nishimura, M., Igari, H., & Matsushita, K. (2020). Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by MULTIPLEX rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. Clinica Chimica Acta, 507, 139–142. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.023
- Jalali S, Patel VK, Prasad V, Sapre A, Dasgupta S, Bhadra B. Detection of SARS-CoV-2 using high-throughput PCR. J Appl Biol Biotech 2020;8(03):001–005. DOI: 10.7324/ JABB.2020.80301
- La Rosa, G., Mancini, P., Bonanno Ferraro, G., Veneri, C., Iaconelli, M., Lucentini, L., Bonadonna, L., Brusaferro, S., Brandtner, D., Fasanella, A., Pace, L., Parisi, A., Galante, D., & Suffredini, E. (2021). Rapid screening for SARS-CoV-2 variants of concern in clinical and environmental samples using nested RT-PCR assays targeting key mutations of the spike protein. Water research, 197, 117104. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117104
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics, 33(1), 159–174. https://doi.org/10.2307/2529310
- Lopez A, Perez CA, Tonda A, Mendoza L, Claassen E, Garssen J, Kraneveld AD. 2021. Design of Specific Primer Sets for the Detection of B.1.1.7, B.1.351 and P.1 SARS-CoV-2 Variants using Deep Learning. BioRxiv. 2021.01.20.427043. https://doi.org/10.1101/2021.01.20.427043.
- Lu RJ, Zhao L, Huang BY, Ye F, Wang WL, Tan WJ. 2021. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay panel for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and its variants. Chinese Medical Journal 134: 2048–2053. https://doi.org/10.1097/CM9.00000000001687.
- Márquez-Fernández, AJ, Ramos-Ligonio, A., & López-Monteon, A. (2015). ¿Qué sabe Ud. acerca de... la validación de pruebas diagnósticas? Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 46 (3),86-90. [fecha de Consulta 31 de octubre de 2022]. ISSN: 1870-0195. Recuperado de: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57945705010
- Ministerio de Salud. (2022). Covid 19 en el Perú. Obtenido 26 setiembre del 2022, de https://covid19.minsa.gob.pe/sala\_situacional.asp

- Nalla, A. K., Casto, A. M., Casto, A. M., Huang, M. L. W., Perchetti, G. A., Sampoleo, R., Shrestha, L., Wei, Y., Zhu, H., Jerome, K. R., Jerome, K. R., & Greninger, A. L. (2020). Journal of Clinical Microbiology, 58(6). https://doi.org/10.1128/JCM.00557-20
- Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. Experimental and Molecular Medicine, 52(6), 963–977. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0452-7.
- 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.
- Perez, C. A., Tonda, A., Mendoza-Maldonado, L., Coz, E., Tabeling, P., Vanhomwegen, J., Claassen, E., Garssen, J., Kraneveld, A. D., & Lopez-Rincon, A. (2021). Design of Specific Primer Sets for the Detection of SARS-CoV-2 Variants of Concern B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2 using Artificial Intelligence. BioRxiv, 2021.01.20.427043. https://doi.org/10.1101/2021.01.20.427043
- Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A. et al. SARS coronavirus 2: from genome to infectome. Respir Res 21, 318 (2020). https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z
- Reina, J., & Suarez, L. (2020). Evaluación de diferentes genes en la detección por rt-pcr del sars-cov-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección.
  In Revista Española de Quimioterapia (Vol. 33, Issue 4, pp. 292–293).
  Sociedad Española de Quimioterapia.
  https://doi.org/10.37201/req/045.2020
- Saltigeral-Simental P, León-Lara X. Virus SARS-CoV2 ¿Qué se sabe al momento? Acta Pediátrica de México 2020; (Supl 1): 3-7.
- Sambrook J, Russel DW (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

- Santabarbara Serrano, J. (2016). Manual de pruebas diagnósticas simples: evaluación y cálculo del tamaño muestral (Ejercicios resueltos con ayuda de Epidat, Open Epi y R). Prensas de la Universidad de Zaragoza. https://elibro.net/es/lc/unsaac/titulos/44829
- Santos-López, Gerardo, Cortés-Hernández, Paulina, Vallejo-Ruiz, Verónica, & Reyes-Leyva, Julio. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. Gaceta médica de México, 157(1), 88-93. Epub 18 de junio de 2021.https://doi.org/10.24875/gmm.20000505
- 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 real. Investigación en Discapacidad, 2(2), 70–78. Obtenido de http://www.medigraphic.com/rid
- Wang, J., Cai, K., Zhang, R., He, X., Shen, X., Liu, J., Xu, J., Qiu, F., Lei, W., Wang, J., Li, X., Gao, Y., Jiang, Y., Xu, W., & Ma, X. (2020). Novel One-Step Single-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2. Analytical chemistry, 92(13), 9399–9404. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01884
- World Health Organization (WHO). (2020). Detección de antígenos en el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 mediante inmunoensayos rápidos. Obtenido diciembre 7, 2020, de https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosisof-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays
- World Health Organization (WHO). (2020). Orientaciones técnicas. Obtenido diciembre 7, 2020, de https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance
- World Health Organization- WHO (2020). Pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) en casos presuntos en humanos.
  Obtenido diciembre 6, 2020, de https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501
- World Organizatio Health (WHO). (2021). Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. Obtenido 23 de julio del 2021 de WHO web site: https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/

- Yip, C. C., Sridhar, S., Leung, K. H., Ng, A. C., Chan, K. H., Chan, J. F., Tsang, O. T., Hung, I. F., Cheng, V. C., Yuen, K. Y., & To, K. K. (2020). Development and Evaluation of Novel and Highly Sensitive Single-Tube Nested Real-Time RT-PCR Assays for SARS-CoV-2 Detection. International journal of molecular sciences, 21(16), 5674. https://doi.org/10.3390/ijms21165674
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine, 382(8), 727–733. https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017

# ANEXOS

### UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO SECRETARIA GENERAL

#### RESOLUCION Nro. R-540-2020-UNSAAC.

#### Cusco, 31 de julio de 2020

#### EL RECTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO:

**VISTO**, el Oficio Virtual N° 374 -2020-VRIN-UNSAAC, registrado con Expediente Nro. 264554, presentado por el **Dr. GILBERT ALAGON HUALLPA**, Vicerrector de Investigación de la Institución, solicitando aprobación de presupuesto y conformación de Equipo de Investigación Adaptativa UNSAAC-COVID-19, que se indica, y:

#### CONSIDERANDO:

Que, mediante Resolución Nro. CU-161-2020-UNSAAC de fecha 07 de mayo de 2020, se aprueba los LINEAMIENTOS Y BASES DE CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ADAPTATIVA UNSAAC-COVID 19;

Que, asimismo, con Resolución Nro. R-446-2020-UNSAAC de fecha 20 de junio del 2020 se DECLARA GANADORES de la CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA DE "PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ADAPTATIVA UNSAAC COVID 19" primera ventanilla, a los once (11) Proyectos de Investigación que obtuvieron mayor puntaje;

Que, a través del primer numeral de la Resolución Nro. CU-220-2020-UNSAAC de fecha 02 de julio de 2020 se aprueba la **GUÍA DE ACOMPAÑAMIENTO Y MONITOREO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ADAPTATIVA UNSAAC COVID-19**, presentado por el Vicerrectorado de Investigación;

Que, al respecto mediante expediente de Visto, el **Dr. GILBERT ALAGON HUALLPA**, Vicerrector de Investigación de la Institución, hace de conocimiento que, mediante Resolución N°R-446-2020-UNSAAC, de fecha 20 de junio del 2020 se declara ganadores de la Convocatoria Extraordinaria de "Proyectos de Investigación Adaptativa UNSAAC COVID 19" Primera Ventanilla, a once (11) Proyectos de Investigación que obtuvieron puntaje aprobatorio, resultando seleccionado, entre otros, el Proyecto titulado "**ESTUDIO DE GENOMAS DE SARS-COV-2 Y SU APLICACIÓN AL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO ADAPTADOS PARA LA REGIÓN DE CUSCO**" con un plazo de ejecución de cuatro (4) meses, de acuerdo al numeral 2.5.1 de las bases, cuyo investigador principal es la **DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE**, Profesora Auxiliar a Tiempo Parcial de 20 horas en el Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias de la Institución;

Que, asimismo, indica que mediante Resolución Nº CU-220-2020-UNSAAC de 02 de julio de 2020, se aprueba la GUÍA DE ACOMPAÑAMIENTO Y MONITOREO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ADAPTATIVA UNSAAC COVID-19, que consta de Aspectos Generales, Acompañamiento durante la ejecución y Disposiciones Finales y diez (10) anexos que forman parte de la citada Resolución;

Que, por tal motivo solicita aprobación del presupuesto por el importe de S/ 50.000,00 (Cincuenta mil con 00/100 soles) de conformidad a la Certificación de Crédito Presupuestario Nº 1189, remitido por la Unidad de Presupuesto de la Dirección de Planificación, asignado al Proyecto de Investigación titulado: **"ESTUDIO DE GENOMAS DE SARS-COV-2 Y SU APLICACIÓN AL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO ADAPTADOS PARA** 



**LA REGIÓN DE CUSCO**", con un plazo de ejecución de cuatro (4) meses, de acuerdo al numeral 2.5.1 de las bases. Así como la conformación del Equipo de Investigación Adaptativa UNSAAC-COVID-19, de acuerdo al siguiente detalle:

Rol	Grado	Nombres y Apellidos	Entidad a la que pertenece
Investigador Principal	Doctor	María Antonieta Quispe Ricalde	UNSAAC
Co-Investigador	Biólogo	José Luís Sierra Herrera	Posgrado UNSAAC
Co-Investigador	Doctor	Sonia Dávila Ramos	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Doctor	Ramón Batista García	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Magíster	Hugo Girdardo Castelán Sánchez	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Doctor	Néstor Abreu Acosta	Nertalab
Asistente de Investigación	Estudiante	Briseida Peceros Ortega	UNSAAC
Asistente de Investigación	Estudiante	Edgar Jesús Huaycho Guzmán	UNSAAC
Tesista	Bachiller	Brandon Jason Soto Chambi	UNSAAC

Que, conforme a lo señalado la Jefa de la Unidad de Presupuesto de la Dirección de Planificación expide la Certificación de Crédito Presupuestario N° 1189-2020 indicando la afectación presupuestal para atender lo solicitado, conforme al anexo que forma parte de la presente resolución;

Que, la Autoridad Universitaria ha tomado conocimiento de la comunicación cursada por el **Dr. GILBERT ALAGON HUALLPA**, Vicerrector de Investigación de la Institución y ha dispuesto la emisión de la resolución correspondiente;

Estando a lo solicitado y de conformidad a lo dispuesto por el Decreto de Urgencia Nro. 014-2019 que aprueba el Presupuesto del Sector Público para el Año Fiscal 2020, Resolución Viceministerial N° 081-2020-MINEDU, Decreto de Urgencia N° 26-2020 y en uso a las atribuciones conferidas a este Rectorado por la Ley y Estatuto Universitarios;

#### **RESUELVE:**

**PRIMERO.- APROBAR** el presupuesto por el importe de S/ 50.000,00 (Cincuenta mil con 00/100 soles) para ejecución de gastos del Proyecto de Investigación titulado: **"ESTUDIO DE GENOMAS DE SARS-COV-2 Y SU APLICACIÓN AL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO ADAPTADOS PARA LA REGIÓN DE CUSCO"**, cuyo investigador principal es la **DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE**, Profesora Auxiliar a Tiempo Parcial de 20 horas en el Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias de la Institución.

SEGUNDO.- DISPONER que la Dirección General de Administración proceda con la ejecución de gastos del Proyecto de Investigación titulado: "ESTUDIO DE GENOMAS DE SARS-COV-2 Y SU APLICACIÓN AL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO ADAPTADOS PARA LA REGIÓN DE CUSCO", cuyo investigador principal es la DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE, Profesora Auxiliar a Tiempo Parcial de 20 horas en el Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias de la Institución.

TERCERO.- CONFORMAR el Equipo de Investigación Adaptativa UNSAAC-COVID-19, del Proyecto de Investigación titulado: "ESTUDIO DE GENOMAS DE SARS-COV-2 Y SU APLICACIÓN AL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO ADAPTADOS PARA LA REGIÓN DE CUSCO" cuyo investigador principal es la DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE, de acuerdo al siguiente detalle:



Rol	Grado	Nombres y Apellidos	Entidad a la que pertenece
Investigador Principal	Doctor	María Antonieta Quispe Ricalde	UNSAAC
Co-Investigador	Biólogo	José Luís Sierra Herrera	Posgrado UNSAAC
Co-Investigador	Doctor	Sonia Dávila Ramos	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Doctor	Ramón Batista García	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Magíster	Hugo Girdardo Castelán Sánchez	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Co-Investigador	Doctor	Néstor Abreu Acosta	Nertalab
Asistente de Investigación	Estudiante	Briseida Peceros Ortega	UNSAAC
Asistente de Investigación	Estudiante	Edgar Jesús Huaycho Guzmán	UNSAAC
Tesista	Bachiller	Brandon Jason Soto Chambi	UNSAAC

**CUARTO.- EL EGRESO** que se origine por aplicación de la presente Resolución se atenderá con cargo a la Certificación de Crédito Presupuestario N° 1189-2020 conforme al detalle que aparece en el anexo que forma parte de la presente resolución;

**QUINTO.- DEJAR ESTABLECIDA** la obligación de la **DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE**, investigador principal y de sus integrantes de suscribir contrato ante la Dirección de Gestión de la Investigación del Vice Rectorado de Investigación, a través del medio electrónico en el plazo de cinco (05) días hábiles de notificado con la presente Resolución.

El Vicerrectorado de Investigación, la Dirección de Planificación, la Dirección General de Administración, deberán adoptar las medidas complementarias del caso para el cumplimiento de la presente Resolución.

REGISTRESE, COMUNIQUESE Y ARCHIVESE.



TR: VRAC.-VRIN.-OCI.- DIRECCION DE GESTION DE LA INVESTIGACION.- DIRECCION DE INNOVACION Y TRANSFERENCIA.-DIRECCION DE EMPRENDIMIENTO.- GESTION.-CONSEJO DE UNIDADES DE INVESTIGACIÓN.- DIRECCION DE PLANIFICACION.- U. PRESUPUESTO.- DIGA.- U FINANZAS.- U LOGISTICA.- A TESORERIA.- A INTEGRACION CONTABLE.- A. EJECUCION PRESUPUESTAL.- A ADQUISICIONES.- A DISTRIBUCIÓN.- A MANTENIMIENTO Y SERVICIOS .- FACULTAD DE CIENCIAS ADMINISTRATIVAS, CONTABLES, ECONÓMICAS Y TURISMO.- DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE ECONOMIA.- U TALENTO HUMANO.- A EMPLEO.- A REMUNERACIONES.- A ESCALAFÓN PENSIONES (02) .- DRA. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE .- EQUIPO DE Y INVESTIGACIÓN (09).- DIRECCION DE ASESORIA JURIDICA.-RED DE COMUNICACIONES IMAGEN INSTITUCIONAL.-SINDUC.-ARCHIVO.SG: JEMA/MCCH/JGPF/MQL.-

Lo que transcribo a usted, para su conocimiento y fines consiguientes.

Atentamente,

A de San Antonio UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCU ABOG. MARIAM CAJIGAS CHAVE7. SECRETARIA GENERAL (0) del C

#### Anexo 2. Aprobación del comité de ética UNSAAC.

Comité de Bioética Institucional y Sub Comités de Bioética de la UNSAAC

Cusco, 12 de enero de 2021

#### Oficio virtual Nº 002-2021-CBI-UNSAAC

Dra. María Antonieta Quispe Ricalde

Departamento de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

# **ASUNTO** : Informe final sobre aspectos bioéticos en proyecto de investigación.

De mi mayor consideración:

Previo un cordial y atento saludo, el presente es para remitir a usted el informe CBI-UNSAAC2021-001 de la revisión final a aspectos bioéticos del proyecto "**Estudio de** genomas SARS-CoV-2 y su aplicación al diseño de nuevos sistemas de diagnóstico adaptados a la región Cusco".

En la revisión del proyecto han participado los miembros del Subcomité de ética de ensayos clínicos y estudios clínico epidemiológicos en seres humanos.

A su vez, hacer de su conocimiento que una vez finalizado la ejecución del proyecto de investigación antes indicado, debe de remitir al CBI-UNSAAC una copia del informe final.

Sin otro particular, uso de la ocasión para expresar las consideraciones de nuestra estima personal y le deseamos éxito en su investigación.

Atentamente,

Fdo. Dr. Ramón Figueroa Mujica. Presidente del Comité de Bioética Institucional de la UNSAAC <u>comite.bioetica@unsaac.edu.pe</u>

C.C.Archivo /MAQR

#### Código: CBI-UNSAAC2021-001

#### INFORME FINAL DE ASPECTOS BIOÉTICOS DEL PROYECTO

#### **Datos del Investigador Principal**

Nombre: Dra. María Antonieta Quispe Ricalde

Facultad: Facultad de Ciencias.

#### Departamento académico: Biología.

Universidad: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Correo electrónico: antonieta.quispe@unsaac.edu.pe

#### Teléfono: 973512698 Datos del Proyecto de investigación

**Título:** "Estudio de genomas SARS-CoV-2 y su aplicación al diseño de nuevos sistemas diagnóstico adaptados a la región Cusco".

Fecha de ingreso: 18-11-2020

#### Fecha de emisión de informe final: 12-01-2021 Resultado de la evaluación a aspectos bioéticos y metodológicos: APROBADO.

**Observaciones:** El proyecto presentado a consideración del Comité de Bioética Institucional en Investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (CBI-UNSAAC), ha sido evaluado por el Subcomité de Bioética en Ensayos Clínicos, Estudios Clínicos Epidemiológicos en Seres Humanos (SCBI-SH-UNSAAC), emitiendoel informe Nº 006-2020-SCBI-SH-UNSAAC, donde se consideró observaciones tanto desde el punto de vista ético como desde el punto de vista metodológico. La investigadora principal cumple con el levantamiento de observaciones, documentos que han sido revisados por el SCBI-SH-UNSAAC, dando por levantadas las observaciones a través del informe Nº 01-2021-SCBI-SH-UNSAAC.

Atentamente,

Ramon Figueros MEDICO - CIRUJANO CMP. 10352 - RNE. 5357

Dr. Ramón Figueroa Mujica. Presidente del Comité de Bioética Institucional de la UNSAAC comite.bioetica@unsaac.edu.pe

# ANEXO 3: OFICIO N° 063-2020-GR CUSCO/GRSC-DG-DEIS, Conformidad para inicio de estudio de investigación científica.

	"MIO DEL BICENTENARIO DEL PENU 200 RADIA DE INCEPENDENCIA"
	CURCO, D 1 FEB 2021
	OFICIO Nº 04.3 -2020-GR CUSCOIGRSC-DG-DEIS
	A Dra Mana Antoneta Guepe Ricalde
	DE Drector Elemano de Inteligencia Sanitana
	ASUNTO Contormidad para inicio de estudio de envestigación Gentifica
	REFERENCIA, Olicio Nº007-2020 Proy Res-640 2020 UNSAACIFC/MAGR
	Por el presente me dirijo a Usted, habieredo recibido los documentos de la Referencia. "Estudio de genomas de SARS-CoV-2 y su aplicación al disaño de nuevos sistemas de diagnóstico adaptados para la región Cusco". Se ha realizado la venificación correspondiente y tenendo la aprobación del Sub comite de ética institucional de la UNSAAC, esta Dirección Ejecutiva, emite su conformidad para el inicio del refundo estudio. Es cuanto hago flegar a usted, refero un saludo y estima personal:
	Alextamenter
C.	

## Anexo 4: RESULTADOS DE LA RT-qPCR y la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR

para los ensayos de validación se excluyeron las muestras 86, 96 y 140.

CODIGO UNSAAC	RT-qPCR	SEMI- NESTED MULTIPLEX PCR	GEN E	GEN N
1	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
2	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
3	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
5	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
6	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
7	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
8	POSITIVO	POSITIVO	+	-
9	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
10	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
11	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
12	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
13	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
14	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
15	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
16	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
17	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
18	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
19	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
20	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
21	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
22	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
23	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
24	POSITIVO	POSITIVO	+	+
25	NEGATIVO	POSITIVO	+	-
26	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
27	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
28	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
29	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
30	POSITIVO	POSITIVO	+	+
31	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
32	NEGATIVO	POSITIVO	+	-
33	NEGATIVO	POSITIVO	+	-
34	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
35	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
36	POSITIVO	POSITIVO	+	+
37	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
38	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
39	POSITIVO	POSITIVO	+	-

CODIGO UNSAAC	RT-qPCR	SEMI- NESTED MULTIPLEX PCR	GEN E	GEN N
40	POSITIVO	POSITIVO	+	+
41	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
42	POSITIVO	POSITIVO	+	+
43	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
44	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
45	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
46	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
47	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
48	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
49	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
50	POSITIVO	POSITIVO	+	-
51	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
52	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
53	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
54	POSITIVO	POSITIVO	+	-
55	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
56	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
57	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
58	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
59	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
60	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
61	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
62	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
63	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
64	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
65	POSITIVO	POSITIVO	+	-
66	POSITIVO	POSITIVO	+	+
67	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
68	POSITIVO	POSITIVO	+	-
69	POSITIVO	POSITIVO	+	-
70	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
71	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
72	POSITIVO	POSITIVO	+	-
73	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
74	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
75	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
76	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
77	POSITIVO	POSITIVO	+	+
78	POSITIVO	POSITIVO	+	+
79	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-

CODIGO UNSAAC	RT-qPCR	SEMI- NESTED MULTIPLEX PCR	GEN E	GEN N
80	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
82	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
83	POSITIVO	POSITIVO	+	+
84	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
85	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
86	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
87	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
88	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
89	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
90	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
91	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
92	POSITIVO	POSITIVO	+	+
93	POSITIVO	POSITIVO	+	+
94	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
95	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
97	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
98	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
99	POSITIVO	POSITIVO	+	+
100	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
101	POSITIVO	POSITIVO	+	-
102	POSITIVO	POSITIVO	+	-
103	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
104	POSITIVO	POSITIVO	+	+
105	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
106	POSITIVO	POSITIVO	+	+
107	POSITIVO	POSITIVO	+	+
108	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
109	POSITIVO	NEGATIVO	-	-
110	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
111	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
112	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
113	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
114	POSITIVO	POSITIVO	+	-
115	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
116	POSITIVO	POSITIVO	+	+
117	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
118	POSITIVO	POSITIVO	+	+
119	POSITIVO	POSITIVO		+
120	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-

CODIGO UNSAAC	RT-qPCR	SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR	GEN E	GEN N
121	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
122	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
123	POSITIVO	NEGATIVO	-	-
124	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
125	POSITIVO	NEGATIVO	-	-
126	POSITIVO	POSITIVO	+	-
127	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
128	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
129	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
130	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
131	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
132	POSITIVO	POSITIVO	+	+
133	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
134	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
135	POSITIVO	POSITIVO	+	+
136	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
137	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
138	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
139	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
141	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
142	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
143	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
144	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
145	POSITIVO	POSITIVO	+	+
146	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
147	POSITIVO	POSITIVO	+	-
148	POSITIVO	POSITIVO	+	+
149	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
150	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
151	NEGATIVO	POSITIVO	+	-
152	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
153	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
154	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-
155	POSITIVO	POSITIVO	+	+

#### Anexo 5: Preparación de buffer de electroforesis TBE 5X

Para preparar 1000ml de buffer se utilizó:

- Tris base 54g
- Acido borico 27.5g
- EDTA 0.5M pH 8.0 20ml
- Agua destilada 980ml

En un frasco de vidrio se vertió 500ml de agua destilada, posteriormente se agregó 54g de tris base, ácido bórico, 27.5 y EDTA 20ml, finalmente se aforó a un volumen de 1000ml
## Anexo 6: Alineamiento múltiple de secuencias de SARS-CoV-2.

1	MW030193.1	23	MW030215. 1	45	MW030237.1	67	MW030259.1
2	MW030194.1	24	MW030216. 1	46	MW030238.1	68	MW030260.1
3	MW030195.1	25	MW030217.1	47	MW030239.1	69	MW030261.1
4	MW030196.1	26	MW030218.1	48	MW030240. 1	70	MW030262.1
5	MW030197.1	27	MW030219. 1	49	MW030241.1	71	MW030263.1
6	MW030198.1	28	MW030220.1	50	MW030242.1	72	MW030264.1
7	MW030199.1	29	MW030221.1	51	MW030243.1	73	MW030265.1
8	MW030200.1	30	MW030222.1	52	MW030244.1	74	MW030266.1
9	MW030201.1	31	MW030223.1	53	MW030245.1	75	MW030267.1
10	MW030202.1	32	MW030224.1	54	MW030246. 1	76	MW030268.1
11	MW030203.1	33	MW030225.1	55	MW030247.1	77	MW030269.1
12	MW030204.1	34	MW030226. 1	56	MW030248.1	78	MW030270.1
13	MW030205.1	35	MW030227.1	57	MW030249.1	79	MW030271.1
14	MW030206.1	36	MW030228.1	58	MW030250.1	80	MW030272.1
15	MW030207.1	37	MW030229. 1	59	MW030251.1	81	MW030273.1
16	MW030208.1	38	MW030230.1	60	MW030252.1	82	MW030274.1
17	MW030209.1	39	MW030231.1	61	MW030253.1	83	MW030275.1
18	MW030210.1	40	MW030232.1	62	MW030254.1	84	MW030276.1
19	MW030211.1	41	MW030233.1	63	MW030255.1	85	MW030277.1
20	MW030212.1	42	MW030234.1	64	MW030256.1	86	MW030278.1
21	MW030213.1	43	MW030235.1	65	MW030257.1		
22	MW030214.1	44	MW030236.1	66	MW030258.1		

Numero de acceso de 86 secuencias de SARS CoV-2 obtenidas del NCBI.

### Cebadores dirigidos al gen E.

Eξ	SARBECO	F:	5' ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT 3' (	26 nt)
----	---------	----	------------------------------------	--------

that had been digitized put beaution fights rest.	
신無權力 回將回送為 눈도 바친사진 비장 수권 위에 죽을 들을	
Bith Seamershi Kambard Imites Separation	
terminest .	
M. B. 1921 J. New York, S.	**************************************
B. PETRON Device in a number of the store	48227427727777777777
	ABEBT ACTILITITITLITE ABEBT ACTICTITITLITE
If Protocol Developmental product solutions in the protocol Development of the protocol of the transformation of the protocol o protocol of the protocol occulor occul of the protocol occul o	AGEGPACTTUTTTTTTTTT
F. P. 2011 2011 4 (a) 100 (c) 1 (c) 100 (c) (c) 100 (c) (c) 100 (c) (c) 100	1000 F101 F01 F01 F1 F0 F10 1000 F10 F10 F10 F17 F170
(i) Provide Annual Provide Annual Annua Annual Annual Ann Annual Annual Annu	100 C+01101111111110
27 47/024 Serie	-400TLOTTOTTTTTTT
() () () () () () () () () () () () () (	LECEPLETTCHITISTIC
	LICUTACT CONTINUESTI
T BUTCH INFORMATION CONTRACTOR AND A CONTRA	ARCHIELE CONTENTION
	HALL ACTICTITITETTE
	AGERTACTICITICTIE
EXECUTE OPERATION AND ADDRESS OF A DESCRIPTION OF A DESCR A DESCRIPTION OF A DESCRIPTION	CELTACITETTTTTCTTEL
n maarii a qulaa diga aha ba dhadaan waxa chaamaan waxaa di ahaan ahaanaa ahaanaa ahaanaa ahaanaa ahaanaa ahaa Ara-1991 Gaara ahaa daga daa ahaan ahaan 1992 - Yaarii Gaara Williamaa ahaa ahaanaa ahaanaa ahaanaa ahaanaa ahaa	+0C07+C71C1111112112
	anegy act for the set of
Sav 1	familial points' print blands

# E\_SARBECO\_R: 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3' (22 nt)

Dat he part parent in tegens byte in-	
な無意思 回時回 からげる 本自然市区の注意 オル もりうた	
PUllimenter Installerationeran	
teesiter	AND ADDRESS OF A DECK AND ADDRESS OF ADDRESS OF A DECK AND ADDRESS OF ADDRESS
a second contract of the second se	ATOTACATAS TAS TAS A TASTA TATTA A LATGAGTOTY
the second design of the second se	TATATATATATATATATATATATATATATATATATATA
H REVENUES AND A REVENUES	TATATAGATACTAC TACASTAT TATTACIATORATOTI
A set of a second se	INTO THE DEPOSITOR AND ADDRESS OF THE PARTY OF THE
	INTOTOTAL AND THE TOTAL THE THE TALLATOANTOTE
to work 2017 a resonance of a communication of the Automatic Community and a second second second second second	CATATOCATAR TAR TARTAT TA PTARIATOAGTOTT
A RECEIPT AND A REPORT OF A	APAracates tertes as tertestatowarott
ALL A LOUGH A REPORT OF A REPORT	TATATAANTAATEETAAAAATATINTAALATAANTOIT
AT ALTICAL PLANT AND A THE ATTACK AND A	THE PROPERTY AND THE PART OF TAXABLE TO A DITCH
AL AVECUSED FOR THE DESCRIPTION OF THE DESCRIPTION	INTATACATACTECTERSTATISTICS CALARAGE
In Property of the second	APARAGE LASTAL VALUE VALUE VALUE AND
The statest device a second	TATALANTANTEL TARANTAT TATIANLATAANTONT
11 Property in the second se	TREATOCHTECT AND TREAM THE TRACE TO ADTUTE
TO PUTCH A TWO IN A REAL AND A REAL ADDRESS AND A	TITUTOCUTAL TAL TAL AALAATAT SECTIAGED AGTOAGTCTT
TO REPORT AND ADDRESS AND ADDRESS ADDRES	THE PRESENCE THE PRESENCE PRODUCED OF THE PROPERTY OF THE PROP
If it would have been as an analysis down on the different control on the Microsov stores of a sector of CCTTACTEDIC FEERAL	1010100月74日日月日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日日
The Product of The Land Annual Product and Annual Transfer Section Database Street Section Database Section 21 C 1 T 1 C 1 T 1 C 1 C 1 C 1 C 1 C 1 C	CHARTECHTELTELTELTELTETTTLAACUTOAUTURT
The experience of the end of the	THEFT CONTACT DE LIE CARTANTIE CARLONGAGICTT
TERRET PRODUCT STATE AND ADDRESS AND ADDRESS AD	STREET, STATES AND
The public Control of Section of Section 1 and Section 2 a	TOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTO
The Process of the second s	TOTOTOCHIELTOP THE RATE! TOTTABLOTOKOTOTO
IS \$10000737 fairs and an end of property constants (and provide the constant (20) respectively and TV (TTALTALATTICS)	THEFT FOR HELP AND ADDRAGES TATCALS FOR A CONTRACTOR
11 British 11 Generation and an and an annual for an and a state of the second	INTOTOCOLOUTON TETTER TOTOLOGICALOTOLC
(i) PUTOCAT Several production because a several production (in the Second Conception Conception product TTAL TO ) # * * * * * * * * * * * * * * * * * *	TOURISTON OF THE REAL PROPERTY OF THE PROPERTY
40 WHORT Serve and management and an and serve server s	STGTGUSTANTUNTCERTATION CARPETOANTOFTS
to applicable international managery systems are uncomenced and the construction of th	TATALACATES TECESTST TETLALACATESPTT
HE PURCENT I AN ADVANCE AND ADVANCE AND ADVANCE AND ADVANCE ADVA	TOTOTOLOGICAL TETLECTORE CALLER CALLE
IN RECENT CAREFORD IN THE RECENT AND A DESCRIPTION OF THE RECENT OF THE RECENT OF THE PARTY OF	TREATER TRETERATET TETTALST CLARCE
If All 2011 (International Systems International Toront Cold Stream Philipped and and Table 12, 177 all 73, 73, 73, 73, 74, 75	INTERPORTER FOR THE
The second secon	Territorian and Marine
	manual functions of the state

## F\_E26085: 5' TCGGAAGAGACAGGTACGTT 3' (20 nt)

(a) in part Apres in Spree loss the	
Deela Dealer + Dx0x0x0+046 0245	
1955 Sugartinii Bardanad Anto-Sanamur-	
Particular and a second s	the second s
In an MSH Server a support a support to the AMM SHOW STREET AND AND AN AND AND AND AND AND AND AND	I DOGARDADATESTELLITESTAGTIASTWOCUTAS
to a state of the second second second second second second the second	TY DEMEDSION AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN
I Provide Concerning and an environment of the second state of the	TARAABABACABBYABBYYABBYYAATABYABYAATAB
<ol> <li>Printing in the second management of the second finance of the second finance of the second se</li></ol>	TEFRENAMALALITALITALITALITALITAL
Company and a second seco	**************************************
The second research is the second sec	TERRAARAARAARAARAARAARAARAARAARAARAARAARA
L P. COMP. D	TARABABASASASASASASASASASASASASASASASASAS
In Pressel income and the second se	CEPERNANAL SERVICE TALLATAGTTAGTAGEDTAL
a. Purpossi i face you de sumdary and you and your 1 and a line of any film on any segment of a set	LASAAAAATTIIITAITAITTAATAACITA
	THE REPORT OF A DECK AND A DECK A
	Contract of the second of the state of the state of the second of the se
	The same of the second state of the state of the
	THE RANADADADADADADADADADADADADADADADADADADA
If he was a second se	TERRANANA CARRENA STRATES TARTA STRATES AND A STATES
it is not the set of t	TERMANDERER FALSA CAACAACCAATAGE CTAE
In a count factor of several entropy of the last and a count for each of the several and a several and the sev	TATO SOLTANT DATA ATTACATE AND
TI Benotopi Guaran wana day paying coopera jitan period at tang Bio cattor it many pana at TTATATATATATATATATO	TENDEROROALEESTEESTEESTEESTEESTEETEETEETEETEETEETEE
11 British Games & water burner strength ( ) and table to grant the outlinest reason prove to 7774747474748 ( ) a TTO 3 TT	ALTO SOLTANT DATA ATT BEAT & A TAOL OF OTAL
The PURCHAGE AND A DESCRIPTION OF A DESC	ILEGARDADADATESTERETTAATAATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
In Participation of the American American American American Conception Comparison Decempentational American Am	TEOGREPACKERS TATESTINATION TATION OTAP
M. Percent Strategies and day prome construct the Construction of Stronger Science and and strategies and ATTATETATECATION	ELODALVAVALASE TASERCAA FAGTTASTA020748
(c) Service U. Service in the service contract (service) (servi	PREVACE ADDITESTICATION CALLED ADDITESTICAL
ID PUDDENT I Server must be and a summer summer and table 1000 prover that an Oxford Server prove 2111111111111111111111111111111111111	**************************************
In Protect I design and an entry of the entry of the Control Control of the second distance of the second secon	CHARACTER CTREETLETERTINGTICATION OT AL
IS PRODUCT IN A REAL PROPERTY IN A REAL PROPERTY INCOME. THE REAL PROPERTY IN A REAL PROPERTY INTERNATION A REAL PROPERTY IN A REAL PROPERTY IN A REAL PROPERTY IN A REAL PROPERTY INTERNATION A REAL PROPERTY INTERNATION A REAL PROPERTY INTERNATION A REAL PROPERTY INTERNATION A REAL PROPERTY	TERRESSEE ACCTACCTACTACTACTACTACTA
In putting the same maker and and the last to the present the second present of the same present of the same same same same same same same sam	TEREST STATEST STATEST SALES STATEST SALES STATEST SALES SA
** PURSON 1 (2014) 10 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1	TERASES ARE ARE TARTACTANTARTAL
A state of the state	Investigation of the second se

# R\_E26176: 5' GTACGCACACAATCGAAGCG 3' (20 nt)

De De Del Anneel III November 1985 DAY 「由島は同時間かん」と「 本氏文氏虫(A) 本名(A) ある(A) A	
the second part of the condition of the second property of the secon	
The Utilized and the second second agreed with the second because the second seco	TRETOETECANTATT&TTATTAL
Exercise of the end of the end of the end of the second s second second se second second s	THE TOSTOSAATATTETEAA
	THE TRETACHETATISTICS.
Interest distance in the second system in the control of the lattice world, control of the planet advice of the tract o	THE TRET GERMAN ANT MUT AND
I here in a second second second second in the second in the second in the second in the second second second second second in the second second in the second s	THE THE THEAN THEFT THAT
	THE FREE MEANTHREE .
	THE TREAM ANTICT AND
a landson i he we want want of the second also hits Del Del Marger (2000) a mare price ACAC FAAC FATCETTACTE (1740) a FTCETTACTE (1740) a FTCETTACTE	19.82年的広学的広点的大学会生生活生活
	THE THE THE ANTATTATTAL
	PARTER, THEASTER TRATER, THE
	TAN THE ALTERTAL
1. Verocettic ( in second methods) and a classical and sets ( down and the set classical and a set of the s	THE VECTOR ATAATBARAAA
	THE TUETDEPATHARARARA
	FREENETEEAATATEEEAA
N NOTIFIE THE A REAL POINT AND A REAL PARTY AND A REAL POINT AND A REAL POINT	· ADIDDIDDAATATTATTAA
	TAL TOLIGLAATATISTAA
Children 1 - Lawrence and a strategy of the second strategy of	THE FEETOFAMILTINTIAL
The state of the property of the particular ballon in the state of the	TACTOL TERANTETTETTAN
Charles and the second s	TAK TOCTOFANTATESTIAN
The second s	TAL TOCTOCASTATISTIAN
A NEW TOTAL PROPERTY AND	TARTECTREALTSTITETTAR
	TANTON TEZASTATISTICS
I MARKET I DE MARKET MARKET MARKET AND AND AN	TACTOCTOCUATATTATTAL
	TRETRCHATATTETTELES!
The second se	ATTRETERATIONAL TATTAN
A REAL PROPERTY AND	TATISC TREASTSTITETAS
NAMES IN THE OWNER OF THE PARTY	TARTOC TOCAL TATTATTAS
	TAL TAL TOTANTATTATTATTA
	TAL TOTTOTANTATTATTAN
	TATTECTOCASTATIATTAS
terr to Gran Longer	Desceri profes role Similari

## R\_E26268: 5' CCAGAAGATCAGGAACTCTAGAAGA 3' (25 nt)

De lit Sect Avenue på tegene tern He Can Der Man Mint ( ) - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - 2 - 4 - 2 - 2 - 4 - 2 - 2	1
DBA Sequences Tansand Preser Tegarces	
Taxina Many	THE REPORT OF THE PARTY OF
IN INVIOUS 1 Seven acids on primary and one construct 2 areas SARS-CV_Stander#Electrone(2000) inspense process 101144444101044710111044710110401100000000	TOTAAACOAACTARA
ati MMXXXX21 Severa asiati muumitri autotimi containu 2 anaa 3485.CV/29uart/Elicityard20000 integen protein TOTTAAAAATCT044772172148+07T0278+70770278+707701	TETRARCORACTARS
at monthalls tilever and remaining and composing 2 area SARCer / Private #Representation and to The Tel Tel Tel Tel Tel Tel Tel Tel Tel Te	TOTAAAOOAAOTAAA
ALL MODULE / General and maximum containing containing and SARS CP / 2numer/Effictive=1220000 company printer of 0 T 1 4 A 4 A 4 T C T 0 A 4 T T C T C T C T C T C T C T C T C T C	TOTAAACOAACTARE
10.000000011 Denie auto manimum annimum communa 2 autor Sall Col 2 numer (Ballico coment process TOTTAAAAATCTOAAT <mark>TETTETH BAUTTOETBATTTETH AND TETTETH AND TETTE</mark>	TOTAAACOAACTAAA
AN AMOUNT THREE AND MARKED AND MARKED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN	TOTARACOARCTARE
(i) MODDED: I Server Auto maximum and the and Table 20 disearCED conservations prove prime TOTTAAAAATETOAAATETOAAATETOADACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOADACTETOACTETOADACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOACTETOATACTETOACT	TUTAAAUGAAUTAAA
(a) MODIFIED TEACHER AND INCOME AND	TUTAAACOAACTAAA
42 MNOTONI LIGHTER ACK TRAINING AND MEDITARY 2 STREET AND COLOR JOURNAME BODD STREET ALL ALL TICLAR ALL T	TUTAAACOAACTAAA
All BRYCEDIO 1 Bener scatt machine control control control control and Col Journay/Elicorge/Epicol angely process T 0 T T 4 4 4 4 4 7 C T 0 4 7 C T 0 4 4 7 C T 0 4 7 C T 0 4 4 7 C T 0 4 7 C T	TUTAANCOANCTARE
an MMODER 1 Development and maximum and we instance 2 even GAS-Coll 2numer RECouper SUDDED service percent of 17444447 CT044T1CT1CT4T4T04T1CT04T1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT1CT	TETRAACSAASTAAR
IN MNODE 1 (Print automation undererainmanys) automation (2002) and the print of the second s	*ETAAACEAACTAA#
TI MAXODD) 1 Deter state fearably and we contained 2 and 500 200 Provem Plance 12000 control process TO T T A A A A A T C T O A A T T T T A A A A A T C T O A A T	*ETAABCBAADTAAA
(2) MWXX29a (Detert aluge dearming and/own control of 2 aluer SARS-CV-2Parent*Encoded 200220 Largeter peaker T 0 T T A A & A A T C T 0 A A T L T T A T A T A T A T A T A T A T	THTAAACBAASTAAR
To MW3006 The left with marking and own internets 2 ware SAS-CoV_2harm/Pharenet162000 arease proze T 0 T T A A 4 A A T C T 0 A A T T T T T A 1 A T T T T T T T T T T	TETAAACBADITAAB
A MUSICE TELEVISION AND SUPERING UNDER AND	TETRAACQAEDTARS
Winnersch. Jesek wirk genetink Teres Process / Anter	TETAAACGAESTEAA
The UNITED TRANSPORTED BOTTOM DESIGNMENT AND	TUTBAACGAASTAAR
	TO TRANSPASSING
	TOTAL OF TARK
	TOTAGACTARE
	TOTALACTORACTORA
	BANCORSC TARSTAT
	CTARLY CARLYRANT
A MARKET I REPORT AND INCOMENTATION OF A DESCRIPTION OF A	TOTALACORACTARE
BI AMMONTH TO BE AND AND THE PROPERTY AND AND THE AMERICAN DEPARTMENT AND AND THE ADDRESS AND THE TRANSPORT	TOTRARCREACTARE
10. MORECUP (deservation morecup) and/or contracted area (all) (rol 2) areas (defended all 2000) contract process 10/17 a a b a a 1 C 10 a a 1 C 10 C 10 C 10 C 10 C	TETALACREATTARS
If montains relevant and any and the construct of a second difference and the construct of I face and for the second difference and the second diffe	TETRASCREACTARS
min environment in a serie reader magnetics and the construct a serie ball on Japane Place 1000 corpore prove TOTTALABATCTOBATTETETETETETETETETETETETETETETETETETET	TETAAACBAACTAAA
	and an and a start of the
Sint II 3 Orde Ordegen	Selected genetic code Transland

R\_E26161: 5' AAGCGCAGTAAGGATGGCTA 3' (20 nt)

in privation private tea pe		
Tell Hills Black and William What		
And second processing to down and		
		Base Child
B BERET I Deservation state of a provide the second to a Capitor fully include the second s	ALCOLOGICAL CONCLUSION	5122213213
I HEADY I HAVE AND	FRALESTOCTI ACTOCOLITA BATTEN	11010110110
N NY 2013 THE REAL PROPERTY AND A DESCRIPTION OF THE DAY OF THE REAL PROPERTY OF THE REAL PROPERTY AND A DESCRIPTION OF THE REAL PROPER	TREESTECT PACTAGECTTE DATITIT	6122014210
I WE TRANSPORT AND	ARGECKTECTERCITECEUTICS///15/	1111111111
I THERE IS NOT A THE REPAIR INCOMENTATION OF THE PARTY OF	TREEST FORTHCIP CONCEPT CRATING	102014210
A REAL PROPERTY AND A REAL	THEFE POUR DELEGENTERS INT	111111414118
NOT THE REPORT OF THE PARTY OF	THEEEATECTTACTUCACTTODATIES	0112014210
IN THE DESIGN AND ADDRESS OF A DESIGN AND ADDRESS OF A DESIGN ADDRESS OF A DESIGNA ADDRESS OF A DESIGNA ADDRESS OF A DESIGNA ADDRESS OF A DESIGNA ADDR	RESECTOCIENCIECTIC SATIST	11111111111
THE REAL THE REAL PROPERTY AND ADDRESS OF THE REAL PROPERTY AND ADDRESS OF THE PARTY ADDRESS	CHEESETECTT+CTECECTTCRATISS	102014210
When the second state and the second state and the second state and the second state at the second state a	TAREATERTERTARTARTTC VATTON	*********
h ann a fh' theorem and an anna an the sector of many the Lances Willy card in world department of Charles and ATATTOTTOTTOTTAC A d	THEFT ATTOT PAUL PROTOCOL CONTINUES.	6188814878
Renew Mithematics and any strength demonstration of a state with the second demonstration of the	FREE COTTACTORETTECONTTOT	518281417k
1 mm to the local grade and any second grade and below in Common Property in Transactions of A TOTAL TAXATTAX AND	TearserIng Language 11 04/101	0100014178
S han i Shi i Sanan ana ana any ny faritr'o ny faritr'o Sana (1997) i ny faritr'o Shi na ana ana ana ana ana an	Talles tert the fig of the dart of	0101014078
The sector of the track of the track of the sector of the	Terrestation Patricia CTI Coatton	6785874575
a series of channels and any series of prover all and blds on the series of the series of the TCS (TCS) TeSTTE (A)	PARTER COTTACTOR OFFICEATTOT	018181417k
Server Kindson and an experimental server before the server server and an experimental server of a server of the server server and the server s server server serve server serve server serv	TABLE ATTANTI ANTOGOCTI COATTOT	0741014178
A here was a supervised on the second of the second of the second s	THEFENJERTIACTICACTICALTIAT	A788814878
, ποι το πληθεί τη διακό τη ματά τη τη αγαία τη τηματική ματά τη διαλαγματική τη ματά τη ματά τη αγά τη τη τη τ	FARTERTECTTLC/GCGCTTCOATTOT	01512174278
B. BARTER A. Discontinue requires a property of a state of the Art Control Office and Children and Childre	TREESENTERT FAR TOROGOT SC 24 T181	1182214214
A DESCRIPTION OF A DESC	TARGENTERTTARTNERSTTREAST	141111194
A REAL PROPERTY AND AND A REAL PROPERTY AS A	TABEFATEETTAETROBETTO AATTAF	1141414114
I ANNO 1 Deservation reaction of a second and a second a second second back by Constant Wasservation Cold and an and a second	TARCENTECTTACTOCOCTTCOATTEI	1120174174
Constitution and reacting systems or service 2 matrix 1.87 Jay 2 man diversity of the system prove 17117761761761761761761	CENTRE TRACTERCONT DALATTERNER	11111111111
	ABLEAVESTTACTOCRUTTCAATTEN	1028761702
	RABELATECTTACEBABATTCD44484	1202014018
A REAL AND A	RABLERIELIIAEIOCOCITZ.04TTET	1122114218
I THE REAL PROPERTY AND A DESCRIPTION OF A	ARRENT ACCOUNTS OF A CONTRACTOR	11111141418
A MARCEN LINE OF A MARCEN PLANT AND A MARCEN AND A MARC	* X*2C+ALCOPACTURE FARAFFER	1111114111
Reserved and have been been been and a second of a second s	PARCENTER PARTY AND ADDRESS OF TAXABLE	********
mir II E Over Uniger	10 miles	

## Cebadores dirigidos al gen N.

#### F\_N28147: 5' TTTGGTGGACCCTCAGATTC 3' (20 nt)

Date plat Service allegement alles Separate Branks Men	
BEBBBB FL +DXDXQ++ 4 4 8 995	
Old Separate Serviced Fater Separate	
Transatilities	
The second state was a second state and second as a second state state state state state state state state state	
E. STATUTE I DEVELOPMENT AND AND ADDRESS AND ADDRESS ADDRE	COTTIGET CERCICIC EDENTIC HACTOOLAGTARCCAGA
The functions of the second submanify dividuous contracting 2 many 24/25 Contraction of the second submany provides and a 1 Contracting 2 many 24/25 Contracting	
In the second state where where we were the state and the second state of the second s	
In sector of prove and adjustic system contents and sector consistent states prove an a sector content state	
The second state and a subsecond state of the second state second states of the second states and the	LO FITUEIQUELICICHUMENTICAACJOULAGIAALCAGA
TO AND THE DESIGN AND INCOME AND INCOME AND	LOTITEPTEPELECTEMBETTEMACTOGEAGTMALCADA
To MADDER J Server and executive endower contactive 3 and SARS COVUMENT PRODUCED SOLD couples prove A A 4 7 6 C 6 C C 7 C 6 C 6 7 7 4 1	LOTITERTERALICIEMBETTERACTOGLEGTARICAG
TO MANDERE I Server acts registery endows contained a sets SARS-Crit-Sharen REsource(1)40200 corpses prove a 4 4 7 0 C 4 C C C C C 4 7 7 4 1	LOTITERTERALICIENDATTE AACTOCLAGIAAICAGA
Te MACOLOR I (Beren sole registry minters contracts 2 analy SAR-City 20-analy88 proved 50000 corplex priors A A 4 7 6 C E C E C E C A 7 7 A 1	CONTRETERIZETE ARATTE AACTOGEAGTAALCAGA
MURINGET I Denne auto registero suntone conterna 2 acate SARCOV Shuree REISORD conside pende a A A T G C E C C C C T A T T A I	COTTENETOTACCETCARATTCAACTSCLASTAALCARA
The strend state of the sector registring syndrome constants 2 as and SARS ON Shares Hittings (11/0000 complete parents in A A T G C A C C A C C A C A T A C	CO <b>TATUETEDACECTEAKATTE</b> AACTBELAGTAALCAGA
TT MICESSE (Serve vole register) within contacts 2 was SARS-CV 20-werthics and SARS credition and the serves A A A T S C A E E S C B C A T T A S	E & E & F & E & E & E & E & E & E & E &
TE MODELTE I Serves sole registery syndrome centractus 2 index SARS-CuV 26urecettilizero ettilicito complex parame. A A A 7 5 2 A 2 2 2 2 2 3 7 7 4 2	LA <b>TTTULTULATEUTEHEATTE</b> AACTGULAUTAAEC40A
The UNITED TY I (Density and a required by syndrome (Ariter La 2 as also SARS-Car) Zharasyl Million and ADDDD complete panelse. A A A T G C A C C C C C C C C A T A C	CO <b>TITUSICATICSINAATIE</b> AACTUSIAAIICAA
III. MICESTIZ I Server ande registron entre ande serve a zuele SARS-Cov Zhurev/EliteraniteScopo comple person A A A 1 0 2 A 2 2 2 2 4 7 7 A 2	LO <mark>TIISIISACCCIEASATIE</mark> AALISIIACIACIAALIA
ET MODELTE I Seven ande recordory endores randerine (2 andes SARS-CoV Starger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/EStarger/EStarger/EStarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Estarger/Esta	LATITUSTUSALLUTEABATTEAALTUULAUTABEL-DA
E2. MINESETA 1 Serves and a registery syndrome January & Addie SARS-CoV Statewy/EXtern parts S2000 complex parts = 1 G C A C C Z C C C C A T F A C C F	***************************************
EL MUCHEPA, I Severé acide inspiraleny numberes l'antire structure 2 destré SARS Call Zhumer/RESizurge/SelCCDD complete genore. A A Y E C + 1 C C 2 G C A Y A C 1	A T T D G T D M A C C C T T A G A T T D A A C T S G C A G T A A C S A G A A A
SA ERISTERE L'ÉNERALE AUTORNAUE DE LE	CA <mark>FFFEEFEEFEEEEEEEEEEEEEEE</mark> EEEEEEEEEEEEE
EL MARTINETT I General and a manufacty and two instalance 2 andre SARS CoV Disamo REVisional 400000 services A A A T Q C A C C C C C C A T T A S	E B <mark>学习学校副学校有法式区位产生法提供广大区</mark> 大法区下有信之法信户法法区区法庭法
III. Institute ( General and a maintain) and non-institute ( 2 and a SARS Cav Zinnan (RR) provide (RT) and party general ( A A A T Q Z A C C C C C C C A T T A )	EQ <mark>FITEETEEREECTEMENTIE</mark> ANETEERETRAECHE
IT CONTREPS I Severe under regeneery syndrom terreterive 2 moles SABS-Cev-2home/REference/HECED DRF (all pergeneer A 4 1 0 C 4 C C C C C C C C 4 1 1 4)	CO <mark>TITODICO+CCCIC+C+IC</mark> ++CIC+C+A+CIC+C+A+
And a state of the second	~
San II O Only Division	Selectus genetic codie Stamili

#### R\_N28742: 5' CAAAGCAAGAGCAGCATCAC 3' (20 nt)

for the part departs for the lat	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
All American Territori Acamerica	
	A REAL PROPERTY OF A REAL PROPER
A set of the set of th	TA CE VETTER TELEVISION DAVAGATI
	GALDE DATE TO THE STITUTE AGEN
	1 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
	THE PETERITY CHERTICAL TREESENT THE SHEET
The second s	atal HETHERLITELTITE FREEELFRANCLALT
Transfer and the second s	a fair feather the trace of the feather france dari
Contract ( Anno 1 and the part of a second	a tea inclusive the trace create contracted or r
The second s	ATALIALTECTLTTECTTECTELTECTTECTELLAGLTT
T Intel Mary Tilles and the stand system common 2 and a fair Cold Synam Party of Salary regions 3 3 3 3 7 3 3 1 7 3 3 1 3 3 7 3 3 1 3 1	ATHETHETHETETTHETTTE CERCERCITEACLEATT
The second	ATTATALIES TITIETTE CISCIECTION CARACI
I manufil i rener manufichen summer an anne 1 en sector signed and the second	CEGAINETRETETTRETER CTSCTSCTSCTCALAGENT
N INVESTI COMPANY AND A STATE OF A STAT	ALAATERTETETINETETEELFECTTUALAUST
	ATRATECTOCTUTTECTTCC/SCIECTICACAGATE
T and 01,4 (1996) while the state of the state of the state of the table of the state of the sta	AT OCTABLE TERTIBLE TELTEL TELTER CAUATTOAN
I servizi funda una rapporta a como regione regione de la servizión de perior na encontra en la servizión de la	CANTERFETCTTELITELITECTSLITEAC. SUPERIOR
	TOATACTECTETTTETTECTECTTCACAGATT
Minimized Television and the second second second second second second second prove the second s	STORTOFTHETETTHE TTREESEFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
Norma Struktioner solarmannen um er einer ein Zeinen Selb der Uneren Christian führte bestättigt vongen anner Alle ein Taxis "Bissen Taxis" och der	STON DETORTETTORITINE TAITBUTTORCHOATT
	drastoc artistractive stattastraxoadatt.
A MALENY There are entropy and a many second and Second American Malen and group	STOATOC TOCTOTION TITES SALES STOADAGADATT
and the Base Dataset	instal grade on the land
	Souther bridge was belown

R\_N28466: 5' GCCGTCTTTGTTAGCACCAT 3' (20 nt)



#### Anexo 7: Fotografías de la electroforesis para la validación de la SEMI-NESTED MULTIPLEX PCR con 152 muestras

Electroforesis de las muestras 1-8.



Electroforesis de las muestras 9-16.



Electroforesis de las muestras 17-24.



Electroforesis de las muestras 25-32.



Electroforesis de las muestras 33-40.



Electroforesis de las muestras 41-48.



Electroforesis de las muestras 49-56.

1	м	49	50	51	52	53	54	55	56	В	CN	CP	м
	-												
													-400pb
400pb- 300pb-													-300pt
200pb- 150pb-			1										-150pb -101pb
50pb-													-Sobp

Electroforesis de las muestras 56-63.



Electroforesis de las muestras 65-71.



Electroforesis de las muestras 72-80.



Electroforesis de las muestras 82-91.



Electroforesis de las muestras 92-100.



Electroforesis de las muestras 101-110.



Electroforesis de las muestras 115-124.



Electroforesis de las muestras 125-134.



Electroforesis de las muestras 135-144.



Electroforesis de las muestras 145-155.



# Anexo 8: Fotografías de la electroforesis para la Validación del cebador F\_E26080 con 72 muestras.

Electroforesis de las muestras 1-10.



Electroforesis de las muestras 11-20.



Electroforesis de las muestras 60-69.



Electroforesis de las muestras 36-45.



Electroforesis de las muestras 91-100.



Electroforesis de las muestras 101-110.



Electroforesis de las muestras 111-120.



Electroforesis de las muestras 148, 135, 132.



#### Anexo 9: Cálculo del tamaño de los amplicones.

Para utilizar la herramienta <u>http://insilico.ehu.es/mini tools/PCR/</u> se debe copiar la secuencia del gen de interés y la secuencia de los cebadores, posteriormente al pulsar el botón amplify se obtiene el tamaño del amplicon.

A. No in tensors 1 mellooisteas	All the second by the	1
	In silico PCR amplification	
	Seguence developments Ascharods datcastibus Saaracetos TECECORCEAN desaccosts decartedes de Ascharods datchestit conactasts tendinticit development descretedes des destruada techarcean actavement concertent, dicertecto concertedes des destruada techarceane algomentes trosperies concertes concertes des accelerat actavement algomentes trosperies concertes destructions des accelerate concerte the technologies concertes destructions des accelerates concertes transformer acceleration des accelerates acceleration destructions destructions des accelerates destructions destructions destructions destructions des accelerates destructions destructions destructions destructions des accelerations destructions de	
	Primer 1' 1- GAGCAGTIGG 10 Primer 2' 1- GOCGCIGGGG 10 C Allow one mismatch	
	Maximum lenght of bands           3000         nuclestuiles           "A T.O.C and N assuloved: A+T+O+C must be ID represent"           "One maniful or alloved in any position of primeric	
	i Angen   Roset	
	Semon codi	

Anexo 10: Panel fotográfico.



Fotografía 1. Preparación del master



Fotografía 3. Programa de la 1<sup>ra</sup> PCR



**Fotografía 5.** Preparación de muestras de PCR para electroforesis



Fotografía 2. Programa de la retrotranscripción



Fotografía 4. Programa de la 2da PCR



Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%

MgL JORGE ACURIO SAAVEDRA PRIMER REPLICANTE

Mgt. YOLANDA CALLO CHOQUEVILCA SEGUNDO REPLICANTE

BIga. OLGA LIBIA CJUNO HUANCA PRIMER DICTAMINATE

Mgt, EMMA JESUS URRUNAGA DE ROZAS SEGUNDO DICTAMIRANTE