



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

**Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Virología**

**Título: Diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en
el enfrentamiento a la pandemia en Villa Clara
Marzo 2020–mayo 2023**

**Tesis presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Médicas**

Autora: Dra. María de Lourdes Sánchez Álvarez, M.Sc.

La Habana, 2025



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

**Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Virología**

**Título: Diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en
el enfrentamiento a la pandemia en Villa Clara
Marzo 2020–mayo 2023**

**Tesis: Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Médicas**

Autora: Dra. María de Lourdes Sánchez Alvarez, M.Sc.

**Tutoras: Prof. Sonia Resik Aguirre, Dr.C.s.
Prof. Clara Savón Valdés, Dr.C.**

Cotutor: Prof. José Ramón Ruiz Hernández, Dr.C.

La Habana, 2025

“En el silencio del laboratorio, la batalla contra los invisibles
se libra con valentía y precisión”

Erica Ollmann Saphire

Dedicatoria

*A la memoria de mi padre,
por su esfuerzo y sacrificio. Desde donde está sigue guiando mis pasos.*

*A mi madre
con su persistente fe en la educación. Me enseñó que el conocimiento es un faro que
ilumina el camino de la vida.*

*A mi esposo, Carlos Miguel,
por su amor sin límites.*

*A mi hija, María de Lourdes,
lo mejor de mi vida, mi inspiración constante.*

Agradecimientos

Mi agradecimiento a todos los que me han ofrecido su apoyo, tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por la generosidad y amabilidad que ha dejado huellas en mi corazón.

A mis tutoras Dr.C.s. Sonia Resik Aguirre y Dr.C. Clara Savón Valdés y al cotutor Dr.C. José Ramón Ruiz Hernández por sus sugerencias constructivas, su disposición para compartir conocimientos y experiencias.

A las Dr.C.s. Guadalupe Guzmán Tirado y Vivian Kouri Cardellá, al Minsap y MediCuba-Europa por su apoyo para la creación del Laboratorio de Biología Molecular de Villa Clara, sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

A las Dr.C. Lisette Pérez Santos y Dr.C. Rosario Gravier Hernández por su colaboración al proporcionarnos las secuencias para acceder a los datos genómicos del SARS-CoV-2.

A las Dr.C. Marta Castro Peraza y Lic. Maribel Chao Sautié del departamento docente del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri por siempre estar dispuestas a ofrecer sus enseñanzas y ayuda a lo largo de este proceso.

Al claustro de profesores del programa doctoral de infectología y medicina tropical del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri donde transcurrió una parte significativa de mi formación profesional.

Al CPHEM, mi centro de trabajo, y a todos mis colegas por proporcionarme un entorno enriquecedor y colaborativo fundamental para mi desarrollo profesional.

A Dr. Neil Reyes Miranda, director del CPHEM y al Dr. Juan José Pulido López, director general de salud en Villa Clara, por su liderazgo y por creer en mi capacidad para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Noira Durán Morera por su experiencia en el manejo de datos, el análisis estadístico, la rigurosidad y el pensamiento crítico en la investigación científica.

A la M.Sc. Hilda Roque de Escobar Martín, profesional excepcional por su compromiso, responsabilidad y compartir conocimientos, a su esposo M.Sc. Hugo Colado González mis agradecimientos. A los dos por su apoyo incondicional,

dedicación en la revisión detallada de la tesis, sus sabios consejos, la amistad y aportes valiosos para asegurar la calidad de este trabajo.

A Dr. Rafael Abreu Duarte excelente profesional y ser humano. Gracias por compartir su tiempo y conocimientos.

A mis compañeros del servicio de Microbiología, a los colegas del departamento de Biología Molecular Dr. Edenis García Álvarez, Dr. Adrián Fernández García, Dr. Ermis González Martínez, Dra. Norlenys Morales Cueto y los Licenciados Norma Delgado Cura, Danay Quintana More y Melardo Figueroa Muñoz. A todos por su disposición de escucharme en los momentos de incertidumbre, por hacerme reír, por sus palabras de aliento, han mostrado ser muy importantes para superar los desafíos de esta etapa.

A la Ing. Nilda Rosa Martínez Flores por su contribución y dedicación cada vez que necesité su ayuda.

A las Licenciadas Mildrey Báez Garcés, Teresita Martínez Ramos, Tania Morales Fernández y Yurima Hernández de la Rosa, del Centro de Información de Ciencias Médicas por su participación en la revisión bibliográfica.

Al Lic. Ricardo Rodolfo González y Elvis Toledo León por su generosidad y profesionalismo de siempre.

A la Lic. Katuska Arbona Pérez, del departamento de estadística por su colaboración al proporcionarme los datos necesarios.

A mi familia, una gran parte vinculada a la profesión de la salud, a la Dra. Yusimi González Alvarez, a mis hermanos, Lic. Alberto Sánchez Álvarez e Ing. Caridad Sánchez Alvarez por el apoyo incondicional, pilares imprescindibles a lo largo de este camino académico.

A mi hija, María de Lourdes, fuente inagotable de amor y energía. Gracias por recordarme siempre la importancia de luchar por mis sueños.

A mi esposo, Carlos Miguel, por el apoyo incondicional y creer en mí, incluso en los momentos más difíciles, su paciencia y comprensión fueron primordiales para lograr esta meta.

A todos, mi más profundo agradecimiento.

Gracias.

Abreviaturas

2019-nCoV: Nuevo coronavirus de 2019.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CDC: Siglas del inglés, Center for Disease Control and Prevention

COVID-19: Siglas del inglés, Coronavirus Disease 2019

CPHEM: Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología

CPN: cociente de probabilidades negativo

CPP: cociente de probabilidades positivo

CRS: Siglas del inglés, Cytokine Release Syndrome

Ct: Siglas del inglés, Cycle threshold

E: especificidad

E: proteína de envoltura

ECA2: Enzima Convertidora de Angiotensina 2

FDA: Siglas del inglés, Food and Drugs Agency

FP: Péptido de fusión

FRET: Siglas del inglés, Förster Resonance Energy Transfer

GISAID: Siglas del inglés, Global Initiative on Sharing All Influenza Data

HE: hemaglutinina esterasa

HR1: Siglas del inglés, Heptad Repeat 1

HR2: Siglas del inglés, Heptad Repeat 2

IFN: Interferón

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

LBM: Laboratorio de Biología Molecular

LNR-IVR-IPK: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

M: proteína de membrana

MCP1: Siglas del inglés, Monocyte Chemoattractant Protein -1

MERS-CoV: Siglas del inglés, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

Minsap: Ministerio de Salud Pública de Cuba

N: proteína nucleocápside

NGS: Siglas del inglés, Next Generation Sequencing

NRP1: Siglas del inglés, Neuropilin- 1

NSB3: Nivel de Bioseguridad 3

Nsp: Siglas del inglés, Non-structural protein

OMS: Organización Mundial de Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud
ORF: Siglas del inglés, Open Reading Frame
PCR: Siglas del inglés, Polymerase Chain Reaction
PLpro: Siglas del inglés, Papain – Like Protease
pp1a: poliproteína 1a
pp1ab: poliproteína1ab
RBD: Siglas del inglés, Receptor Bindin Domain
RdRp: Siglas del inglés RNA-dependent RNA polymerase
RNAsa: Siglas del inglés, P Ribonuclease P
RT-PCR: Siglas del inglés, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S: proteína de la espícula, del inglés spike
S: sensibilidad
SARS: Siglas del inglés, Severe Acute Respiratory Coronavirus
SARS-CoV-2: Siglas del inglés, Severe Acute Respiratory Coronavirus type 2
SD1: Siglas del inglés, Subdomain 1
SD2: Siglas del inglés, Subdomain 2
TM: Proteína de transmembrana
TMPRSS2: Sigla del inglés, Transmebrane Protease, Serine 2
VUM: Siglas del inglésVariantes Under Monitoring
VOC: Siglas del inglésVariant of Concern
VHC: Siglas del inglésVariant of High Consequence
VOI: Siglas del inglés Variant of Interest
VPN: valores predictivos negativo
VPP: valores predictivos positivo

Síntesis

La implementación de la RT-PCR para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 se centró en dos principios fundamentales, la adaptabilidad y la escalabilidad. Se realizó una Investigación en Sistemas y Servicios de Salud en el Laboratorio de Biología Molecular del CPHEM de Villa Clara en conjunto con el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" entre marzo de 2020 y mayo de 2023, para evaluar la implementación y el impacto del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en el enfrentamiento a la pandemia de COVID-19 en la provincia Villa Clara. El ensayo de RT-PCR mostró una sensibilidad y especificidad de 98,09% y 98,77%, respectivamente. El índice de Kappa de Cohen fue de 0,9414, lo que evidenció excelente concordancia interlaboratorio. Se confirmaron 60 141 casos, a partir de los que se realizó la vigilancia prospectiva que permitió identificar conglomerados activos emergentes y optimizar recursos sanitarios. La vigilancia genómica identificó la circulación de las variantes genéticas D614G, Beta, Delta y Ómicron en la provincia. Los valores más bajos de ciclo umbral se obtuvieron con la variante Delta ($p=0,006$) en pacientes graves y críticos ($p=0,014$). El diagnóstico molecular mediante RT-PCR con un enfoque multidimensional demostró ser un método válido y robusto para el enfrentamiento a la pandemia.

ÍNDICE

I. Introducción	1
I.1. Problema científico	4
I.2. Hipótesis	5
I.3. Objetivos	5
I.4. Novedad científica.....	5
I.5. Valor teórico y práctico.....	6
I.6. Valor social.....	6
II. Marco Teórico	7
II.1. Aspectos virológicos, epidemiológicos y clínicos de la COVID-19	7
II.1.1. Bases moleculares y genéticas del SARS-CoV-2.....	7
II.1.2. Ciclo replicativo y mecanismos de patogénesis de SARS-CoV-2	9
II.1.3. Dinámica de la respuesta inmune	10
II.1.4. Procesos fisiopatológicos, clínicos e historia natural de la enfermedad	11
II.1.5. Epidemiología de la COVID-19.....	12
II.2. Diagnóstico molecular del SARS-CoV-2	13
II.2.1. Recolección, transporte y conservación de las muestras clínicas	13
II.2.2. Extracción de Ácidos Nucleicos	15
II.2.3. Técnica RT-PCR en tiempo real	15
II.2.3.1. Umbral de ciclo (Ct).....	18
II.2.4. Protocolos empleados en el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2	19
II.3. Desempeño del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2	22
II.3.1. Validez de las pruebas diagnósticas	22
II.3.2. Fiabilidad de las pruebas diagnósticas.....	23
II.4. Papel del laboratorio en la vigilancia epidemiológica.....	23
II.5. Secuenciación de ácidos nucleicos	24
II.5.1. Vigilancia genómica del SARS-CoV-2	24
II.5.2. Evolución de variantes y mutaciones con efectos biológicos potenciales ..	25
II.5.2.1. Variantes de preocupación	25
II.5.2.2. Variantes de interés	28

III. Materiales y Métodos	30
III.1. Diseño general del estudio	30
III.2. Población y muestra	30
III.3. Contexto de la investigación	31
III.4. Técnicas y procedimientos para recolección de la información	31
III.4.1. Procedimientos de la detección del SARS-CoV-2 en LBM de Villa Clara	31
III.4.1.1. Recepción de muestras	31
III.4.1.2. Extracción de ácidos nucleicos	32
III.4.1.3. Preparación de la Master Mix de RT-PCR SARS-CoV-2	33
III.4.1.4. Amplificación y detección	34
III.4.1.5. Lectura de resultados de RT-PCR	34
III.4.1.6. Informe de resultados	34
III.4.2. Evaluación de la validez y fiabilidad de la RT-PCR de SARS-CoV-2	35
III.4.3. Contribución de la RT-PCR de SARS-CoV-2 a la vigilancia epidemiológica	35
III.4.3.1. Vigilancia espacial prospectiva	35
III.4.4. Vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en la provincia de Villa Clara	36
III.4.5. Análisis filogenético para la identificación de variantes de SARS-CoV-2	36
III.5. Operacionalización de las variables	37
III.6. Procesamiento y análisis de los datos	40
III.7. Consideraciones éticas	44
IV. Resultados	45
V. Discusión	70
VI. Conclusiones	93
VII. Recomendaciones	100
VIII. Bibliografía	101
IX. Anexos	101

INTRODUCCIÓN

I.Introducción

A finales de diciembre de 2019 aparece un nuevo coronavirus nombrado Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), causante de la enfermedad por coronavirus (COVID-19) ⁽¹⁻³⁾.

La propagación rápida y progresiva de la enfermedad en China, en países de Asia, Oriente Medio, América, Oceanía y África, hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), la declarara como una emergencia de salud pública internacional y el 11 de marzo de 2020, como una pandemia ^(1,2,4,5).

Esta enfermedad no es la primera causada por un coronavirus, pero, sin dudas, es la más grave ⁽⁶⁾. Esto reafirma el hecho de que las enfermedades virales continúan surgiendo y son de manera constante una amenaza para la salud pública ⁽⁷⁾. La OMS advirtió en 2018, con la recurrencia de epidemias provocadas por zoonosis, la probabilidad de una nueva ola de infecciones y postuló la posible aparición de una enfermedad X que en este caso resultó ser la COVID-19 ⁽⁷⁻⁹⁾.

Su agente causal se identificó en China el 8 de enero de 2020, perteneciente al orden Nidovirales, a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, género Betacoronavirus (linaje B). Tiene forma esférica, con una envoltura lipídica doble y proteínas espiculares ⁽³⁾; su genoma de Ácido Ribonucleico (ARN) codifica para proteínas estructurales y no estructurales que son utilizadas como dianas en ensayos moleculares ⁽¹⁰⁾.

El SARS-CoV-2 se considera un recombinante entre el coronavirus del murciélago y un coronavirus de génesis desconocida, quizás del pangolín. A pesar de su origen zoonótico, logró una transmisión eficiente y sostenida en el hombre, que se convirtió en el reservorio principal y en la fuente de infección ⁽¹¹⁾.

A partir del reporte de los primeros casos en China, en apenas diez días se obtuvo la primera secuencia completa del genoma del virus que se publicó en la base de datos GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data Platform), lo que aportó información para el diseño de métodos diagnósticos, de fármacos y de vacunas ⁽¹²⁾.

Este virus evolucionó a diferentes variantes genéticas que circularon por todo el mundo. El genoma de SARS-CoV-2, acumula una tasa de mutaciones estimada entre 10^{-6} - 10^{-4} por ciclo replicativo. Las mutaciones que afectan el gen que codifica

el antígeno espicular, seleccionan variantes con alteraciones en su capacidad infectiva, potencial patogénico y resistencia a los anticuerpos neutralizantes ⁽¹³⁾.

El virus original de Wuhan-Hu-1, fue sustituido por la variante D614G, que predominó a nivel global durante el 2020. Los estudios de caracterización molecular reportaron la emergencia, de manera progresiva, de otras variantes, algunas de ellas con mayor potencial pandémico debido a su alta transmisibilidad, el incremento de la severidad o la reducción en la respuesta inmune frente a la infección natural o a las vacunas ^(12,14,15). Esto condujo a que las variantes de SARS-CoV-2 se clasificaran en cuatro tipos: variantes de gran consecuencia (VOHC), variantes de preocupación (VOC), variantes de interés (VOI) y variantes bajo monitoreo (VBM) ^(16,17).

Hasta agosto de 2023, se registraron aproximadamente 769 millones de casos, con siete millones de muertes en el mundo según datos de la OMS, de las cuales 5 272 ocurrieron en China ⁽¹⁸⁾. En la región de las Américas se acumularon de 193 millones de casos y aproximadamente tres millones de fallecidos ⁽¹⁹⁾. Estados Unidos encabeza el listado de países con más número de muertes (1,2 millones), seguido de Brasil (704 795) ⁽¹⁸⁾.

A nivel subregional los casos de COVID-19 se incrementaron en el Caribe e Islas del Océano Atlántico en 2023 ⁽¹⁹⁾. Cuba al cierre de diciembre de 2023, procesó 14 396 562 de muestras, de ellas 1 115 183 positivas con 8530 fallecidos, según reporte del Ministerio de Salud Pública (Minsap) ⁽²⁰⁾.

Desde que se pronosticó la llegada del nuevo coronavirus al continente americano, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) definió los lineamientos para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Reverso Transcripción (RT-PCR) en tiempo real y recomendó, a sus estados miembros, garantizar su identificación oportuna, enviar las muestras a los laboratorios nacionales o de referencia, así como implementar protocolos y ensayos para la detección molecular del SARS-CoV-2 ⁽²¹⁾. Las herramientas moleculares para el diagnóstico y monitoreo de las infecciones virales alcanzaron un desarrollo vertiginoso en las últimas décadas, en particular, el diseño y perfeccionamiento de técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real ⁽²²⁾.

La OMS desarrolló protocolos sensibles y específicos para la detección del SARS-CoV-2. Los mismos incluyen la recolección de muestras, la extracción del material genético y la amplificación mediante la RT-PCR en tiempo real, asegurando resultados confiables y rápidos. También proporcionó directrices sobre la implementación de medidas de control de calidad para garantizar la consistencia y exactitud de los resultados ⁽²³⁾.

La RT-PCR puede detectar cantidades ínfimas del patógeno, bastando de cinco a diez copias de ARN para que sea positiva. Su rapidez la hace más eficiente, aumentando la capacidad diagnóstica de los laboratorios ^(24,25). Además, proporciona un valor denominado ciclo umbral (Ct); que posibilita evaluaciones semicuantitativas de las concentraciones de ácidos nucleicos en la muestra ⁽²⁶⁻²⁸⁾.

La evaluación de la RT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2, debe realizarse antes y después de su aplicación pues la precisión diagnóstica de una prueba no es una propiedad invariable ⁽²⁹⁾.

El manejo de la pandemia implicó un enorme esfuerzo de los equipos de salud en todo el mundo, que vieron sobrepasadas sus capacidades ⁽³⁰⁾. Esta situación afectó el quehacer de los laboratorios de microbiología, en general, y más aún, de los laboratorios de biología molecular, a partir de un incremento sin precedentes en la historia de los exámenes de diagnóstico etiológico.

Debido a esto, cientos de técnicas moleculares para SARS-CoV-2 obtuvieron la autorización de uso de emergencia de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), sin que se sometieran a la evaluación rigurosa que el proceso de aprobación requiere ⁽³¹⁾.

En Cuba, desde que se conoció la situación que se produjo en China, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Minsap, alertó sobre las consecuencias y elaboró un Plan de Acción Nacional para el enfrentamiento a la pandemia, aprobado por el gobierno, el 30 de enero 2020. Posteriormente se creó un grupo temporal de trabajo, encabezado por el presidente de la república y el primer ministro, para darle seguimiento y control a la ejecución de las acciones y medidas aprobadas ⁽³²⁾. Este grupo realizó adecuaciones al plan en dependencia de cada situación que apareció.

El diagnóstico molecular de SARS-CoV-2, en Cuba fue centrado por el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), institución líder en el manejo y capacitación de las enfermedades infecciosas y tropicales, y en la capacitación de los especialistas para su diagnóstico y enfrentamiento.

A partir de este momento el Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios del departamento de Virología del IPK (LNR-IVR-IPK) comienza la fase preparatoria y capacita a los profesionales de tres Laboratorios de Biología Molecular (LBM) del país: La Habana, Villa Clara y Santiago de Cuba, que contaban con las capacidades diagnósticas para la implementación y detección de este agente infeccioso a través de la RT-PCR en tiempo real.

El 11 de marzo de 2020, coincidiendo con la declaración de pandemia por la OMS, se reportaron los primeros casos confirmados en Cuba en tres turistas italianos. El diagnóstico etiológico se realizó en el IPK ⁽³³⁾.

En el año 2020 la provincia de Villa Clara contaba con un LBM en el Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología (CPHEM), fundado en 2018, como parte del proyecto sectorial de Fortalecimiento y Desarrollo de la Microbiología Molecular en Cuba, lo que convirtió a la institución en un centro con tecnología de avanzada en la región central del país. Esto posibilitó una mejor vigilancia microbiológica y epidemiológica con respuesta oportuna a brotes, epidemias y pandemias.

A pesar de contar con plataformas de diagnóstico molecular, la transformación del laboratorio se convirtió en una prioridad urgente en función de desarrollar y optimizar las técnicas diagnósticas adecuadas para asegurar la cantidad, calidad y la detección rápida y precisa del virus en la provincia, lo cual permitiera el enfrentamiento a la pandemia de manera eficaz.

En este contexto pandémico surge el siguiente problema científico:

I.1.Problema científico:

El diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 no estaba implementado para enfrentar la emergencia sanitaria que representó la pandemia de COVID-19 en la provincia de Villa Clara.

I.2.Hipótesis:

Si se implementa el diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en el Laboratorio de Biología Molecular del CPHEM de Villa Clara, entonces se mejorará la confirmación etiológica de casos, contribuyendo a una adecuada vigilancia clínica, virológica y epidemiológica.

I.3. Objetivos:

General:

Evaluar la implementación y el impacto del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) del CPHEM de Villa Clara durante el enfrentamiento a la pandemia de COVID-19 entre marzo de 2020 y mayo de 2023.

Específicos:

1. Determinar los indicadores de desempeño diagnóstico de la RT-PCR en muestras procesadas por el LBM de Villa Clara, marzo de 2020 y mayo de 2023.
2. Establecer la relación entre los resultados del diagnóstico molecular y las variables clínico- epidemiológica para definir patrones en la vigilancia integrada frente a la pandemia de COVID-19 en Villa Clara.
3. Identificar la frecuencia y distribución temporal de variantes genómicas, linajes y mutaciones clave en la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 para casos confirmados en el LBM de Villa Clara.

I.4. Novedad científica:

- La introducción por primera vez en la provincia Villa Clara del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en respuesta a la emergencia sanitaria nacional e internacional.
- Se evalúan los indicadores de desempeño de la RT-PCR en el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2. en la provincia Villa Clara.
- Se implementa por primera vez en Cuba la vigilancia prospectiva, a partir de los casos confirmados por RT-PCR de SARS-CoV-2, para la estratificación de riesgo y la toma de decisiones microbiológicas de forma proactiva.
- Se muestran los resultados de la vigilancia genómica al identificar las variantes circulantes y las mutaciones con efectos biológicos potenciales en Villa Clara.

- Se realizó por primera vez en la provincia Villa Clara el estudio filogenético a partir de muestras secuenciadas, para mejorar la comprensión de la dinámica del virus y optimizar las estrategias de control.

I.5.Valor teórico y práctico:

- Se analiza de forma integral el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 con un enfoque multidimensional en la provincia Villa Clara.
- Se confeccionan y actualizan los manuales de procedimientos normativos de operaciones, de forma que sirvan como modelo para utilizar en la red de laboratorios de biología molecular en el país, ante otras situaciones emergentes.
- Se obtienen los conocimientos necesarios sobre el diagnóstico molecular y su valor científico, comprobado en la práctica, ante un evento de magnitud pandémica.
- Contribuye al desarrollo de la vigilancia genómica mediante la identificación de subgrupos de mutaciones con efectos biológicos potenciales, según las variantes circulantes en la provincia Villa Clara durante la pandemia.
- Fortalecimiento de las capacidades diagnósticas y el perfeccionamiento del diagnóstico molecular, estableciendo fundamentos sólidos que impulsan el desarrollo de futuras líneas de investigación en este ámbito.
- Los resultados mostrados en esta investigación forman parte de siete publicaciones, 10 presentaciones en seis eventos científicos y están incorporados en dos Tesis de Terminación de la Especialidad de Microbiología. Además, posee reconocimientos entre los que se destacan Premio CITMA 2022 a la innovación tecnológica a nivel provincial, Premio a la Excelencia en investigación Científica Dr. Oscar Cañizares Luna In Memoriam 2023 y Premios Fórum Provincial de Ciencia y Técnica 2022 -2023 Anexo 1.

I.6.Valor social:

La detección rápida y precisa del SARS-CoV-2 y su integración a la vigilancia clínica-epidemiológica en la Provincia Villa Clara, contribuyó de manera significativa a la mitigación del impacto sanitario y social de la pandemia.

MARCO TEÓRICO

II. Marco Teórico

II.1. Aspectos virológicos, epidemiológicos y clínicos de la COVID-19

Los coronavirus son un grupo de virus de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple, en sentido positivo con una envoltura de lípidos que tiene proyecciones denominadas glicoproteínas. Entre los virus de ARN, contiene el genoma más grande, de 26 a 32 kilobase (Kb). Pertenecen taxonómicamente al reino de los Riboviria orden Nidovirales familia *Coronaviridae* ⁽³⁴⁻³⁶⁾ que comprende dos subfamilias: la *Letovirinae* y la *Orthocoronavirinae* ^(34,37).

En base a sus estructuras genéticas y relaciones filogenéticas, la subfamilia *Orthocoronavirinae* se clasifica en cuatro géneros: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus y Gammacoronavirus, en 23 subgéneros y 37 especies, que se caracterizan por su extraordinaria plasticidad genómica, debido a las mutaciones puntuales que presentan ^(36,37,38). Se identifican siete tipos de coronavirus que infectan a los humanos, siendo el SARS-CoV-2 el séptimo tipo identificado ^(3, 39).

El género Betacoronavirus contiene la mayoría de los coronavirus y se subdivide en cuatro linajes: (A, B, C y D) ⁽³⁶⁾. El SARS-CoV-2 pertenece al linaje B, subgénero Sarbecovirus, y especie Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave ^(1, 39).

II.1.1. Bases moleculares y genéticas del SARS-CoV-2

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la partícula vírica del SARS-CoV-2 muestran una apariencia de una corona solar, de ahí el nombre de coronavirus. Presenta una morfología esférica con un diámetro que varía desde 60 hasta 140 nm, contiene espículas de 8 a 12 nm de longitud, aproximadamente. La estructura del virión contiene un genoma (ARN) incluido en la nucleocápside y una envoltura externa. El genoma viral está asociado con la proteína de la nucleocápside (N), la cual, se halla fosforilada e insertada dentro de la bicapa de fosfolípidos de la envoltura externa, donde se proyectan las proteínas estructurales principales, denominadas espícula (S), proteínas de membrana (M) y proteínas de envoltura (E), además de la hemaglutinina esterasa (HE) ^(37, 40, 41).

La glicoproteína S es la encargada de actuar como ligando para la adsorción del virus al epitelio respiratorio de la célula hospedera ⁽³⁾, la proteína M es una glicoproteína transmembrana que ayuda a mantener la curvatura de la membrana y permite la unión con la nucleocápside. La proteína E hace posible el ensamblaje y la liberación del virus. La proteína N forma parte de la nucleocápside y se une al material genético viral ^(37,42). La proteína HE se halla solo en algunos Betacoronavirus y su actividad esterasa facilita la entrada del virus en la célula hospedera, además de ayudar en su propagación (Figura.1) ^(3,43).

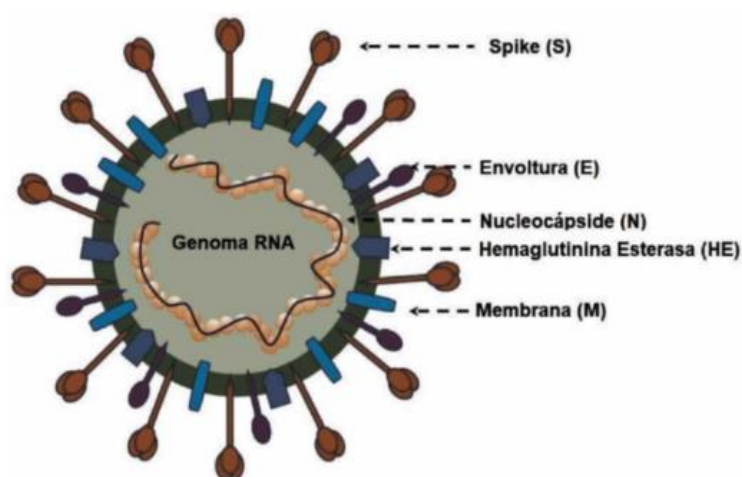


Figura 1. Forma y estructura del virión de SARS-CoV-2. Partícula vírica de SARS-CoV-2 que posee una nucleocápside compuesta por RNA genómico asociado a la proteína (N), cubierto por una envoltura externa de proteínas estructurales principales (S), (M) y (E) y proteínas accesorias como (HE) ^(3,43).

El genoma del SARS-CoV-2 tiene aproximadamente 30 kb, y es una hebra no segmentada de ARN monocatenaria de polaridad positiva ⁽³⁾. Incluye 15 marcos de lectura abierta (ORF) entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación, que codifican 29 proteínas estructurales, no estructurales y accesorias ^(44,45).

En los dos tercios próximos al extremo 5' terminal de su genoma, se encuentran los ORF1a y ORF1b, que codifican las poliproteínas 1a (pp1a) y 1ab (pp1ab), respectivamente. El genoma del virus codifica además dos cisteínas proteasas, una proteasa similar a la papaína (PLpro), o proteína no estructural 3 (nsp3) y una proteasa similar a 3C (3CLpro), o nsp5. Estas proteasas escinden pp1a y pp1ab para

generar 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) que conforman el complejo viral replicasa-transcriptasa.

En el tercio próximo al extremo 3', se encuentran los ORFs que codifican a las proteínas estructurales y los ORFs 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b y 10 que codifican a las proteínas accesorias ⁽⁴⁶⁾.

La nsp12 es una proteína no estructural RdRp, componente clave de la replicación-transcripción del SARS-CoV-2. Cabe destacar que el RdRp es uno de los blancos empleados en el diagnóstico confirmatorio molecular ⁽⁴⁵⁾.

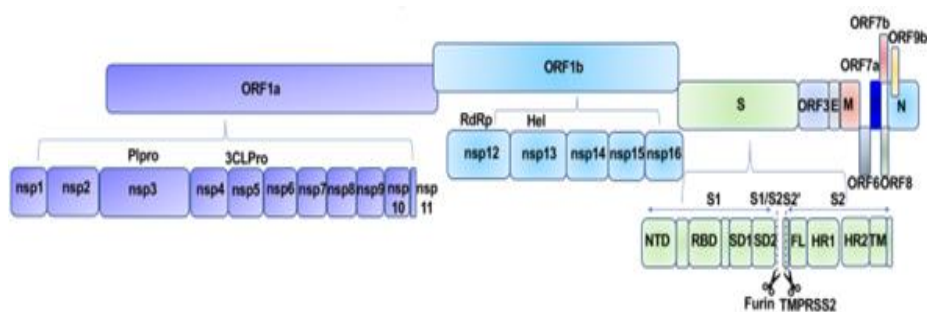


Figura 2. Diagrama esquemático del genoma del SARS-CoV-2. Adaptado de Zhang et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy ^(45, 47).

La proteína S está formada por dos subunidades: S1 que presenta el péptido de señal, dominio de unión al receptor (RBD), subdominio 1 (SD1) y subdominio 2 (SD2). En la subunidad S2 de fusión de la membrana se encuentran el péptido de fusión (FP), repetición de heptada 1 (HR1), repetición de heptada 2 (HR2) y la proteína de transmembrana (TM) ⁽⁴⁶⁾.

II.1.2. Ciclo replicativo y mecanismos de patogénesis de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se une a la ECA2, receptor celular específico para la glicoproteína espícula (S) del virus ^(48,49). La entrada del virus al citoplasma se realiza por endocitosis ⁽⁵⁰⁾, uniéndose a vesículas ácidas que permiten la liberación de la nucleocápside ⁽⁴⁹⁾. Posteriormente, el ARN genómico viral liberado en el citoplasma inicia su proceso de replicación, actuando como un ARNm. Las proteínas estructurales se sintetizan asociadas al retículo endoplasmático ⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾. La maduración ocurre en el complejo de Golgi, de allí viajan hasta la membrana citoplasmática por

donde son secretadas por exocitosis y se libera la partícula de SARS-CoV-2 madura (52,53).

La hipótesis propuesta sobre la patogénesis de la infección por SARS-CoV-2 en humanos, postula que el virus podría pasar a través de una membrana mucosa, particularmente de la laringe y la mucosa nasal, e ingresar a los pulmones a través del tracto respiratorio. El virus puede ingresar al torrente sanguíneo desde los pulmones y luego causar viremia. Después de eso, el virus atacaría los órganos diana, por ejemplo, corazón, pulmón, riñón y tracto gastrointestinal (3,54).

Las células caliciformes formadoras de moco y el epitelio ciliado de la nariz contienen la proteína ECA2, por lo que parece muy razonable, que la infección primaria y la replicación del virus ocurra en la nariz (55).

La ECA2 es una proteína transmembrana responsable de la conversión de angiotensina I en angiotensina II, que tiene un papel importante en la homeostasis y en la respuesta proinflamatoria (34).

Sin embargo, es cierto que la unión de la proteína S al receptor ECA2 no es suficiente para la infección, se requieren de otras proteínas celulares (55), como la proteasa transmembrana de subtipo de serina 2 (TMPRSS2), la proteasa celular furina, la neuropilina-1 (NRP1) (55,56) y otros receptores propuestos como posibles vías alternativas de entrada o factores auxiliares, como el GRP78 (BiP) a nivel pulmonar, o el CD147 en el tejido nervioso (47).

La expresión y distribución de los receptores ECA2 regulan el tropismo del virus a los distintos tejidos, como también su patogenia (57). Estos receptores abundan en el tejido pulmonar y en las células epiteliales alveolares tipo 2, también en monocitos, macrófagos, células endoteliales, enterocitos del intestino delgado y neuronas, lo que ayuda a comprender mejor las rutas de infección y manifestaciones clínicas de la enfermedad (49,57).

II.1.3. Dinámica de la respuesta inmune

Existen diversos factores que intervienen en la cinética de la respuesta inmune: la activación del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos tisulares y células dendríticas residentes en la mucosa nasofaríngea), la activación del complemento por la vía de las lectinas. Este representa un sistema explosivo, letal e inmediato

para la defensa frente a SARS-CoV-2, produciendo grandes cantidades de C3a y C5a que inflamarán los pulmones y reclutarán más células, monocitos y neutrófilos al tejido pulmonar. Otro factor que interviene es la activación de linfocitos T helper (Th) CD4+/ CD8+ aberrantes, así como niveles elevados de Interleuquina-6 y otras citoquinas proinflamatorias ⁽⁵⁸⁻⁶²⁾.

Los linfocitos T CD4+ contribuyen a la respuesta adaptativa general estimulando los linfocitos T CD8+, mediando, tanto las respuestas inmunitarias celulares y por anticuerpos duraderas, como el desarrollo de poblaciones de células de memoria. Las células T CD4+ se activan rápidamente en células Th secretoras de factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Th1), que activan los monocitos CD14+ CD16+ con alta expresión de IL- 6 para acelerar la inflamación. Las células Th 17 producen Interleuquina-17 para reclutar aún más monocitos, macrófagos y neutrófilos, y estimular la liberación de citoquinas, conocido como síndrome de liberación de citoquinas (CRS) ⁽⁶²⁾.

Las principales citoquinas implicadas en la patogénesis del CRS incluyen la IL-6, la IL-10, el interferón, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 y otras citoquinas como el factor de necrosis tumoral y las Interleuquinas 1-8 ^(58,59).

II.1.4. Procesos fisiopatológicos, clínicos e historia natural de la enfermedad

La COVID-19 es el resultado de dos procesos fisiopatológicos interrelacionados:

- a) Efecto citopático directo resultante de la infección viral, que predomina en las primeras etapas de la enfermedad ⁽⁶³⁾.
- b) Respuesta inflamatoria no regulada del hospedero, que predomina en las últimas etapas de la enfermedad ⁽⁶³⁾.

La superposición de estos dos procesos fisiopatológicos se traduce fenotípicamente en una evolución en tres etapas de la enfermedad:

- a) Estadio I (fase temprana): es el resultado de la replicación viral que condiciona el efecto citopático directo y la activación de la respuesta inmune innata, y se caracteriza por la estabilidad clínica con síntomas leves (tos, fiebre, astenia, dolor de cabeza, mialgia) asociados con linfopenia y elevación de d-dímeros y lactato deshidrogenasa ⁽⁶³⁾.

b) Estadio II (fase pulmonar): resulta de la activación de la respuesta inmune adaptativa que conlleva a una reducción de la viremia, pero inicia una cascada inflamatoria capaz de causar daño tisular, y se caracteriza por un empeoramiento de la afección respiratoria (con disnea) que puede condicionar la insuficiencia respiratoria aguda, asociada con empeoramiento, linfopenia y elevación moderada de la proteína C reactiva y transaminasas ^(63,64).

c) Estadio III (fase hiperinflamatoria), caracterizado por insuficiencia multiorgánica fulminante, con empeoramiento del compromiso pulmonar, resultado de una respuesta inmune no regulada, que condiciona un síndrome de tormenta de citoquinas ^(63,64).

La severidad clínica de la COVID-19 se divide en cinco grupos, cada uno con sus características clínicas particulares ⁽⁶⁴⁾:

1. Asintomática: sin clínica aparente ni cambios imagenológicos pulmonares, pero con RT-PCR positivo.
2. Leve: síntomas confinados al tracto respiratorio superior, en los que se incluye: fiebre, malestar general y tos. Sin cambios imagenológicos y RT-PCR positivo.
3. Moderada: pacientes con signos de neumonía, cambios imagenológicos y RT-PCR positivo.
4. Severa: en reposo se contacta disnea y frecuencia respiratoria ≥ 30 respiraciones/min, saturación de oxígeno $\leq 93\%$ o Índice PaFi ≤ 300 mmHg. Las lesiones imagenológicas progresan $> 50\%$ en un lapso de 24 – 48 horas y RT-PCR positivo.
5. Crítica: progresión rápida de la enfermedad, acompañada de fallo respiratorio, necesidad de ventilación mecánica, choque o fallo multi-orgánico y RT-PCR positivo.

II.1.5. Epidemiología de la COVID-19

El SARS-CoV-2 se transmite fácilmente de persona a persona, mediante las gotas que se esparcen cuando un portador tose, estornuda, o a través de las exhalaciones normales. Estas gotas pueden viajar hasta un metro e infectar directamente a otro individuo, también pueden depositarse sobre las manos o superficies inanimadas y cuando el individuo sano hace contacto con estas gotas, si lleva sus manos a los ojos, la boca o la nariz, queda infectado ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

El tiempo en que el virus es viable en aerosol es de tres horas, mientras que en el plástico y en el acero inoxidable permanece hasta 72 horas. Se encontró que en el cobre y superficies de cartón puede estar viable hasta cuatro y ocho horas, respectivamente ⁽⁶⁷⁾. El virus es sensible al alcohol al 70%, hipoclorito de sodio al 0,1% y peróxido de hidrógeno al 0,5% ⁽⁶⁷⁾.

El período de incubación de la COVID-19 tiene una media de cinco días, con un rango de uno a 14 días ^(3,52). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, exponen que los síntomas ocasionados por la infección con SARS-CoV-2 aparecen entre dos a 14 días tras la exposición al virus ⁽⁶⁸⁾. La transmisibilidad o período de infectividad comienza entre 24 a 48 horas antes del inicio de los síntomas y dura hasta los días siete al nueve desde el inicio de estos ⁽⁵⁷⁾.

La transmisión presintomática es probablemente muy común y se ha llegado a plantear que todas las personas que desarrollan la COVID-19 en algún momento, fueron presintomáticos con posibilidades de contagiar y transmitir el virus desde 48 horas previas a la aparición de las manifestaciones clínicas ⁽⁶⁶⁾. En los casos asintomáticos, el virus podría propagarse, por un periodo de más de 14 días ⁽⁶⁶⁾. Generalmente, una persona no transmite el virus 10 días después de la resolución de los síntomas ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

II.2. Diagnóstico molecular del SARS-CoV-2

La prueba de referencia sugerida por la OMS para la detección del SARS-CoV-2 es la RT-PCR en tiempo real ^(72,73). Un aspecto clave en el rendimiento de la RT-PCR es la colecta de muestra ^(74,75).

II.2.1. Recolección, transporte y conservación de las muestras clínicas

Las muestras deben ser colectadas por un personal capacitado y teniendo en cuenta todas las medidas de bioseguridad, incluido el uso de los equipos de protección personal, adecuados para las precauciones estandares, de contacto y de transmisión aérea ^(75,76). La recolección de la muestra deberá cumplir con los mejores estándares de calidad ^(77,78), teniendo en consideración los siguientes elementos:

1.- Tiempo para el establecimiento de diagnóstico. El virus del SARS-CoV-2 puede detectarse inicialmente en muestras de exudado nasofaríngeo uno a dos días antes del inicio de los síntomas y persiste durante siete a 12 días en casos moderados ^(75,78) y hasta 20 días (o más) en muestras del tracto respiratorio inferior, como el esputo, el aspirado traqueal, y el lavado broncoalveolar ⁽⁷⁵⁾.

2.- Recolección de las muestras de SARS-CoV-2. Las muestras más recomendadas son los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos. También son útiles las muestras del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal ⁽⁷⁵⁾.

El virus se ha detectado, además, en otros tipos de muestras, como tejido pulmonar en personas fallecidas, saliva, heces y sangre; sin embargo, la dinámica viral en estas muestras no se ha caracterizado completamente ⁽⁷⁵⁾.

El exudado nasofaríngeo tiene un procedimiento de recolección bien establecido ^(78,79). Solo se deben usar hisopos de dacrón, flocados o de poliéster. No está recomendado el uso hisopos de alginato de calcio, algodón o hisopos con ejes de madera, ya que pueden contener sustancias que inactivan el virus o inhiben las pruebas moleculares ⁽⁷⁸⁾.

3.- Transporte. El hisopo se debe colocar en un tubo, de preferencia con medio de transporte viral, que se compone de soluciones que incluyen sales, proteínas, antibióticos y agentes antifúngicos, y aseguran la estabilidad, la esterilidad, la integridad y la calidad óptima de las muestras recolectadas ⁽⁷⁰⁾. En muchos casos se dispone de estuches especialmente preparados, que incluyen tanto el hisopo como el medio de transporte. Si se colecta muestra orofaríngea, ambos hisopos (exudado nasofaríngeo y orofaríngeo) deben combinarse en un solo tubo con medio de transporte ⁽⁷⁸⁾.

4.- Conservación. Las muestras respiratorias deben mantenerse refrigeradas entre cuatro y ocho °C y enviarse al laboratorio donde se procesarán en un plazo de 24 a 72 horas después de la colecta. Si no se pueden enviar las muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -20 °C o -70°C hasta que se envíen, asegurando que se mantenga constante la cadena de frío ⁽⁷⁵⁾.

II.2.2. Extracción de Ácidos Nucleicos

El primer paso en la fase analítica del diagnóstico molecular es la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica colectada del paciente ^(78, 80). Los procesos de extracción pueden ser manuales, semiautomatizados o automatizados habitualmente mediante el empleo de estuches comerciales ⁽⁸¹⁾.

Los estuches más comunes son los basados en columnas de sílice ⁽⁸¹⁾. Esta técnica se basa en la alta afinidad de las columnas de sílice hacia los ácidos nucleicos, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Los ARN se unen a la fase sólida de sílice, mientras que los restos del lisado del material celular y viral se eliminan en pasos previos a la purificación. También, durante el proceso, se utilizan tampones de lavado para eliminar impurezas de los ácidos nucleicos retenidos en la membrana. Una vez que el material genético está libre de ellas, se recupera mediante el uso de un tampón de elución ⁽⁸⁰⁾.

Otro de los métodos de extracción empleados es el de purificación por perlas magnéticas, que están recubiertas con una superficie con afinidad química específica para los ácidos nucleicos. Las perlas pueden unirse mediante interacciones químicas como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes. Como resultado de dicha interacción, el material genético queda retenido por las perlas magnéticas y el resto celular, los carbohidratos, proteínas y lípidos, son removidos de la solución ⁽⁸⁰⁾.

Los procedimientos de extracción de ácido nucleico deben eliminar o reducir considerablemente la cantidad de sustancias inhibitorias ⁽⁸¹⁾ para garantizar la pureza y calidad del material genético a emplear en el proceso de la PCR.

II.2.3. Técnica RT-PCR en tiempo real

La PCR es el prototipo de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. La misma se basa en el empleo de pequeños oligonucleótidos denominados cebadores y una enzima ADN polimerasa termoestable, capaz de amplificar el segmento delimitado por los cebadores, que suele ser de 100 a 1 000 pares de bases (pb) de longitud. El proceso transcurre entre 20 y 45 ciclos, cada uno consistente en tres pasos, que ocurren a diferentes temperaturas: desnaturalización del ADN, alineamiento o fijación de los cebadores al molde del ADN y extensión de la cadena

del ADN. Este se realiza en un equipo automático llamado termociclador, que controla los ciclos y su tiempo a las diferentes temperaturas. La ADN polimerasa utiliza solo el ADN como molde. La detección de los virus con genoma de ARN, requiere la inclusión de un paso previo de transcripción reversa, mediante la enzima transcriptasa reversa, desarrollándose el ensayo de amplificación denominado RT-PCR ⁽⁸²⁾.

Se denomina PCR en tiempo real a los ensayos en los que el proceso de amplificación y detección viral se producen de manera simultánea en un mismo tubo cerrado, sin necesidad de algún procedimiento posterior ⁽²²⁾.

En estos ensayos, el producto de la reacción es detectado mediante el incremento de una señal fluorescente generada durante la propia reacción, la cual es proporcional a la cantidad del producto formado y se visualiza en una computadora. En la actualidad existen diferentes plataformas instrumentales capaces de ejecutar el proceso de amplificación de forma eficiente y la detección simultánea. Estos termocicladores, poseen un lector de fluorescencia que es capaz de medir, constantemente, la señal emitida por cada muestra de manera individual ^(22, 82).

Los métodos de detección molecular empleados son de dos tipos: no específicos y específicos según su mecanismo de reconocimiento del producto amplificado. Dentro de los métodos no específicos se encuentra el SYBR Green, agente intercalante con afinidad por ADN de doble cadena que al ser oxidado emite una señal de fluorescencia, tiene como desventajas que puede generar señales inespecíficas. Los métodos específicos utilizan sondas de secuencia conocida para realizar la detección. La sonda TaqMan utiliza una sonda marcada con un fluoróforo en su extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Durante la extensión, la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa degrada la sonda marcada y separa el fluoróforo del quencher, este proceso permite la emisión de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Las Molecular Beacons son estructuras en forma de horquilla con fluoróforo y un quencher. Emiten fluorescencia solo cuando se hibrida con la secuencia diana y ocurre la transferencia de energía por resonancia fluorescente. Las sondas Scorpion incorporan cebadores y sondas en una molécula, lo que mejora la eficiencia de detección. Los métodos específicos

siguen el principio conocido como Föster Resonance Energy Transfer por sus siglas en inglés (FRET), para generar la señal ⁽⁸²⁾.

Si los niveles de fluorescencia están por encima del umbral predeterminado se evidencia la amplificación del ADN. El resultado es positivo si la fluorescencia emitida durante la amplificación de los fragmentos de los genes dianas está por encima del umbral y es negativo si la fluorescencia está por debajo del umbral ⁽⁸³⁾.

Los genes diana más usados para la detección de SARS-CoV-2 son el gen E, recomendado por la OMS como tamizaje de primera línea, los genes RdRp y N en estudios de confirmación. Otro gen utilizado es el Orf1ab ⁽⁸⁴⁾.

Para el diagnóstico de confirmación, en zonas sin circulación del virus SARS-CoV-2, se necesita la positividad frente a dos genes distintos de SARS-CoV-2. En zonas de transmisión comunitaria, se considera suficiente la positividad de la RT-PCR con un único gen que sea discriminatorio de SARS-CoV-2 ⁽⁸⁴⁾.

Para demostrar la ausencia de inhibición en la RT-PCR y la presencia de un número suficiente de células en las muestras de pacientes, así como el aislamiento satisfactorio de los ácidos nucleicos intactos, en cada reacción de PCR en tiempo real se incluyen cebadores y sondas dirigidos a la amplificación del gen que codifica para la RNasaP presente en múltiples copias en el genoma humano. Esta diana constituye un control interno del proceso de amplificación que es recomendado por varios autores, pues garantiza la confiabilidad de los resultados y la calidad del ácido nucleico purificado a partir de muestras clínicas. ^(49, 57, 85, 86).

La ausencia de reactividad cruzada del ensayo para detectar SARS-CoV-2 se garantiza mediante la utilización de sondas y cebadores que no tienen homología de secuencias, con el genoma humano, con otros coronavirus, ni con los de la microflora respiratoria humana ⁽⁸⁷⁾.

La RT-PCR es la prueba más sensible de los métodos diagnósticos disponibles ⁽⁸⁸⁾. Debe tener una especificidad del 100%; sin embargo, se pueden presentar falsos positivos ^(22, 57, 84). Que son aquellos especímenes en los que se detecta ARN mediante RT-PCR cuando realmente no existe virus presente en los mismos. Otras causas de la detección de falsos positivos puede deberse a errores en la

manipulación de la técnica o por contaminación, ya sea de los reactivos o cruzada entre las muestras ^(22, 57, 84).

Los falsos negativos de RT-PCR pueden deberse a errores en el momento y la eficacia de la colecta de la muestra, almacenamiento inadecuado, congelación y descongelación repetida, exposición a inhibidores del ARN viral y muestras con cargas virales bajas ^(57, 61, 89).

Entre las ventajas de la PCR se encuentran la rapidez en la obtención de los resultados y la capacidad de procesar un elevado número de muestras en un corto tiempo⁽²²⁾.

II.2.3.1. Umbral de ciclo (Ct)

El Ct (del inglés Cycle threshold) hace referencia al número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia generada por la amplificación del ADN supere un nivel de detección predeterminado (umbral de fluorescencia ⁽⁹⁰⁾.

Las pruebas cualitativas de RT-PCR no miden la carga viral dentro de una muestra clínica, pero los valores de Ct ofrecen estimaciones de las concentraciones de ARN viral: valores más bajos de Ct corresponden a concentraciones más altas de ARN viral ⁽⁹¹⁾.

Para el SARS-CoV-2 cuando el resultado es interpretado como cualitativo, un Ct de RT-PCR menor de 40 ciclos generalmente se considera positivo a la prueba; mientras que la interpretación cuantitativa del Ct se le atribuye como un indicador del número de copias de ARN de SARS-CoV-2 en forma indirecta ⁽⁹²⁾. Un aumento de 3,3 unidades en el valor de Ct corresponde a 10 veces menos ARN en condiciones óptimas ⁽⁹³⁾.

Si bien, la carga viral solo se evalúa indirectamente mediante los valores de Ct, el mismo aporta información útil para comprender las correlaciones clínicas y epidemiológicas de una posible infección ⁽⁹⁴⁾. Aunque está claro, que la detección de ARN viral no es lo mismo que la infectividad ⁽⁹⁵⁾.

Los valores altos del Ct se correlacionan fuertemente con la imposibilidad de aislar virus en cultivos de célula. El aislamiento, a partir de muestras clínicas, confirma la presencia de virus infecciosos. Este método no está ampliamente disponible, requiere instalaciones de nivel de bioseguridad III (NSB3) y los resultados no son

oportunos para la toma de acciones en salud pública ⁽⁹³⁾. La probabilidad de asilamiento viral disminuye al ocho % en muestras con Ct>35 y al seis % 10 días después del inicio de los síntomas, tanto en personas asintomáticas y como sintomáticas ⁽⁹⁶⁾.

La variabilidad de los valores de Ct en la RT-PCR en tiempo real puede ser influenciado por varios factores, entre ellos se encuentra la calidad y cantidad de material genético inicial, la presencia de inhibidores en la muestra, las condiciones para su almacenamiento y transporte, la sensibilidad analítica de los reactivos utilizados, las condiciones de la reacción, las dianas genéticas empleadas y la precisión de las plataformas de amplificación de PCR, por lo que es necesario que cada laboratorio normalice los procedimientos a realizar y utilice controles adecuados para minimizar las variabilidades y obtener resultados confiables ^(86, 97).

II.2.4. Protocolos empleados en el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2

Existen protocolos basados en las diferentes dianas de amplificación de los genes que codifican proteínas del SARS-CoV-2; los aceptados por la OMS, durante la pandemia, para la realización de la RT-PCR para virus SARS-CoV-2 se muestran en la Tabla 1 ⁽⁹⁸⁾.

El protocolo de amplificación empleado por el CDC de China se fundamenta en el ensayo realizado por Peihua Niu y colaboradores ⁽⁹⁹⁾. La RT-PCR mostró un bajo límite de detección, con aproximadamente 10^{-4} diluciones por reacción, para los genes ORF1ab, E y N, y 10^{-3} diluciones por reacción para el gen RdRp. Se identificaron reacciones cruzadas en el gen E con el linaje B de los Beta-coronavirus (SARS-CoV, SARS-CoV-2 y Coronavirus SARS-like de murciélagos,) por lo que se recomendó su uso para la pesquisa y la confirmación mediante el empleo de los genes ORF1ab y N ⁽⁹⁹⁾.

Tabla 1. Protocolos de diagnóstico molecular aceptados por la OMS y regiones genómicas del SARS-CoV-2 que amplifican.

Institución y protocolo aceptados por la OMS	Regiones genómicas Amplificadas
CDC China, China	ORF1ab y N
Instituto Pasteur, París Francia.	Dos regiones en la región RdRp
CDC Estados Unidos.	Tres regiones del gene N
Institución Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón	Pancorona y múltiples regiones. Proteína de punta
Alemania Charité	RdRp, E, N
HKU, Hong Kong SAS	Orf1b-nsp14, N
Institución Nacional de Salud de Tailandia	N

Fuente: Díaz, I. (2020). Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS- Cov-2 ⁽⁹⁸⁾.

El protocolo diseñado por el Instituto Pasteur, de París, Francia, se basó en la detección de dos dianas localizadas en el gen RdRp (IP2 e IP4) en las posiciones 12621-12727 y 14010-14116. Como ensayo de confirmación se utilizó el gen E del protocolo del Instituto de Virología de la Charité, de Berlín. No se mostró reactividad cruzada con el panel de virus respiratorios probados ⁽¹⁰⁰⁾.

Los CDC de Estados Unidos, desarrollaron y validaron un panel de RT-PCR basado en tres regiones genéticas, denominadas N1, N2 y N3. N1 y N2 se diseñaron para detectar específicamente el SARS-CoV-2, y N3 se diseñó para detectar universalmente todos los virus dentro del subgénero Sarbecovirus. No se encontró reacción cruzada con otros coronavirus. Los límites de detección para todos los ensayos oscilaron entre $1,0 \times 10^{-1,5}$ y $1,0 \times 10^{-1}$ TCID₅₀/mL (dosis infecciosa del 50 % en cultivo tisular) ⁽¹⁰¹⁾.

El protocolo diseñado en Japón empleó nueve cebadores específicos y se utilizaron cebadores pan coronavirus. El conjunto de cebadores ORF 1 y los cebadores para la proteína S, se consideraron adecuados para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 ⁽¹⁰²⁾.

El protocolo diseñado en Hong Kong recomendó, como método de pesquisa, el gen N y como confirmatorio el ensayo Orf1b. Estos ensayos detectan coronavirus del subgénero Sarbecovirus. Un resultado positivo para el gen N y negativo para Orf1b

debe ser considerado indeterminado; y se recomienda remitir el caso a un laboratorio de referencia de la OMS ⁽¹⁰³⁾. El ensayo no demostró reactividad cruzada a los siguientes virus: coronavirus (229E, HKU1, NL63, OC43), virus de la influenza A (subtipos H1N1 y H3N2), virus de la influenza B (linajes Yamagata y Victoria), adenovirus, enterovirus, virus parainfluenza humana (PIV3), virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, rinovirus y bocavirus humanos ⁽¹⁰³⁾.

En Tailandia se aplicó un protocolo de confirmación, basado en la amplificación de 57 pb del gen N, mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real múltiple separadas. En el primer ensayo se utilizan cebadores y sondas específicos para los genes RdRp, N y E. El segundo ensayo emplea cebadores y sondas correspondientes a los genes RdRp y E ^(104, 105).

La OPS recomendó inicialmente, el protocolo del Instituto de Virología de la Charité, de Berlín. Este se fundamenta en la detección de dos genes virales: el gen E, que detecta un gen común a todos los Sarbecovirus, y el gen RdRp como confirmatorio. El gen E se utiliza como pesquisa con un límite de detección de 5,2 copias de ARN/reacción y el gen RdRp, como confirmatorio, con un límite de detección de 3,8 copias de ARN/reacción. Ambos genes tienen una tasa de acierto del 95% ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾.

No se encontraron reacciones cruzadas con los siguientes virus: HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-229E, Coronavirus del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), Influenza A (H1N1/09), Influenza A (H3N2), Influenza A(H5N1), Influenza B, rinovirus/enterovirus, virus sincitial respiratorio (A o B), parainfluenza 1, 2, 3, 4 A y 4B), metapneumovirus humano, adenovirus, bocavirus humano, *Legionella spp* y *Mycoplasma spp* ⁽¹⁰⁶⁾.

En las directrices de laboratorio de la OPS para la detección y el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, se declara que el único Sarbecovirus que circulaba en las Américas, en humanos, en el año 2020 era el SARS-CoV-2. Debido a esto se sugirió realizar la confirmación de la infección utilizando la amplificación de un solo gen, siempre y cuando las curvas obtenidas y los parámetros de calidad fueran óptimos. Algunos estudios demostraron una mayor sensibilidad al amplificar el gen E, por ello se recomendó priorizar este gen como marcador diagnóstico ^(21, 70, 100).

II.3. Desempeño del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2

La emergencia del nuevo coronavirus de SARS-CoV-2 conllevó a la implementación de métodos de laboratorio con criterios rigurosos de confiabilidad y validez para diagnosticar rápidamente, aislar y tratar adecuadamente a los pacientes y sus contactos ^(109, 110).

La validez de una prueba diagnóstica se refiere a su capacidad para identificar correctamente como enfermo al paciente que es enfermo y como sano al que es sano. Ese es el punto de partida para calcular los indicadores de desempeño con respecto a una prueba de referencia, conocida también como prueba patrón de oro (gold-standard) ⁽¹¹¹⁾.

II.3.1.Validez de las pruebas diagnósticas

En 1947, Yerushalmy introdujo los términos de sensibilidad y especificidad, como indicadores estadísticos de validez que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica ⁽¹¹²⁾. Ambas son características intrínsecas e interdependientes de la prueba diagnóstica ⁽¹¹²⁾.

La sensibilidad (S) indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa cuán "sensible" es la prueba a la presencia de la enfermedad. También se puede explicar cómo la probabilidad de que un individuo se clasifique correctamente como positivo, respecto a la condición que estudia la prueba ⁽¹¹⁰⁾.

La especificidad (E) indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los que efectivamente lo son. Se define entonces también como la probabilidad condicional, de que la prueba identifique como no enfermo a aquel que efectivamente no lo está ⁽¹¹⁰⁾.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) es la probabilidad de que el sujeto esté enfermo una vez que el resultado de la prueba es positivo. Por su parte, el Valor Predictivo Negativo (VPN) es la probabilidad de que el sujeto esté sano si el resultado de la prueba es negativo ⁽¹¹³⁾.

El Cociente de Probabilidad Positivo (CPP) representa cuánto más probable es tener un valor positivo en un individuo enfermo que en uno sano, es una medida utilizada en pruebas diagnósticas para evaluar la utilidad de un resultado positivo para

confirmar la presencia de la enfermedad. Por su parte, el Cociente de Probabilidad Negativo (CPN) expresa cuánto más probable es encontrar una prueba negativa en un sujeto enfermo que en uno sano. Evalúa la utilidad de un resultado negativo para descartar la enfermedad. Los cocientes de probabilidades no tienen una lectura directa como la tienen S, E y los valores predictivos, sino que, según sus valores, se clasifica la potencia de la prueba ⁽¹¹³⁾.

El nomograma de Fagan, es una herramienta gráfica que permite, de forma rápida, evaluar la precisión de una prueba diagnóstica, al calcular directamente la probabilidad posprueba a partir del valor de la prevalencia y del cociente de probabilidades ⁽¹¹²⁾.

II.3.2. Fiabilidad de las pruebas diagnósticas

La fiabilidad de una prueba diagnóstica viene determinada por la estabilidad de sus valores medibles siempre que repita en condiciones similares. La variabilidad de las mediciones va a estar influida por múltiples factores que interesa conocer y controlar. Entre ellos, tiene especial importancia distinguir las variaciones de interpretación intraobservador e interobservador ⁽¹¹⁴⁾.

En el contexto de pruebas de laboratorio como la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2, la fiabilidad se relaciona con la capacidad de la prueba para mostrar resultados precisos cada vez que se realiza, asegurando que los falsos negativos o falsos positivos sean mínimos, y que la prueba pueda ser repetida con resultados consistentes y reproducibles ⁽¹¹⁴⁾.

II.4. Papel del laboratorio en la vigilancia epidemiológica

En Cuba, la vigilancia epidemiológica y la pesquisa activa de casos se realiza en el primer nivel de atención, por el Equipo Básico de Salud integrado por el médico y la enfermera de la familia. En el caso de la COVID-19 se dirigió a la detección de pacientes con síntomas respiratorios y otros asociados. La confirmación se realizó en el LBM de cada provincia ⁽⁶⁵⁾.

La pandemia de COVID-19 puso de manifiesto la importancia de los laboratorios de biología molecular en la vigilancia epidemiológica y en el manejo de emergencias sanitarias, con una contribución significativa, abarcando desde, agilizar la provisión

de reactivos e insumos en función de la detección rápida y precisa del virus SARS-CoV-2, hasta la vigilancia genómica. Dicha vigilancia propicia el seguimiento de las variantes virales mediante el desarrollo de técnicas moleculares que permiten entender la evolución del virus, y así ajustar estrategias para la toma de decisiones clínicas, epidemiológicas y de salud pública.

II.5.Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación de ácidos nucleicos es un conjunto de métodos de laboratorios cuya finalidad es determinar el orden exacto de los nucleótidos en el ácido nucleicos del virus ⁽¹¹⁵⁾.

En la actualidad, existen diversas técnicas de secuenciación:

Secuenciación de 1^{ra} Generación (Sanger), Secuenciación de 2^{da} Generación (Next Generation Sequencing o secuenciación de nueva generación (NGS) y Secuenciación de 3^{ra} Generación (De Molécula Única) ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾.

En Cuba, la más utilizada durante la pandemia de COVID-19 fue la secuenciación de 1^{ra} generación o Sanger ^(13, 115).

Este método se fundamenta en la incorporación selectiva de dideoxinucleótidos marcados con fluoresceína durante la replicación in vitro del ADN, actuando como terminadores de la cadena y generando fragmentos de ADN de diferentes longitudes, que pueden ser separados y analizados para determinar la secuencia de ácidos nucleicos ⁽¹¹⁵⁾.

La aplicación de la secuenciación genera un gran volumen de información que debe ser organizado y analizado, mediante la bioinformática que constituye una ciencia que aplica las matemáticas, la estadística y la computación ⁽¹¹⁸⁾.

El análisis de la secuencia nucleotídica proporciona información que no es posible obtener por otras técnicas. Actualmente existen bases de datos disponibles en Internet, de libre acceso, como el GenBank y GISAID para el depósito y comparación de secuencias, lo cual potencia, aún más las posibilidades de esta herramienta ⁽²²⁾.

II.5.1. Vigilancia genómica del SARS-CoV-2

La vigilancia genómica del SARS-CoV-2 desempeña un papel clave en la lucha contra la pandemia de COVID-19. Esta vigilancia implica la secuenciación del

material genético del virus a partir de muestras clínicas para identificar y monitorear las variantes que emergen y se propagan en las diferentes regiones geográficas.

El estudio de las secuencias genómicas permite detectar mutaciones implicadas en las funciones biológicas del virus, como la unión a los receptores celulares, la transmisibilidad, la virulencia y la capacidad para evadir la respuesta inmunológica del hospedero ⁽¹¹⁹⁾. La vigilancia genómica es un componente crítico de la vigilancia epidemiológica.

La OMS creó en el año 2020 el Grupo de Trabajo sobre Evolución Viral, basado en estudios de secuenciación y centrado específicamente en el estudio de las variantes del SARS-CoV-2 que suponían un mayor riesgo para la salud pública mundial. Algunas de ellas se clasificaron como VOI, VOC, VOHC y VBM con el fin de establecer prioridades en el seguimiento y la investigación a escala mundial, así como orientar y adecuar la respuesta a la COVID-19. A partir de mayo de 2021, la OMS comenzó a asignar denominaciones sencillas y fáciles de pronunciar para las variantes clave ⁽¹⁷⁾.

II.5.2. Evolución de variantes y mutaciones con efectos biológicos potenciales

II.5.2.1. Variantes de preocupación

Presentar los atributos de las VOC, tienen un genoma que contiene mutaciones de implicaciones fenotípicas respecto al aislado de referencia, son causa de transmisión comunitaria o en múltiples grupos y se detectan en muchos países. Muestran mayor transmisibilidad y gravedad en la enfermedad, interferencia con las dianas genómicas de las pruebas diagnósticas, susceptibilidad reducida a una o más tipos de terapias y disminución significativa del efecto de anticuerpos neutralizantes ⁽¹⁷⁾.

Entre ellas se encuentran:

- Variante Alfa (Linaje B.1.1.7)

También llamada variante británica. Es un grupo filogenético que se extendió rápidamente desde el sureste del Reino Unido a diferentes países del mundo. Contiene 23 mutaciones, de las cuales 17 definen el linaje. El análisis filogenético indica que esta variante acumuló una gran cantidad de mutaciones antes de su detección, lo que sugiere una evolución previa significativa posiblemente en

hospederos con infección crónica ^(12, 119, 120). La proteína S, posee ocho mutaciones idénticas, tres de estas ellas tienen efectos biológicos potenciales: N501Y en el dominio de unión al receptor (RBD), P681H en el sitio de escisión de la furina, y la delección 69/70 en el dominio N terminal de la proteína S. Todas en conjunto, pueden aumentar la infectividad por una mayor afinidad de unión al receptor ECA2, por la transmisibilidad y por la evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, existen suficientes evidencias de que, tanto los sueros de individuos convalecientes, como los sueros de individuos vacunados con vacunas ARNm, no tienen problemas para neutralizar un virus portador de N501Y ^(12, 119, 120).

- Variante Beta (Linaje B.1.351)

Se detectó por primera vez en la Bahía Nelson Mandela, Sudáfrica y posteriormente en Zambia, a finales de diciembre de 2020, momento en el que parecía ser la variante predominante en ese país. La variante Beta contiene 21 sustituciones de nucleótidos, de las cuales nueve definen el linaje. Entre las mutaciones de la proteína S se incluye la ya conocida N501Y y dos más que influyen en la actividad neutralizante de los anticuerpos (E484K, K417N) ^(12, 119, 121). La variante Beta a diferencia de la Alpha, no contiene la delección 69/70. El ocho de enero de 2021, BioNTech (Alemania) y Pfizer (EE.UU.), fabricantes de la principal vacuna ARNm (BNT162b2) administrada en el mundo, aseguraron que BNT162b2 es eficaz contra la mutación N501Y, pero sus análisis no incluyeron a las variantes que albergan E484K, por lo que persisten las dudas sobre este punto. Actualmente, no hay evidencia suficiente que sugiera que esta variante tenga algún impacto en la gravedad de la enfermedad; sin embargo, se sabe por estudios *in vitro*, que la mutación E484K puede afectar la capacidad de neutralización de algunos anticuerpos monoclonales, policlonales y de las pruebas de diagnóstico molecular ^(12, 119, 121).

- Variante Gamma (Linaje P.1)

Descrita por primera vez en Manaus, Brasil, en diciembre de 2020. Este nuevo linaje denominado P.1, es un alias del B.1.1.28.1. Se identificó por primera vez en cuatro turistas brasileños muestreados durante la detección de rutina en el aeropuerto de Haneda, en Tokio, Japón. Lo más intrigante del linaje P.1 es su rápida propagación

en Manaus, pudiendo estar asociada a una mayor transmisibilidad y peligro de reinfecciones. La mutación K417N de la variante Gamma, al parecer, tiene un efecto muy pronunciado en la disminución de la eficacia de anticuerpos y en combinación con la mutación N501Y anularía completamente el efecto de los mismos. Aunque la variante Gamma tiene más mutaciones en la proteína S en comparación con la variante Beta, sorprende que Gamma sea de manera significativa, menos resistente que Beta a los anticuerpos neutralizantes, ya sea adquirida naturalmente o inducida por vacunaciones ^(12, 119, 122).

- Variante Delta (Linaje B.1.617.2)

Se identificó en octubre de 2020, en el estado de Maharashtra, en el occidente de la India, cuando se realizaba un análisis en muestras recolectadas en esa región. El linaje incluye tres subtipos principales (B.1.617.1, B.1.617.2 y B.1.617.3), y posee mutaciones distintivas comunes: (D111D, G142D, L452R, E484Q, D614G y P681R), en la proteína S, incluido el dominio de unión al receptor (RBD). Dentro de ellos, el sublinaje B.1.617.2 (variante Delta) es el responsable de la segunda ola mortal de infecciones por COVID-19 en abril de 2021, en la India. Se transmite continuamente a una tasa más alta dentro de este país y en todo el mundo, desplazando a la variante Alpha, inicialmente establecida ^(12, 119, 123). A pesar de que inicialmente se consideró como una VOI, su rápida extensión llevó a la OMS a clasificarla como una VOC en mayo de 2021. Esta variante contiene diez mutaciones (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) en la proteína S, cuatro de ellas son de especial preocupación: L452R, T478K, D614G y P681R; lo que puede asociarse con una alta tasa de transmisión viral y aumento en el escape a la neutralización ^(12, 119, 123). Se observó que la variante Delta era resistente a la neutralización por algunos anticuerpos monoclonales anti-NTD y anti-RBD, incluido el bamlanivimab; estos anticuerpos mostraron una unión deficiente a la proteína S ^(12, 119, 123).

- Variante Ómicron (Linaje B.1.1.529)

El primer caso fue reportado en noviembre de 2021, en Botswana. La variante Ómicron presenta 37 mutaciones en la proteína S, de las cuales 26 son únicas de la misma y el resto son compartidas con las variantes Alpha, Beta y Gamma (69–70del,

T95I, G142D/143–145del, K417N, T478K, N501Y, N655Y, N679K y P681H). Estas mutaciones permiten una mayor transmisibilidad, afinidad de unión al receptor y escape inmunológico ^(12, 119, 124). Un estudio previo probó la sensibilidad de 28 muestras de suero de pacientes convalecientes de COVID-19, infectados con la cepa original Wuhan del SARS-CoV-2 a Ómicron y a otras VOC y VOI; y se observó que la neutralización media de estos sueros contra Ómicron disminuyó 8,4 veces en comparación con la cepa de referencia D614G, mientras que la actividad de neutralización de las otras variantes disminuyó solo alrededor de 1,2-4,5 veces ^(12, 119, 124).

II.5.2.2. Variantes de interés

Según la OMS, estos virus tienen un genoma que contiene mutaciones de implicaciones fenotípicas respecto al aislado de referencia, son causa de transmisión comunitaria o de múltiples grupos y se detectan en varios países

Presentan los siguientes atributos ⁽¹⁷⁾:

- a. Probable afectación de la transmisión, diagnóstico, terapéutica y respuesta inmunológica.
- b. Evidencia de una mayor proporción de casos o brotes únicos.
- c. Prevalencia o expansión geográfica limitada.

Las VOI merecen un seguimiento especial debido a que presentan cambios genéticos que pueden afectar las características del virus, tales como la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad, el escape inmunológico, y escape diagnóstico o terapéutico ^(12, 119).

- Variantes Eta (B.1.525) e Iota (B.1.526)

Albergan mutaciones clave como B.1.525 (A67V, Δ69 / 70, Δ144, E484K, D614G, Q677H, F888L) y B.1.526 (L5F, T95I, D253G, S477N, E484K, D614G, A701V) que se detectaron por primera vez en Nueva York en noviembre de 2020. Los CDC de Atlanta y la OMS las clasificaron como variantes de interés debido a su posible reducción de la neutralización por anticuerpos, tratamientos y sueros de vacunas ^(12, 119, 125).

- Variante Lambda (C.37)

Denominada "Lambda" en su nomenclatura simplificada. Se informó por primera vez en Perú, en agosto de 2020 y luego se extendió a la mayoría de los países de América del Sur. Se notificaron casos importados a la mayoría de los países europeos desde diciembre de 2020 ^(12, 119, 126). La aparición de mutaciones asociadas a la pérdida de neutralización en diferentes cepas (L452Q y F490S) hace que la C.37 sea de especial interés. Se demostró que "Lambda" tiene una sensibilidad moderadamente reducida a la neutralización por sueros de convalecientes y el anticuerpo monoclonal REGN10987 ^(12, 119, 126).

- Variante Mu B.1.621

La OMS designó esta variante en agosto de 2021. Se informó por primera vez en Colombia, en enero de 2021. Presenta varias sustituciones que afectan a la proteína S, incluyendo los cambios de aminoácidos, Y144T, Y145S, R346K, E484K, N501Y y P681H. Son comunes las sustituciones en la proteína de la espícula, sin embargo, algunas sustituciones distintivas son características relevantes, en cuanto a una menor actividad neutralizante del plasma convaleciente y anticuerpos. No obstante, las implicaciones en términos de infección, transmisión y patogénesis aún se desconocen, por lo que se requieren más reportes que permitan evaluar las funciones biológicas y epidemiológicas ^(12, 119).

MATERIALES Y MÉTODOS

III. Materiales y Métodos

III.1. Diseño general del estudio

Se realizó una Investigación en Sistemas y Servicios de Salud en la cual se evaluó una nueva tecnología sanitaria en el LBM de Villa Clara, en conjunto con el LNR-IVR-IPK durante el periodo de marzo de 2020 a mayo de 2023.

III.2. Población y muestra

Para determinar los indicadores de desempeño diagnóstico de la RT-PCR en muestras procesadas por el LBM de Villa Clara se seleccionó el total de muestras de exudados nasofaríngeos enviados para el control de calidad al LNR-IVR-IPK. La muestra quedó constituida por 447 exudados con resultados positivos y negativos. Este fue el único criterio que se consideró para la inclusión en el estudio.

Para establecer la relación entre los resultados del diagnóstico molecular y las variables clínico-epidemiológicas, así como para definir patrones en la vigilancia integrada frente a la pandemia de COVID-19 en Villa Clara, se trabajó con unidades de análisis a nivel individual y grupal como se describe a continuación:

- A nivel individual: los 60 141 casos confirmados desde el inicio hasta el final de la pandemia en Villa Clara.
- A nivel grupal: las agrupaciones de la población por municipios de la provincia Villa Clara.

Para Identificar la frecuencia y distribución temporal de variantes genéticas, linajes y mutaciones clave en la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Villa Clara, fueron incluidas las 106 muestras confirmadas a las que se les realizó la secuenciación nucleotídica en el laboratorio LNR-IVR-IPK, según su capacidad diagnóstica. Los criterios pre establecidos por el IPK para el envío de estas muestras, fueron: viajeros, fallecidos, casos graves y casos sospechosos.

III.3. Contexto de la investigación

El LBM ubicado en el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Villa Clara, único en la provincia, asumió el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2. En su estructura se compone de cuatro áreas independientes: Recepción de muestras clínicas, local para la extracción de ácidos nucleicos, local para la preparación de mezclas de PCR y área de amplificación. Cuenta con tecnología automatizada para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, en tiempo real, que constituyen los procedimientos implementados en el laboratorio durante la pandemia. Se dispuso de recursos humanos capacitados. Se crearon cuatro equipos de trabajo conformados por ocho licenciados en Bioanálisis Clínico y un médico especialista en Microbiología en cada uno, para garantizar la calidad de los ensayos. Este escenario permitió el diagnóstico, la confirmación de los casos y la integración a la vigilancia genómica.

III.4. Técnicas y procedimientos para recolección de la información

III.4.1. Procedimientos de la detección del SARS-CoV-2 en LBM de Villa Clara

El diagnóstico molecular se basó en las Directrices de Laboratorio de la OPS para la detección y diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, que se publicaron en febrero de 2020, los Protocolos de Actuación del Minsap, y los procedimientos normalizados de las operaciones del LNR-IVR-IPK. Se siguió el protocolo estandarizado y validado bajo la metodología del Instituto de Virología de la Charité (Berlín, Alemania). Este recomienda la utilización el gen E de la envoltura como prueba de tamizaje, el gen RdRp para estudio de confirmación ⁽¹⁰⁶⁾ y los genes RNAsa P y β actina humana como control endógeno de la extracción de ácidos nucleicos. En el LBM de Villa Clara se adecuaron los procedimientos normalizados de las operaciones para las diferentes etapas del diagnóstico (Anexos 2, 3 y 4).

III.4.1.1. Recepción de muestras

Se empleó el diagrama de proceso tipo hilo (Anexo 5) para reorganizar el flujo de entrada de muestras al laboratorio, en función de la bioseguridad, la trazabilidad, evitar cuellos de botella y lograr la eficiencia operativa ⁽¹²⁷⁾.

Las muestras de exudados nasofaríngeos, procedentes de las diferentes instituciones de salud de la provincia y de la región central, se abrieron y se clasificaron en la cabina de seguridad biológica clase II (CSB) en el área de recepción, teniendo en cuenta los criterios de aceptación o rechazo.

Una vez que la muestra cumplió con los criterios de aceptación se procedió a su identificación con el código de la provincia y el número correspondiente, según el registro de entrada de muestras al laboratorio, para su posterior procesamiento.

Se confeccionó la hoja de trabajo, según el número de muestras a procesar y extractor de ácidos nucleicos a utilizar.

III.4.1.2. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando las siguientes plataformas y estuches: QIAcube (QIAGEN, Alemania) también se introdujeron nuevas tecnologías como: QIAcube HT (QIAGEN, Alemania) y Auto-Pure 96 de (Allsheng, China).

Para la extracción se emplearon los siguientes estuches comerciales:

- QIAamp viral RNA Mini kit (QIAGEN, Alemania): se distribuyeron 560 µL de la solución de lisis a los tubos colectores, se agregaron 140 µL de la muestra problema.
- En el QIAamp 96 virus QIAcube HT Kit (QIAGEN, Alemania): se dispensaron 160 µL de la solución lisis y se añadieron 200 µL de muestra problema en cada pocillo de la placa.
- CEA-NANO+RNA 3.0 (Centro de Estudios Avanzados, Cuba), se dispensaron 200 µl de solución lisis y 200 µl de muestra en los bloques, que además contenían 200 µl de la solución de precipitación (SP-RNA 3.0) y 100 µl de perlas magnéticas (NESP-A380).

Para las tres plataformas con sus estuches se utilizaron los procedimientos descritos por cada fabricante para la extracción de ácidos nucleicos ^(128, 129, 130).

El ARN extraído se almacenó en el refrigerador de 2 °C a 8 °C hasta continuar con la técnica molecular de RT-PCR. En caso de no utilizarlo en el día, se conservó de -20 °C a -70 °C para preservar la estabilidad del ARN.

III.4.1.3. Preparación de la Master Mix de RT-PCR SARS-CoV-2

Se describe detalladamente la implementación del diagnóstico molecular casero, in house, donado por la OPS y constituido por cuatro juegos de cebadores y sondas de hidrólisis (TaqMan).

Para el tamizaje (gen E) se emplearon los siguientes cebadores y sondas de hidrólisis: cebadores E-Sarbeco-F1 y E-Sarbeco-R2, Sonda E-Sarbeco-P1; Confirmación (gen RdRp): cebadores RdRp-SARSr-F2 y RdRp-SARSr-R1, y Sonda RdRp-SARSr-P2 (tabla 2).

Tabla 2. Cebadores y sondas donados por OPS y diseñados por el Instituto de Virología de la Charité (Berlín, Alemania).

Ensayo	Oligonucleótido	Secuencia (5'–3')
Gen E	E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
	E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ
Gen RdRP	RdRP_SARSr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
	RdRP_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
	RdRP_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ

Fuente:Protocolo de Charité ⁽¹⁰⁶⁾.

Se utilizó agua libre de RNasa/ADNasa 4,5µL y tampón de reacción (2x)² 12,5 µL, cebadores E_Sarbeco_F1 (10 µM) (1 µL), E_Sarbeco_R2 (10 µM) (1 µL), sonda E_Sarbeco_P1 (10 µM) (0,5 µL), enzima (0,5 µL) ver tabla 3. Después de preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la fórmula anterior, se dispensaron 20 µL de esta mezcla de reacción en cada microtubo. Los microtubos preparados con la mezcla de reacción y cubiertos con papel de aluminio se trasladaron en la gradilla refrigerada al laboratorio de amplificación, donde se añadieron 5 µL del ácido nucleico problema en el microtubo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 µL. En cada corrida se añadieron, además, 5 µL de los controles positivos y negativos (Anexo 3).

Durante la pandemia se utilizaron otros estuches comerciales de diagnóstico como: RIDA®GENE SARS-CoV-2 (Alemania) y STAT NAT SARS-CoV-2 MICRO (Italia). Para la preparación de las mezclas se siguieron las recomendaciones del fabricante (Anexo 4).

Tabla 3. Rampas de temperaturas en ensayos suministrados por OPS según enzimas empleadas.

Pasos	Enzimas					
	SuperScript™ One-Step qRT-PCR Kit			AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents		
	Tiempo	Temperatura	Ciclo	Tiempo	Temperatura	Ciclo
Hold 1*	30 min	50°C	1	30 min	50°C	1
Hold 2**	2 min	95°C	1	10 min	95°C	1
Desnaturalización	15 seg	95°C	45	15 seg	95°C	45
Hibridación***	30 seg	58°C	45	30 seg	58°C	45
Extensión***	30 seg	58°C	45	30 seg	58°C	45

*transcripción inversa

** activación de la ADN polimerasa

***adquisición de canal FAM – Green: Gen E y RdRp respectivamente

Fuente: Procedimiento Normalizado de las Operaciones del LBM.

II.4.1.4. Amplificación y detección

Para la amplificación y detección se emplearon las plataformas Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemania) y SLAN YGP ([Shanghai HongshiMedical Technology Co. Ltd](#), China). Los ciclaes y las rampas de temperaturas se programaron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes para cada uno de los estuches empleados incluidas las enzimas utilizadas.

III.4.1.5. Lectura de resultados de RT-PCR

- Gen E y Gen RdRp: Canal Green (excitación 470 nm, detección 510 nm): dado que la sonda es marcada con el fluoróforo FAM, permite detectar SARS-CoV-2.
- Gen del Control interno (Gen β -actina): Canal Red (excitación 610 nm, detección 670 nm): dado que la sonda es marcada con el fluoróforo Cy5 permite detectar ADN del Gen β -actina humano como control interno.

III.4.1.6. Informe de resultados

Muestra positiva: Valor de $Ct \leq 40$ y curva de amplificación con morfología sigmoidal característica, se reportará como SARS-CoV-2 (Gen E o Gen RdRp).

Muestra negativa: Valor de $Ct > 40$ o no amplificación detectada (Gen E o Gen RdRp) y un control interno $Ct \leq 40$ y curva de amplificación sigmoidal característica.

Muestra inhibida: Aquellas muestras con un valor del control interno $Ct > 40$ o no detectable, nuevamente se realizará el proceso de extracción y RT-PCR; si la muestra, aun así, no presenta curva de amplificación en ningún canal, deberá ser rechazada como muestra inhibida y se anotará en observaciones: se recomienda coleccionar una nueva muestra.

El analista registra los datos en el protocolo de corrida, anotando en el canal de lectura correspondiente, los valores de Ct de los controles internos y de las muestras que resulten confirmadas.

Este registro es revisado por el profesional responsable de la sección. Se entrega al analista para el ingreso en el sistema informático.

III.4.2. Evaluación de la validez y fiabilidad de la RT-PCR de SARS-CoV-2

La evaluación del desempeño del laboratorio se realizó por el LNR-IVR-IPK. En el contexto de la pandemia se participó en el programa de evaluación externa de la calidad, con el envío de un porcentaje de muestras solicitadas sistemáticamente en diferentes momentos de la pandemia; las que cumplían con los criterios que solicitaba el LNR-IVR-IPK. Los resultados de estas muestras quedaron recogidos en una base de datos de envío de muestras para el control de calidad (Anexo 6).

III.4.3. Contribución de la RT-PCR de SARS-CoV-2 a la vigilancia epidemiológica

Los datos de los casos confirmados para la investigación se obtuvieron por el método de análisis de documentos, y con tal fin se elaboró un modelo de recogida de datos (Anexo 7).

III.4.3.1. Vigilancia espacial prospectiva

Como complemento a la vigilancia epidemiológica se realizó el análisis espaciotemporal de la incidencia de la enfermedad, en un segmento de la serie temporal (septiembre y octubre de 2021), que coincidió con el periodo de mayor registro de casos durante la pandemia en Villa Clara. Los datos de los casos confirmados en el laboratorio se enviaron al Departamento Provincial de Vigilancia en Salud para su análisis e informe al Grupo Temporal Provincial, que retroalimentaba

los resultados al laboratorio. Esto permitió la toma de decisiones necesarias para enfocar la vigilancia microbiológica de forma proactiva.

III.4.4. Vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en la provincia de Villa Clara

Las muestras seleccionadas para los estudios de secuenciación, incluyeron a viajeros procedentes de varios países, pacientes con diferencias en la gravedad clínica, casos de áreas con aumento significativo de enfermos y diversos grupos de edad. Una vez confirmadas mediante RT-PCR en tiempo real, se enviaron al Laboratorio de Referencia de Influenza y Virus Respiratorios, en el Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), donde se realizó la vigilancia genómica. La información obtenida se recogió en un modelo de recogida de datos (Anexo 8).

III.4.5. Análisis filogenético para la identificación de variantes de SARS-CoV-2

La extracción del ARN del SARS-CoV-2 de las muestras clínicas se realizó utilizando el sistema automatizado de purificación de ADN/ARN QIAcube y el Kit QIAamp Viral RNA mini (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante ⁽¹²⁸⁾.

La síntesis de ADNc y la amplificación de un fragmento de 1 836 pb del gen S (posiciones 21 976 a 23 812) se realizaron utilizando el kit comercial One Step RT-PCR (QIAGEN, Alemania), siguiendo también las instrucciones del fabricante. Los cebadores empleados para la RT-PCR se describieron en los protocolos para la secuenciación del SARS-CoV-2 del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta ⁽¹³¹⁾.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit comercial Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start (Beckman Coulter, EE.UU.), con cuatro cebadores que cubren todo el fragmento amplificado del gen S (posiciones 21 976 a 23 812).

Los productos de la secuenciación se purificaron también según las instrucciones del kit DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, U.E) y se analizaron en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQTM8800, utilizando el procedimiento de análisis de datos en bruto para productos de PCR. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron utilizando el programa Sequencher™ Versión 4.10.1 (Genes Codes Corporation, EE. UU.). La secuencia completa de referencia

utilizada fue la Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2). Las mutaciones se identificaron mediante el algoritmo de interpretación CoVsurver: Análisis de Mutaciones de hCoV-19, de la base de datos GISAID (<https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app>).

La designación de variantes de las secuencias de Villa Clara se estableció de acuerdo con el perfil mutacional descrito previamente por la base de datos GISAID, para cada variante conocida.

El Código de identificación de cada secuencia depositada en GISAID se observa en el anexo 9.

Las secuencias se alinearon usando Sequencher TM Versión 4.10.1 (Códigos Genes Corporation, EE. UU.) y se editaron mínimamente con el programa Mega 6. Se infirió la historia evolutiva utilizando el método NJ, basado en el modelo de Tamura-3 parámetros del programa Mega-6, para calcular las distancias evolutivas. La historia evolutiva de las secuencias analizadas se representó por un árbol consenso derivado de 1 000 réplicas ⁽¹³²⁾.

III.5. Operacionalización de las variables.

Variable	Definición	Clasificación	Categoría
RT-PCR CPHEM	Resultado de la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción en el Laboratorio de Biología Molecular, del CPHEM de Villa Clara	Cualitativa nominal dicotómica	Positiva Negativa
RT-PCR LNR-IVR-IPK	Resultado de la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción en el Laboratorio de Referencia de Influenza y Virus Respiratorios, del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kourí, La Habana, Cuba.	Cualitativa nominal dicotómica	Positiva Negativa
Diagnosticadores de RT-PCR	Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción.	Cualitativa nominal politómica	OPS “in house” RIDA-GENE SARS-CoV-2 STAT-NAT COVID-19
Presencia de síntomas	Referido a la presencia o ausencia de síntomas en el paciente.	Cualitativa nominal dicotómica	Asintomático Sintomático

Dianas moleculares	Secuencia de ADN reconocida que se emplea para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2.	Cualitativa nominal dicotómica	Gen E Gen RdRp
Plataformas de extracción	Sistemas automatizados diseñados para aislar y purificar material genético (ADN o ARN) a partir de muestras biológicas.	Cualitativa nominal politómica	QIAcube de 12 QIAcube HT Auto Pure 32 Auto Pure 96
Plataforma de amplificación	Son tecnologías y sistemas utilizados para aumentar la cantidad de material genético (ADN o ARN) a partir de muestras biológicas.	Cualitativa nominal dicotómica	Rotor Gene Q SLAN YGP
Edad	Años cumplidos en el momento del diagnóstico.	Cuantitativa discreta	≤18 19-59 ≥60
Sexo	Biológico.	Cualitativa nominal dicotómica	Femenino Masculino
Síntomas	Manifestación subjetiva de una enfermedad o alteración del estado de salud, percibida exclusivamente por el paciente.	Cualitativa nominal politómica	Fiebre, tos, rinorrea, odinofagia, malestar general, cefalea, disnea, anorexia, náuseas, vómitos, pérdida del gusto y el olfato, diarreas.
Comorbilidades	Cuando en una misma persona ocurren al mismo tiempo varios trastornos o enfermedades o uno después del otro.	Cualitativa nominal politómica	Asma bronquial, hipertensión arterial, diabetes mellitus, cardiopatía, insuficiencia cardíaca, obesidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alcoholismo, tabaquismo, neoplasia, insuficiencia renal crónica.
Clasificación clínica	Estadio clínico en el que se encontraban los pacientes en el momento del diagnóstico.	Cualitativa ordinal	Leve: síntomas respiratorios alto sin neumonía, ni hipoxia. Moderado: neumonía leve sin insuficiencia respiratoria aguda, ni respuesta inflamatoria Grave:

			neumonía con insuficiencia respiratoria aguda o hipercoagulabilidad. Crítico: neumonía con empeoramiento progresivo, síndrome de dificultad respiratoria aguda severo, que requiera ventilación mecánica.
Fallecidos	Muerte resultante de enfermedad clínicamente compatible con un caso probable o confirmado de la COVID-19.	Cualitativa nominal dicotómica	Si No
Meses	Periodo específico de los 12 intervalos en que está dividido el año.	Cualitativa ordinal	Enero, febrero, marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre, diciembre.
Años	Periodo de 12 meses que abarca desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre.	Cuantitativa discreta	2020, 2021, 2022, 2023.
Municipio	Municipio de residencia del paciente.	Cualitativa nominal politómica	Corralillo, Quemado de Güines, Sagua la Grande, Encrucijada, Camajuaní, Remedios, Caibarién, Placetas, Santa Clara, Cifuentes, Ranchuelo, Santo Domingo, Manicaragua.
Variantes genéticas de SARS- CoV-2	Variación en el genoma viral o que pueden incluir una o más mutaciones. Designadas por la OMS	Cualitativa nominal politómica	Variante D614G Variante británica, Alpha, B.1.1.7 Variante sudafricana, Beta, B.1.351 Variante india Delta, B.1.627 Variante botsuana Ómicron B.1.1.529 y

			subvariantes (BA.2, BA.5, BQ.1, XBB.1, XBB.1.15, XBB.1.16, JN1) Otras variantes (patrón mutacional (4) 614 + 677, patrón mutacional (3) 614+732, B.1.623 (494+501+614+681) , variante californiana épsilon (B.1.427/B.1.429).
Ciclo umbral (Ct)	Número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia generada por la amplificación del ADN supere un nivel de detección predeterminado (umbral de fluorescencia)	Cuantitativa discreta	
Mutaciones con efectos biológicos potenciales	Cambios en el genoma, con implicaciones fenotípicas respecto al aislado de referencia. Transmisibilidad, gravedad, interferencias con pruebas diagnósticas, susceptibilidad reducida a las terapias y disminución significativa del efecto de anticuerpos neutralizantes.	Cualitativa nominal politómica	D614G, N501Y, P681H, E484K, L452R, T478K, K417N, N440K.
Subgrupos	Grupos más pequeños dentro de la totalidad de los casos estudiados, que se forman de manera natural, a partir de las variables seleccionadas (mutaciones con efectos biológicos potenciales). Obtenidos en el marco del estudio como resultados de la aplicación de la técnica de conglomerado en dos fases.	Cualitativa nominal politómica	Subgrupo 1, Subgrupo 2, Subgrupo 3

III.6. Procesamiento y análisis de los datos

Los datos correspondientes a cada variable se introdujeron en ficheros y se procesaron utilizando los programas: SPSS, versión 22.0 para Windows, EPIDAT, en las versiones 3.1 y 4.2 y el Microsoft Excel versión 2016.

La evaluación del desempeño de la RT-PCR, como prueba diagnóstica en el CPHEM, con relación a la RT-PCR en el LNR-IVR-IPK, como prueba de referencia, se hizo determinando los indicadores de desempeño analítico como: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de Youden, cocientes de probabilidad positivos y cocientes de probabilidad negativos y entre los indicadores de concordancia diagnóstica: el índice de Kappa de Cohen y test estadístico de W de Kendall.

El índice de Youden se obtuvo como medidas conjuntas de la eficacia de la prueba y puede oscilar entre -1 y 1; los valores más altos indican mayor capacidad diagnóstica. Los cocientes de probabilidad positivos y negativos, permitieron clasificar la potencia de la prueba, según la escala que se muestra a continuación.

Tabla 4. Clasificación de la potencia de la prueba según los valores de los cocientes de probabilidades.

CPP	CPN	Valor de la prueba
>10	<0,1	Prueba muy potente
5-10	0,1-0,2	Prueba poco potente
2-5	0,2-0,5	Prueba de aportación dudosa
1-2	0,5-1	Prueba sin utilidad diagnóstica

Fuente: Molina M, Ochoa C. Evaluación de la validez de las pruebas diagnósticas (III) ⁽¹¹³⁾.

En función de la interpretación del resultado del cociente de probabilidad negativo, se calculó el inverso de su valor (1/CPN).

El Nomograma de Fagan se usó para determinar la probabilidad posprueba; este se representa en tres líneas verticales, de izquierda a derecha, la probabilidad preprueba (se representa invertida), el cociente de probabilidades y la probabilidad posprueba resultante. Utilizando una calculadora on-line diseñada por Alan Schwartz y disponible gratuitamente en: <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>

La determinación de los indicadores básicos de la prueba, se particularizó según los diagnosticadores empleados y la presencia o no de síntomas. Además, se aplicó indistintamente al desempeño de las dianas moleculares (Gen E y Gen RdRp) utilizadas para la detección de SARS-CoV-2.

La concordancia de los resultados se determinó usando el índice de Kappa de Cohen, que pone a prueba la hipótesis nula (H_0), de que el valor de Kappa es igual a

O ó que los resultados de las observaciones son por el azar. Se obtuvo un estadígrafo Z con su significación (p) asociada. Se trabajó con un 95% (de confiabilidad; de manera que si $\alpha > 0,05$; se acepta H_0 ; de lo contrario se rechaza.

Si el valor del índice es positivo, indica mayor concordancia observada que los esperados por azar, y si es negativo expresa discordancia. La interpretación de la fuerza de concordancia a partir de los valores positivos, se resume a continuación.

Tabla 5. Clasificación de la fuerza de concordancia del Índice de Kappa de Cohen.

Valor	Fuerza de concordancia
< 0,20	Mala
0,21-0,40	Ligera
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
0,81-1,00	Excelente

Fuente: C. Ochoa Sangrador, G. Orejas. Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas ⁽¹¹⁰⁾.

El análisis de concordancia de los valores de ciclo umbral entre los resultados de la RT-PCR del LNR-IVR-IPK y el LBM del CPHEM, se realizó con la aplicación del test estadístico de W de Kendall; utilizado también para el análisis entre las dianas moleculares empleadas en el LBM del CPHEM (Gen E y Gen RdRp).

El valor de W oscila entre 0 y 1, en la medida que se acerca a 1, mayor es la concordancia. La hipótesis nula H_0 plantea que no existe concordancia $W=0$. Se trabajó con un nivel de confiabilidad de 95%, $\alpha=0,05$, de manera que si $p > \alpha$, se rechaza H_0 y se asume la alternativa.

Como medidas de resumen para variables cualitativas se hizo uso de frecuencias absolutas y relativas (porcentaje) y para variables cuantitativas, medidas de tendencia central (mediana), y de dispersión (mínimo, máximo, cuartiles y rango intercuartil). Para la selección de la mediana como medida de tendencia central, se probó previamente la distribución normal de los datos (Prueba de Shapiro Will).

Se aplicó la Prueba de Kruskal Wallis, la Hipótesis nula (H_0) de este test plantea la igualdad entre las medianas. La prueba devolvió un estadígrafo y su probabilidad (p) asociada. Se trabajó con un nivel de confiabilidad de 95%, $\alpha=0,05$, de manera que si $p > \alpha$, se aceptó H_0 , de lo contrario se rechazó.

Se empleó la técnica de Kulldorff para detectar conglomerados de altas tasas de incidencia de COVID-19 y su ubicación geográfica. En la ejecución de la técnica se utilizó el programa SaTScan versión 10.1, se aportaron los insumos que requiere el programa: coordenadas de los municipios que son las unidades geográficas en las que se hace el análisis, población total de cada unidad geográfica, y conteo de casos confirmados de COVID-19 en cada una de ellas.

Se eligió la opción de análisis: conglomerados prospectivos espaciotemporales y el modelo de distribución Poisson, con una frecuencia diaria de observación. Se realizaron tres cortes con periodicidad quincenal (30/9/2021, 15/10/2021 y 30/10/2021).

Las coordenadas cartesianas de cada municipio se tomaron del MapInfo 7.5, el mismo programa con el que posteriormente se realizaron las representaciones cartográficas de los resultados.

En cada conglomerado resultante del análisis, se obtienen los estadígrafos siguientes: casos observados, casos esperados, tasa de incidencia, riesgo relativo (RR) y un único valor de significación (p) que indica el orden de prioridad de los conglomerados obtenidos.

La hipótesis nula (H_0) establece que el riesgo de COVID-19 se mantiene constante en todo el territorio, la hipótesis alternativa plantea que el riesgo de enfermar por COVID-19 no es constante, y su intensidad en el área geográfica del conglomerado no es proporcional al tamaño de la población en riesgo, considerándolo conglomerado «activo». Se trabajó con una confiabilidad de 95% ($\alpha=0,05$), de manera que si $p>0,05$ se aceptó H_0 , de lo contrario se rechazó.

La independencia entre variables, se probó realizando la Prueba de independencia basada en la distribución Chi cuadrado, con la hipótesis nula (H_0) de que existe independencia (no existe relación). Ante las limitaciones de la prueba se tomó el resultado de la prueba exacta de Fisher, que devuelve una probabilidad (p). Se trabajó con una confiabilidad de 95% ($\alpha=0,05$), de manera que si $p>0,05$ se aceptó H_0 , de lo contrario se rechazó.

El análisis de conglomerados en dos fases o clústeres bietápicos, se aplicó para identificar la existencia de subgrupos naturales o clústeres en la población estudiada;

estos subgrupos difieren entre sí, pero tienen características similares dentro de ellos. Se incluyeron como variables cualitativas ocho mutaciones con efectos biológicos potenciales y se optó por una selección automática del número de clústeres; se obtuvo como resultado la distribución y perfiles de clústeres. El programa mostró una medida de silueta de la cohesión y separación como indicador de calidad (Anexo 10).

Los resultados del estudio se presentaron en texto, tablas y figuras (árbol filogenético, diagramas, gráficos de pastel, gráficos de cajas y bigotes y gráficos de secuencias).

III.7. Consideraciones éticas

La investigación es una tarea del proyecto sectorial (código: 2105017) coordinado por el IPK: “Fortalecimiento y Desarrollo del Diagnóstico Molecular en Cuba”.

El estudio se fundamenta en los principios éticos esenciales aprobados por el Comité de Ética de la Institución con código 06-22-22. Se garantizó la transparencia y ausencia de sesgos en la metodología para obtener resultados fiables, los que contribuyeron al bienestar social, se facilitó el acceso equitativo a avances en el diagnóstico.

El director del CPHEM de Villa Clara y el jefe de departamento de estadística provincial, aprobaron la utilización de la información contenida en los registros digitales de resultados del laboratorio por previa presentación de una carta de solicitud oficial por parte del LBM. La información obtenida de los pacientes fue anónima, confidencial y solo utilizada con fines investigativo (Anexo 11).

RESULTADOS

IV. Resultados

Indicadores de desempeño diagnóstico de la RT-PCR en muestras procesadas por el LBM de Villa Clara, marzo de 2020 y mayo de 2023

La tabla 6 y figura 3 ilustran los resultados de las muestras de exudado nasofaríngeo procesadas para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, en el LBM-CPHEM de Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK. Estas muestras se enviaron para control de calidad, lo que permitió determinar su concordancia. Se confirmaron 359 muestras positivas, siete falsas negativas, 80 negativas y una falsa positiva; 366 muestras representan una prevalencia de 81,88% de los casos estudiados. Los resultados exhibieron un índice de Kappa de 0,9414, mostrando una excelente concordancia.

Tabla 6. Resultados RT-PCR en el LBM-CPHEM de Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK.

RT-PCR (LBM-CPHEM)	RT-PCR (LNR-IVR-IPK)		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	359	1	360
Negativo	7	80	87
Total	366	81	447

Índice de Kappa de Cohen=0,9414Z=19,9223 p=0,000
Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

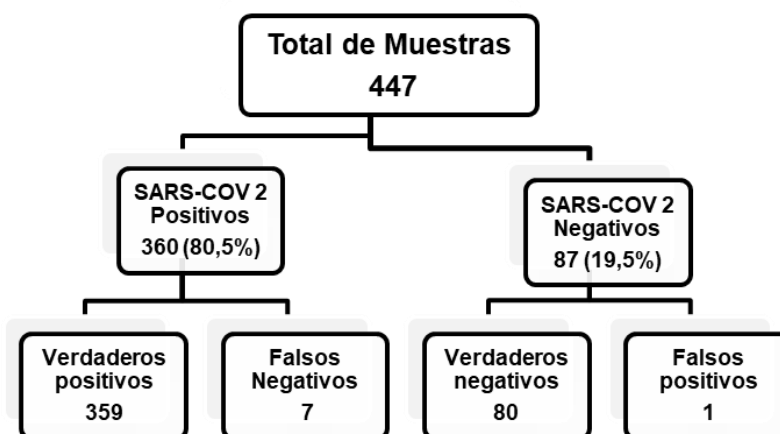


Figura 3. Diagrama de flujo de la RT-PCR en el LBM-CPHEM de Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK.

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

En la tabla 7 se observan los indicadores de validez en la evaluación del rendimiento de la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 implementada en el LBM-CPHEM de Villa Clara, se muestran valores de sensibilidad de 98,09% y la especificidad de 98,77%. Es de señalar que el 99,72% de los pacientes que tuvieron una prueba positiva presentaron la enfermedad y que el 91,95% de los pacientes con una prueba negativa eran sanos. El índice de Youden fue de 0,97, y evidenció el alto valor diagnóstico de la prueba. La potencia se examinó al evaluar los cocientes de probabilidad positivo 79,45 y negativo 0,02. Estos valores demuestran que la prueba es muy potente.

Tabla 7. Indicadores de validez de la RT-PCR para el diagnóstico de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

Indicadores de validez de la RT-PCR (LBM-CPHEM)	Valor	Intervalo de confianza (95%)	
		Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad	98,09	96,55	99,63
Especificidad	98,77	95,74	100
Valor predictivo para una prueba positiva	99,72	99,04	100
Valor predictivo para una prueba negativa	91,95	85,66	98,24
Índice de Youden	0,97	-	-
Cociente de probabilidad positivo	79,45	-	-
Cociente probabilidad negativo	0,02	-	-

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

En la figura 4 se ilustra el nomograma de Fagan que permite visualizar la probabilidad de que un paciente sea realmente positivo a la COVID-19. A partir de una probabilidad preprueba de 81,88%, cuando se aplica la técnica de RT-PCR, asciende hasta el 99,72%. La probabilidad de que un paciente sea falso negativo es de 8,05%.

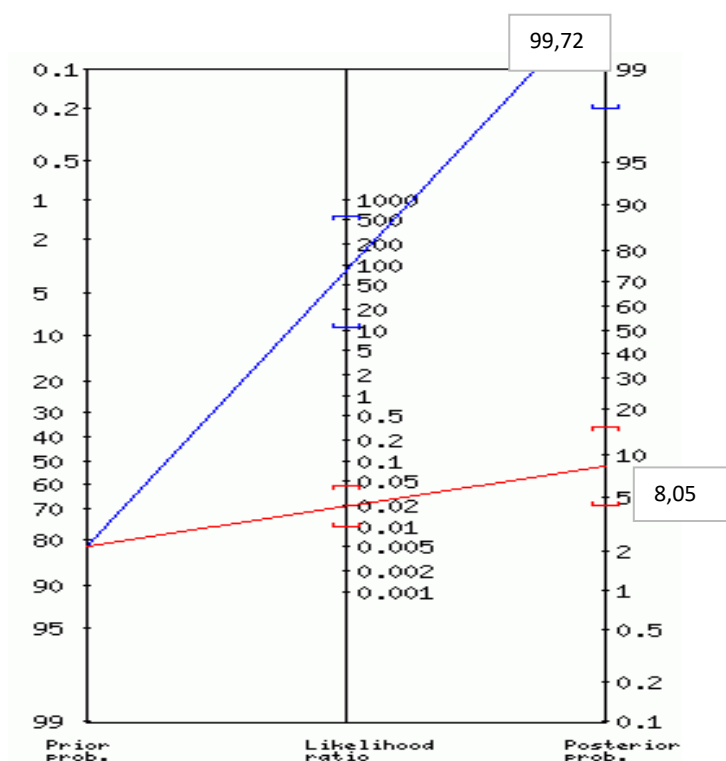


Figura 4. Probabilidad posprueba de la RT-PCR para detección del SARS-CoV-2 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

En la tabla 8 se presenta la evaluación de los indicadores de validez en los diagnosticadores utilizados. Se analiza el resultado del procesamiento de las muestras con tres sistemas de RT PCR: OPS in house (116 muestras), RIDA-GENE SARS-CoV-2(196) y STAT-NAT COVID-19(135).

Tabla 8.Indicadores de validez en los diagnosticadores de la RT-PCR LBM-CPHEM Villa Clara.

Indicadores de validez de la RT-PCR (LBM-CPHEM)	Diagnosticador de RT-PCR		
	OPS <u>in house</u>	RIDA-GENE SARS-CoV-2	STAT-NAT COVID-19
Número	116	196	135
Sensibilidad	90,57	98,94	100
Especificidad	98,41	100	100
Valor predictivo para una prueba positiva	97,96	100	100
Valor predictivo para una prueba negativa	92,54	80	100

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

Se observó que todos los diagnosticadores presentaron valores de sensibilidad y especificidad por encima del 90%: STAT-NAT COVID-19, con valores de sensibilidad

y especificidad de 100%, RIDA-GENE SARS-CoV-2 sensibilidad de 98,94% y una especificidad de 100%. El desempeño más bajo se obtuvo con el OPS in house que mostró una la sensibilidad de 90,57%, y una especificidad de 98,41%. Los valores predictivos más altos se encontraron con el STAT-NAT COVID-19 (VPP 100%, VPN 100%), y el valor predictivo negativo más bajo con el RIDA-GENE SARS-CoV-2(VPN: 80%).

La tabla 9 muestra la concordancia de los resultados entre los diagnosticadores empleados en la RT-PCR en el LBM-CPHEM de Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK. Se observa que el índice de Kappa de Cohen fue para OPS in house de 0,8951; para el RIDA-GENE SARS-CoV-2 de 0,8836 y para STAT-NAT COVID-19 de 1,0000.

Tabla 9. Concordancia de los diagnosticadores empleados en la RT-PCR LBM-CPHEM y el LNR-IVR-IPK.

Estuche de RT-PCR	RT-PCR (LBM CPHEM –LNR-IVR-IPK)		
	Índice de Kappa de Cohen	Valor de Z	p
OPS <u>in house</u>	0,8951	9,6647	0,000
RIDA-GENE SARS-CoV-2	0,8836	12,4552	0,000
STAT-NAT COVID-19	1,0000	11,6190	0,000

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

Los indicadores de validez de la RT-PCR en muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos se describen en la tabla 10.

Tabla 10.Indicadores de validez de la RT-PCR para el diagnóstico de la COVID-19 en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Indicadores de validez del RT-PCR (LBM-CPHEM)	Presencia de síntomas	
	Sintomáticos	Asintomáticos
Número	297	150
Sensibilidad (%)	99,27	94,62
Especificidad	95,83	100
Valor predictivo para una prueba positiva	99,63	100
Valor predictivo para una prueba negativa	92,00	91,94

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

En la detección de pacientes sintomáticos se evidencia una sensibilidad de 99,27% y una especificidad de 95,83%. En los pacientes asintomáticos la sensibilidad fue de un 94,62% y la especificidad de un 100%. En ambos casos disminuyó el valor predictivo negativo de la prueba, sintomáticos 92% y asintomáticos 91,94%.

En la tabla 11 se presenta la concordancia de los resultados entre la RT-PCR del LBM-CPHEM de Villa Clara y los del LNR-IVR-IPK en pacientes sintomáticos y asintomáticos, donde se observa que el índice de Kappa de Cohen en sintomáticos fue 0,9333 y en asintomáticos 0,9304.

Tabla 11. Concordancia de la RT-PCR en el LBM-CPHEM y en el LNR-IVR-IPK del IPK entre pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Presentación de síntomas	RT-PCR (LBM CPHEM – LNR-IVR-IPK)		
	Índice de Kappa de Cohen	Valor de Z	p
Sintomáticos	0,9333	16,0877	0,000
Asintomáticos	0,9304	11,4232	0,000

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

Los indicadores de validez de la RT-PCR empleando el gen E y el gen RdRp (Tabla 12), muestran que en ambas dianas moleculares la sensibilidad tiene un valor superior a 98%, y que la menor especificidad 97,53% se relacionó con el gen E. En ambos casos disminuyó el valor predictivo negativo de la prueba, gen E 94,05 % y gen RdRp 91,95%.

Tabla 12. Indicadores de validez de la RT-PCR para el diagnóstico de COVID-19 mediante la detección de dos dianas moleculares.

Indicadores de validez del RT-PCR (LBM-CPHEM)	Gen E	Gen RdRp
Sensibilidad	98,63	98,09
Especificidad	97,53	98,77
Valor predictivo para una prueba positiva	99,45	99,72
Valor predictivo para una prueba negativa	94,05	91,95

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

La tabla 13 se observa la concordancia de los resultados de la RT-PCR en el LBM-CPHEM de Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK entre las dianas moleculares utilizadas. El índice de Kappa de Cohen para el gen E es de 0,9480 y para el gen RdRp es de 0,9414.

Tabla 13. Concordancia de la RT-PCR entre gen E y RdRp en el LBM-CPHEM y el LNR-IVR-IPK.

Dianas moleculares	RT-PCR (LBM CPHEM – LNR-IVR-IPK)		
	Índice de Kappa de Cohen	Valor de Z	p
Gen E	0,9480	20,0475	0,000
Gen RdRp	0,9414	19,9223	0,000

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

Al analizar las diferencias entre los valores de ciclo umbral, obtenidas en el LBM-CPHEM Villa Clara y en el LNR-IVR-IPK (Tabla 14), se constató que el 69,36% de los casos presentaron una diferencia menor de 2 ciclos y el 30,64% tuvieron diferencia mayor de 3 ciclos. Mediante la prueba estadística (W de Kendall=0,900 p=0,000) se comprobó que existe concordancia entre los valores de ciclo umbral de ambas RT-PCR, con independencia del laboratorio donde se realizó la prueba.

Tabla 14. Diferencia entre los valores del ciclo umbral en el LBM-CPHEM y el LNR.

Diferencia entre los valores del ciclo umbral (LBM CPHEM – LNR-IVR-IPK)	Número	%	% acumulado
0 ciclo	69	19,22	19,22
1 ciclo	87	24,23	43,45
2 ciclos	93	25,91	69,36
3 ciclos y más	110	30,64	100

W de Kendall=0,900 p=0,000

Fuente: Registro de muestras enviadas a control de calidad.

La tabla 15 muestra las diferencias de los valores del ciclo umbral entre el gen E y el gen RdRp en el LBM-CPHEM de Villa Clara. Se constató que no existió diferencia entre los valores de ciclo umbral en 300 muestras (83,33%); y estadísticamente se demostró que existe concordancia entre los resultados de los ciclos de gen E-RdRp (W de Kendall=0,962; p=0,000).

Tabla 15. Diferencia entre los valores del ciclo umbral del gen E y RdRp.

Diferencia entre los valores del ciclo umbral (Gen E-RdRp)	Número	%	% acumulado
0 ciclo	300	83,33	83,33
1 ciclo	24	6,67	90,00
2 ciclos	12	3,33	93,33
3 ciclos y más	24	6,67	100

W de Kendall=0,962 p=0,000

Fuente: Base de datos de envío de muestras a control de calidad.

Relación entre los resultados del diagnóstico molecular y las variables clínico-epidemiológica para definir patrones en la vigilancia integrada frente a la pandemia de COVID-19 en Villa Clara

En la tabla 16 se resumen los casos confirmados en el laboratorio entre 11 de marzo de 2020 y 5 de mayo de 2023, (fechas de inicio y fin de la pandemia por la OMS). Se observó que desde finales de diciembre de 2020 comenzó el incremento de casos. El año 2021 acumuló el mayor número de casos positivos en Villa Clara. Se diagnosticaron 51 710 (85,98%) casos; alcanzando su pico máximo en el mes de septiembre. Le sigue el año 2022 con 7 764 (12,91%) y destacan los meses de enero y marzo con mayor incidencia de casos. En el 2023 se identificaron 115 casos. En la figura 5 se observa la distribución por meses

Tabla 16. Confirmados de COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara, 2020-2023.

Años	Número de casos	%	% acumulado
2020	552	0,92	0,92
2021	51 710	85,98	86,90
2022	7 764	12,91	99,81
2023	115	0,19	100
Total	60 141	100	

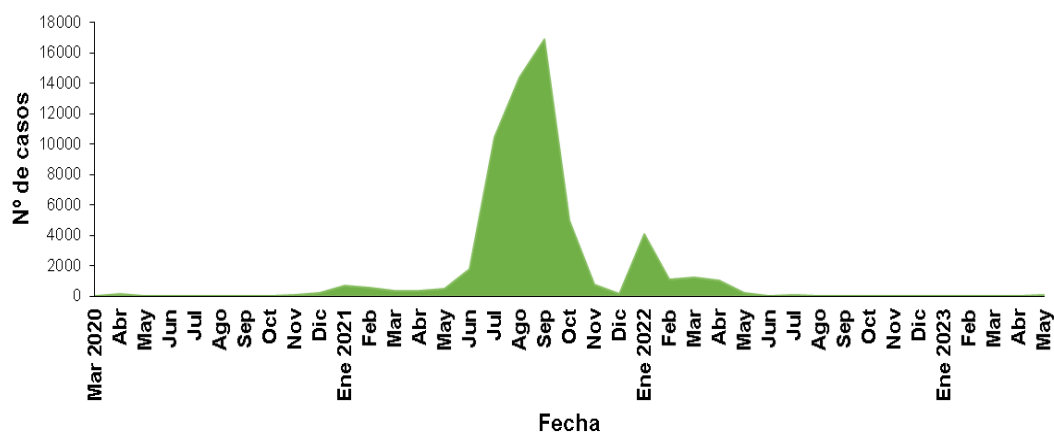


Figura 5. Número de casos confirmados en el LBM-CPHEM de Villa Clara por meses.

Fuente: Registro de casos confirmados.

Para la purificación de los ácidos nucleicos utilizados en la RT-PCR, se emplearon diferentes estuches y plataformas (figura 6).

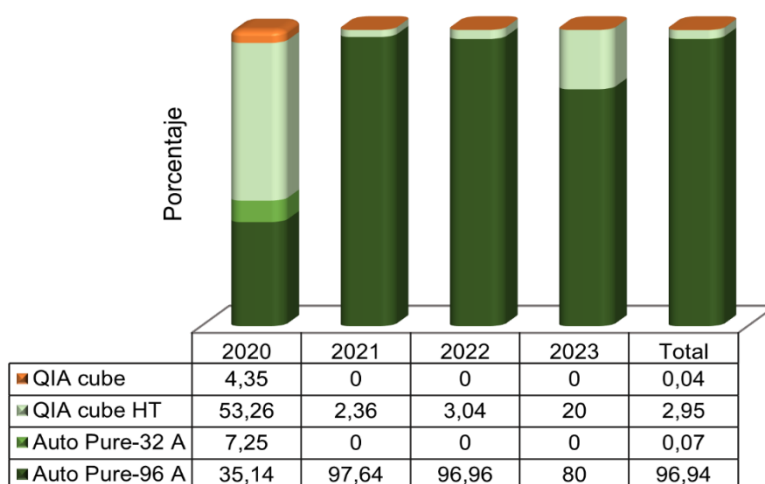


Figura 6. Plataformas utilizadas en la extracción de ácidos nucleicos en los casos confirmados por años.

Al inicio de 2020 se utilizó el sistema QIA cube y se confirman 24 casos (4,35%), Durante el segundo semestre de ese año se introdujeron otras tecnologías de extracción: QIA cube HT, Auto Pure-32 y AutoPure-96, diagnosticándose 294 (53,26%), 40 (7,25%) y 194 (35,14%) casos con cada estuche, respectivamente. A partir del año 2021 se continuó trabajando mayoritariamente con la plataforma Auto Pure-96 y se confirmaron 50488 casos (97,64%). En los años 2022 y 2023 el diagnostico de casos fue de 7 528 (96,96%) y 92 (80%), respectivamente. En el

96,94% de los individuos confirmados durante toda la pandemia en Villa Clara se empleó la plataforma Auto Pure-96.

En la figura 7 se muestran las plataformas de amplificación de ácidos nucleicos empleadas en la confirmación de los casos por años. Desde el inicio de la pandemia en el 2020, se trabajó con la plataforma Rotor Gene Q de QIAGEN, con la que se confirmaron 354 (64,13%) casos. En este propio año se introdujo la plataforma de amplificación SLAN-YGP y se confirmaron 198 (35,87%) de los casos. En 2021 se confirmaron 47 712 (92,27%) con la plataforma Rotor Gene Q de QIAGEN. En 2022 se mantuvo la plataforma Rotor Gene Q de QIAGEN con 7153 (92,13%) casos, el mayor número de confirmados. En 2023 la plataforma SLAN-YPG confirmó 79 (68,70%) muestras del total. En el 91,88% de los confirmados durante toda la pandemia en Villa Clara se empleó la plataforma Rotor Gene Q de QIAGEN.

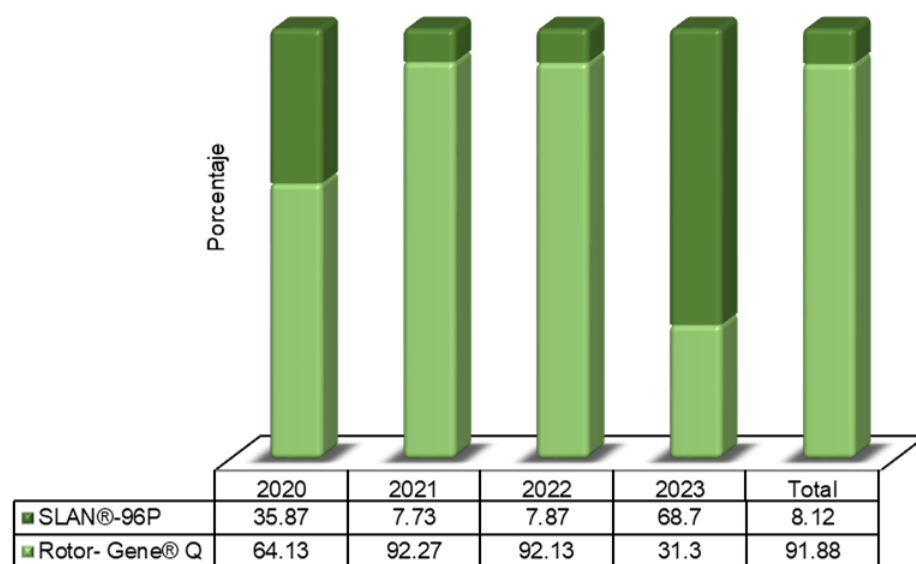


Figura 7.Plataformas utilizadas en la amplificación de los ácidos nucleicos 2020-2023.

La edad y el sexo de los casos confirmados durante la pandemia se muestran en la figura 8. Los menores de 18 años representaron el 18,90% (11 367casos) entre 19 y 59 años el 61,19% (36 803 casos) y con 60 años y más el 19,90% (11 971 casos). Predominó el sexo femenino con 31 842 casos (52,95%).

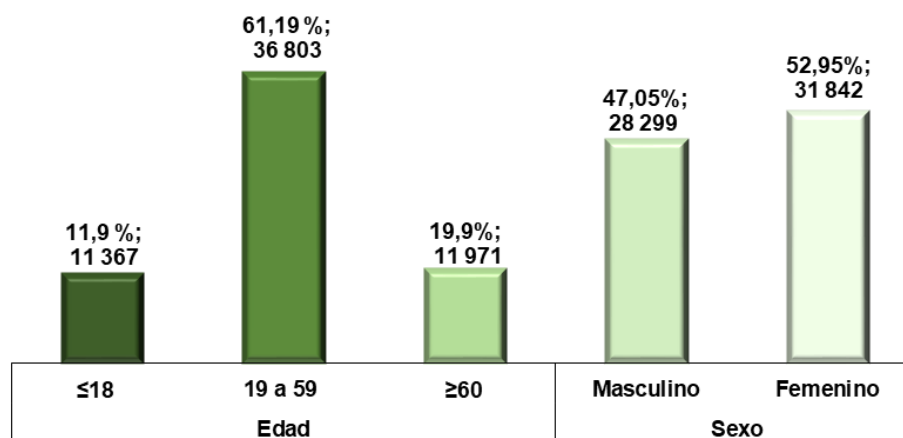


Figura 8. Edad y sexo de casos confirmados de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

Fuente: Registro de casos confirmados.

La figura 9 muestra los casos confirmados, sintomáticos y asintomáticos que representaron 85,67% (51 523 casos) y 14,83% (8 618 casos), respectivamente.

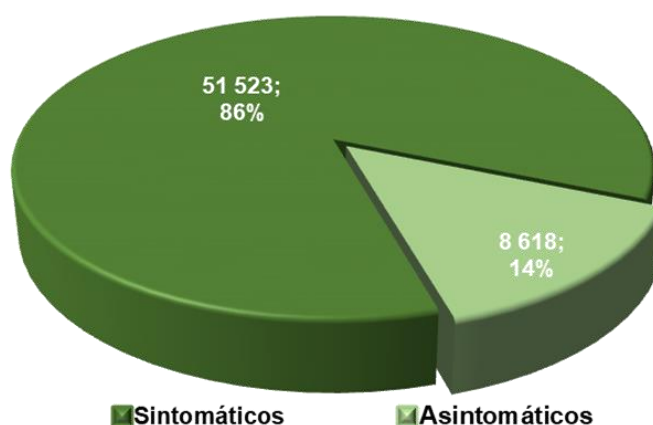


Figura 9. Casos confirmados asintomáticos y sintomáticos de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

Fuente: Registro de casos confirmados.

En la figura 10 se describen los principales síntomas y signos que presentaron los pacientes confirmados. Destacan la fiebre (31 643 casos 52,61%), seguido de la tos (28 493 casos; 47,38%) y la rinorrea (20 166 casos; 33,53%). La pérdida del gusto (8 680; 14,43%), el malestar general (8 413; 13,99%), la odinofagia (7 859; 13,07%), la anorexia (7 794; 12,96%), la pérdida del olfato (7 610; 12,65%) y la disnea (6 085; 10,12%) fueron menos frecuentes.

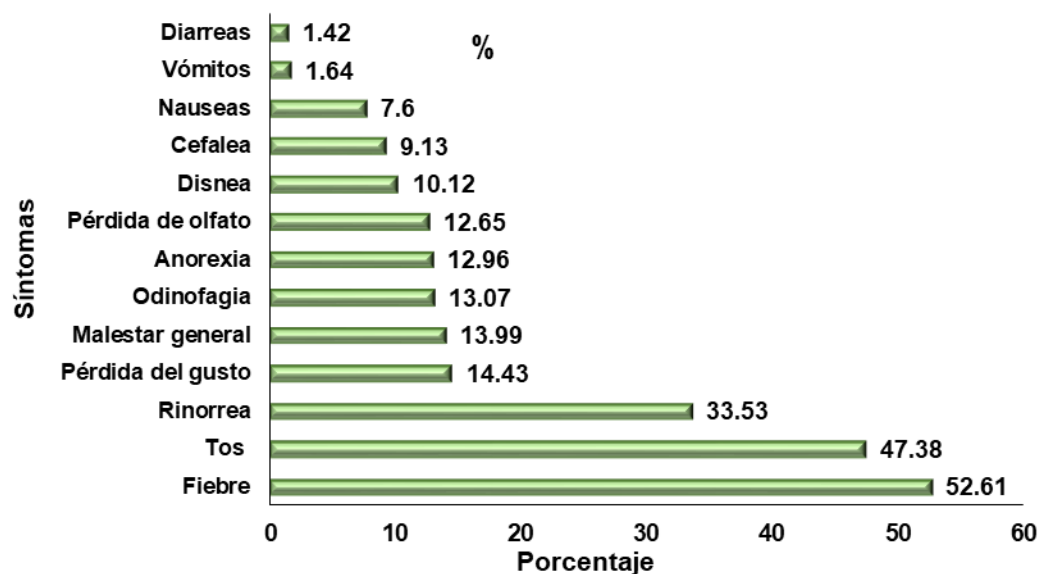


Figura 10. Porcentaje de síntomas y signos en casos confirmados de COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

*Porcentaje calculado con relación a N. Fuente: Registro de casos confirmados.

En la figura 11 aparecen las comorbilidades más frecuentes entre los pacientes confirmados. Estas fueron la hipertensión arterial (1484; 2,47%), la diabetes mellitus (1 414; 2,35%), el asma bronquial (299; 0,50%) y la cardiopatía isquémica (170; 0,28%)

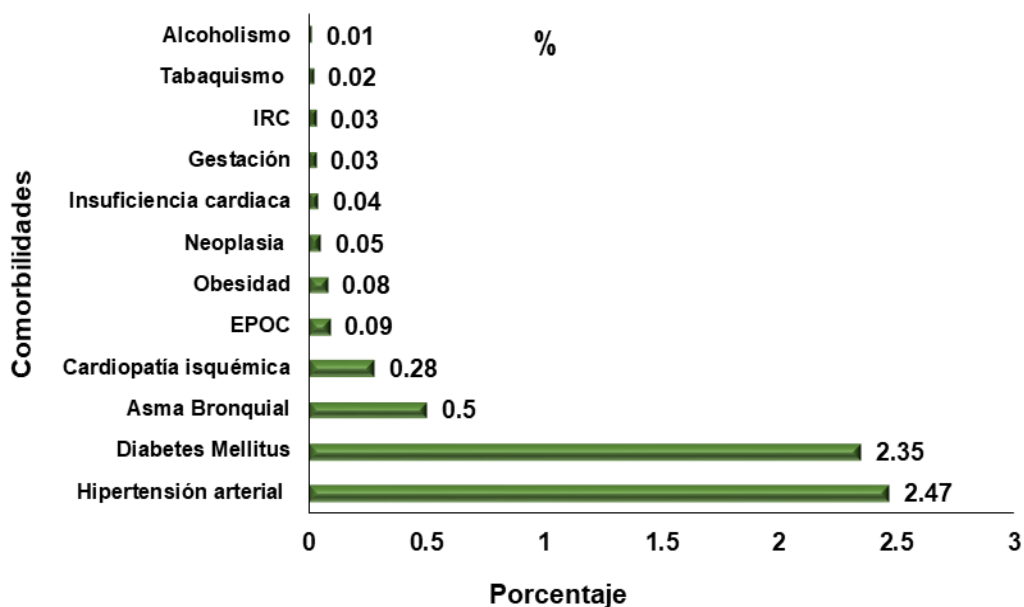


Figura 11. Comorbilidades en casos confirmados de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

*Porcentaje calculado con relación a N.

Fuente: Registro de casos confirmados.

La clasificación clínica de los pacientes en el momento del diagnóstico se presenta en la tabla 17. Se observa que, del total de los casos confirmados, 54 225 se reportaron como leves (90,16%), 5 359 moderados (8,91%), 313 críticos (0,52%) y 2444 graves (0,41%).

Tabla 17. Clasificación clínica de los casos confirmados de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara.

Clasificación clínica	Número	%
Leve	54 225	90,16
Moderado	5 359	8,91
Grave	244	0,41
Crítico	313	0,52
Total	60 141	100

Fuente: Registro de casos confirmados.

Tabla 18. Análisis espacial prospectivo en la vigilancia de COVID-19 en Villa Clara.

Fecha de análisis	Clúster	Características del clúster								Tasa de incidencia* (Villa Clara)
		Unidades espaciales (municipios)	Periodo (días)	Población	Casos observados	Casos esperados	Tasa de incidencia *	Riesgo Relativo	p	
30/9/2021	1	Encrucijada- Camajuaní- Caibarién-Remedios- Placetas	24-30/9/2021	240488	1855	1218	110,19	1,67	0,000	72,38
	2	Santo Domingo	26-30/9/2021	47907	227	173	94,77	1,32	0,006	
	3	Ranchuelo	29-30/9/2021	51861	105	75	101,23	1,4	0,055	
	4	Manicaragua	28-30/9/2021	62781	162	136	86,01	1,11	0,644	
15/10/2021	1	Encrucijada-Cifuentes	9-15/10/2021	58549	244	116	59,53	2,19	0,000	28,38
	2	Quemado de Güines	11-15/10/2021	20797	57	30	54,82	1,95	0,000	
	3	Manicaragua	9-15/10/2021	62781	164	125	37,32	1,33	0,046	
	4	Caibarién-Remedios	9-15/10/2021	84016	204	167	34,69	1,24	0,198	
30/10/2021	1	Quemado de Güines	25-30/10/2021	20797	46	17	36,86	2,70	0,000	13,91
	2	Remedios	24-30/10/2021	43343	83	42	27,36	2,02	0,000	
	3	Encrucijada	25-30/10/2021	31983	38	27	19,80	1,43	0,677	
	4	Placetas	30/10/2021	66367	14	9	21,09	1,52	0,974	

Fuente: registro de casos confirmados.

*Por cada 100 000 habitantes

El 30 de septiembre de 2021 se detectó un conglomerado activo emergente ($p=0,000$) de alta incidencia de la COVID-19, desde el 24 hasta el 30 de septiembre y que incluyó los municipios de Encrucijada, Camajuaní, Caibarién, Remedios y Placetas. Se analizaron 1 855 casos observados para una tasa de incidencia promedio diaria de 110,19 por cada 100000 habitantes, con un Riesgo Relativo (RR) 1,67 veces mayor que el resto del territorio (Tabla 18). El mapeo de este conglomerado se observa en la figura 12. El segundo conglomerado se limitó al municipio de Santo Domingo entre los días 26 y 30 de septiembre, con un nivel de significación estadística de $p=0,006$. En esa misma fecha se identificó un conglomerado no significativo (Manicaragua).

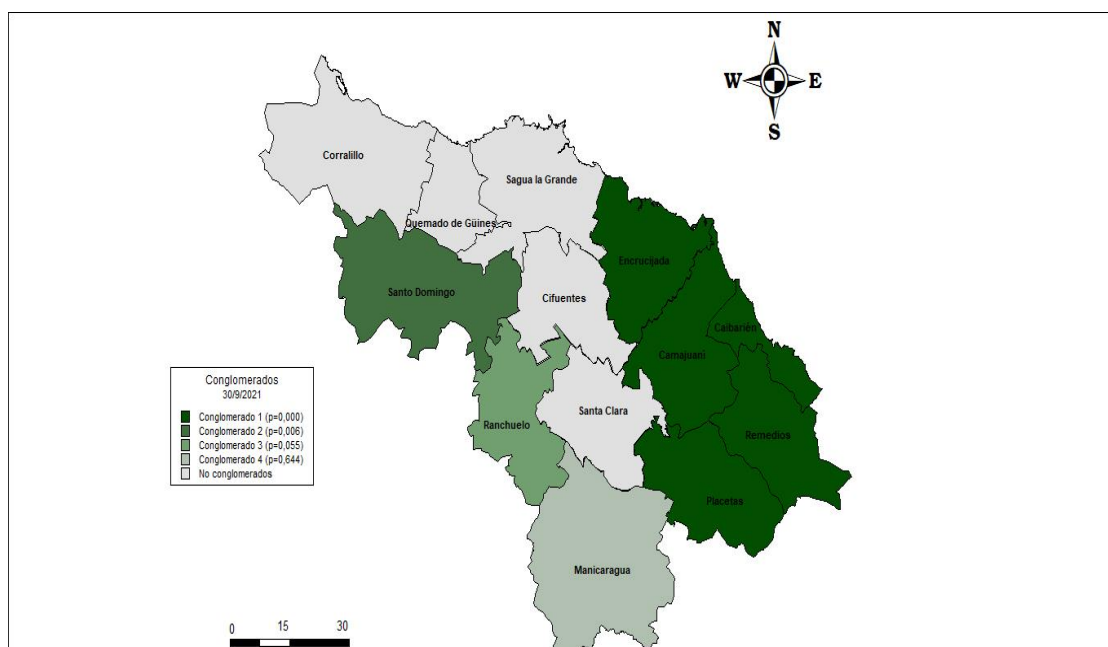


Figura 12. Análisis de la vigilancia prospectiva espaciotemporal del 30 de septiembre 2021.

En el análisis realizado 15 días después, se detectó que el municipio de Encrucijada mantuvo el riesgo, y formó un conglomerado con el municipio de Cifuentes entre los días del nueve al 15 de octubre. La tasa de incidencia fue de 59,53 ($p=0,000$). Durante ese periodo también emergió el municipio Quemado de Güines ($p= 0,000$) con 57 casos observados, una tasa de incidencia promedio diaria de 54,82 y un

RR=1,95 veces mayor que el resto del territorio (Tabla 18). Se puede observar su mapeo en la figura 13.

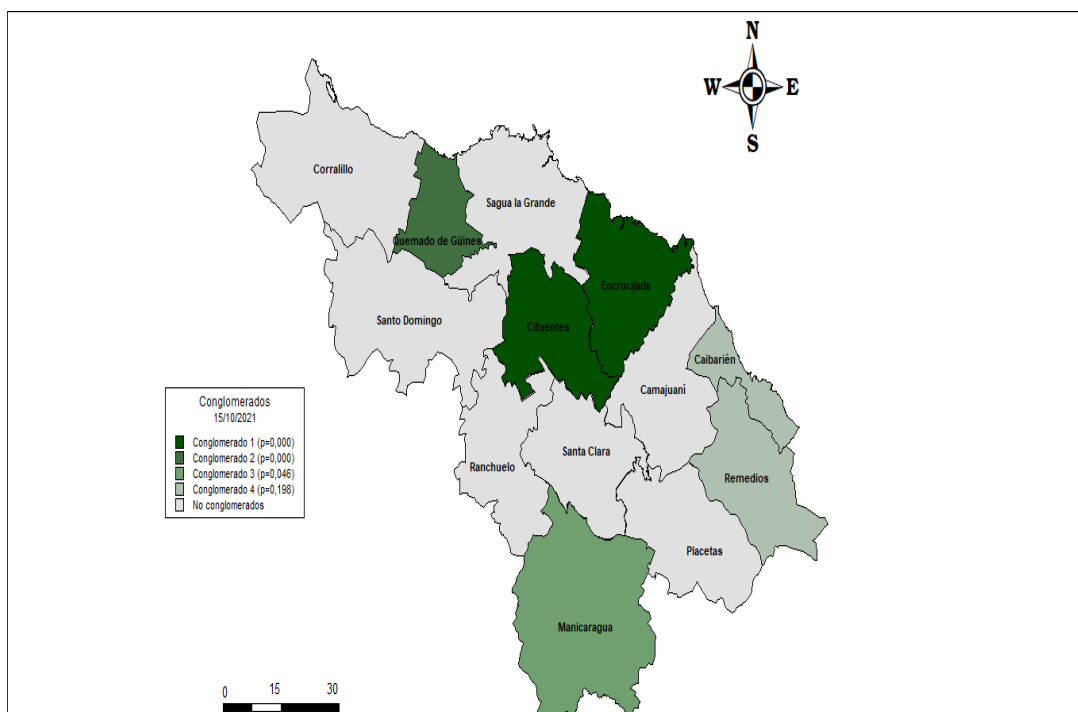


Figura 13. Análisis de la vigilancia prospectiva espaciotemporal del 15 de octubre de 2021.

Con el tercer corte, realizado el 30 de octubre, se evidenció que el conglomerado de Quemado de Güines se mantuvo activo ($p=0,000$) (Tabla 18). El municipio Encrucijada modificó la dinámica de riesgo, con una tendencia a la disminución, ya que pasó a ser un conglomerado sin significación estadística ($p=0,677$). El municipio de Remedios modificó su patrón de riesgo, con un RR=2,02 veces mayor que el resto del territorio y un nivel de significación de $p=0,000$. Se puede observar la representación cartográfica en la figura 14.

En la tabla 18 se observa, de manera general, que, a partir del pico de casos de septiembre, disminuyó la tasa de incidencia en la provincia. El 30 de septiembre la tasa fue 72,38 por cada 100000 habitantes, el 15 de octubre fue de 28,38 por cada 100000 habitantes y el 30 de octubre la tasa se redujo a 3,91 por cada 100000 habitantes.

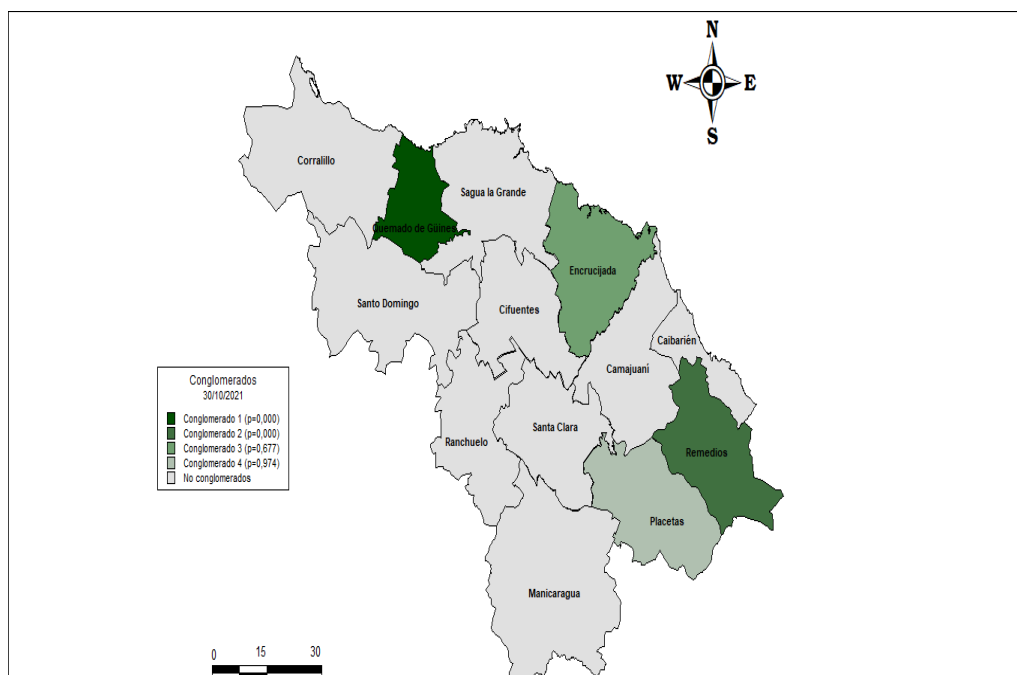


Figura 14. Análisis de la vigilancia prospectiva espaciotemporal del 30 de octubre de 2021.

Frecuencia y distribución temporal de variantes genómicas, linajes y mutaciones clave en la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 para casos confirmados en el LBM de Villa Clara

La figura 15 (A y B) muestra la circulación de las distintas variantes de SARS- CoV- 2 en la provincia de Villa Clara, en relación con la incidencia de casos y las defunciones.

La primera variante de SARS-CoV-2 que circuló en Villa Clara fue D614G, entre diciembre de 2020 y abril de 2021, detectada mediante secuenciación de ácidos nucleicos. En marzo de 2021, se detectó la cocirculación de la variante D614G (75%), con el patrón mutacional 3: D614G + T732A (25%). En abril de 2021, además de las variantes circulantes en marzo, se detectó la variante Alfa linaje B.1.1.7. (20%). En mayo de 2021 se identificaron cuatro variantes cocirculando: la A.2.5.1 (16,7%), la Beta linaje B.1.1.351 (50%), la Delta linaje B.1.1.617.2 (16,7%) y la

B.1.623 (16,7%). En julio de 2021 se mantuvieron cocirculando las variantes Beta linaje B.1.1.351 (45,5%) y Delta linaje B.1.1.617.2 (54,5%). En agosto de 2021 solo se identificó la Delta linaje B.1.1.617.2 en el 100% de las muestras secuenciadas. En diciembre de 2021 se volvió a detectar Delta linaje B.1.1.617.2 (45,5%) en cocirculación con la variante Ómicron B.1.1.529 (54,5%).

A partir de esa fecha, y durante los 17 meses que restan de pandemia, en las muestras secuenciadas, solo se detectó la variante Ómicron o alguna de sus subvariantes, excepto en marzo de 2022, donde además se identificó el patrón 4: D614G + Q677H.

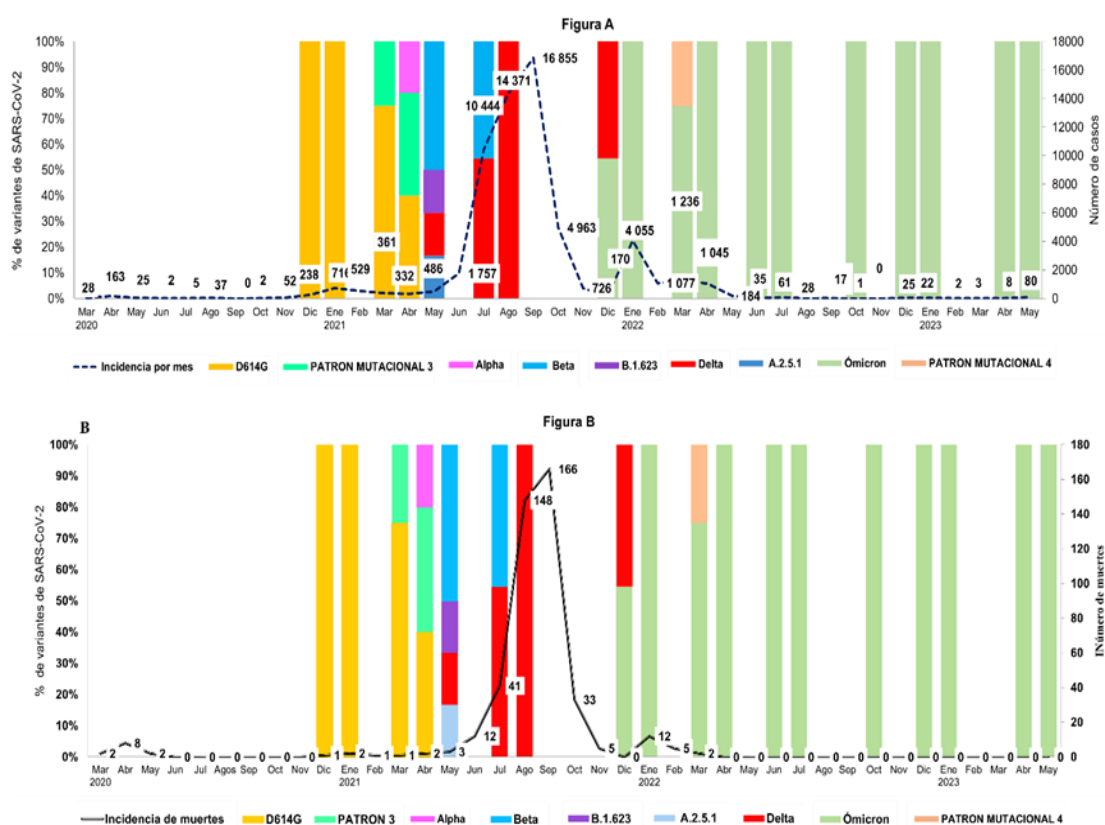


Figura 15. Secuencia temporal de la circulación de variantes genéticas SARS-CoV-2 en relación con la incidencia de casos y defunciones. Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

En la figura 15B se muestran las variantes circulantes asociadas, con el número de casos confirmados y de fallecidos por SARS-CoV-2. La mayor incidencia de positivos (16855/ 27,6%) y fallecidos (166/ 37,21%) ocurrió en septiembre de 2021. A partir de

ese momento se evidenció una reducción significativa en la cantidad de casos confirmados.

De diciembre de 2021 a mayo de 2023 el 62,3% (66/106) de las muestras secuenciadas se correspondieron con la variante Ómicron o algunas de sus variantes.

En la figura 16 se observa el período de enero a marzo de 2022 en el que se detectó la variante Ómicron B.1.1.529. En ese trimestre se incrementaron los casos a 6371 y se informaron 19 defunciones, valores superiores a los reportados en los meses de noviembre (726 casos y 5 fallecidos) y diciembre (170 casos y 0 fallecidos) de 2021.

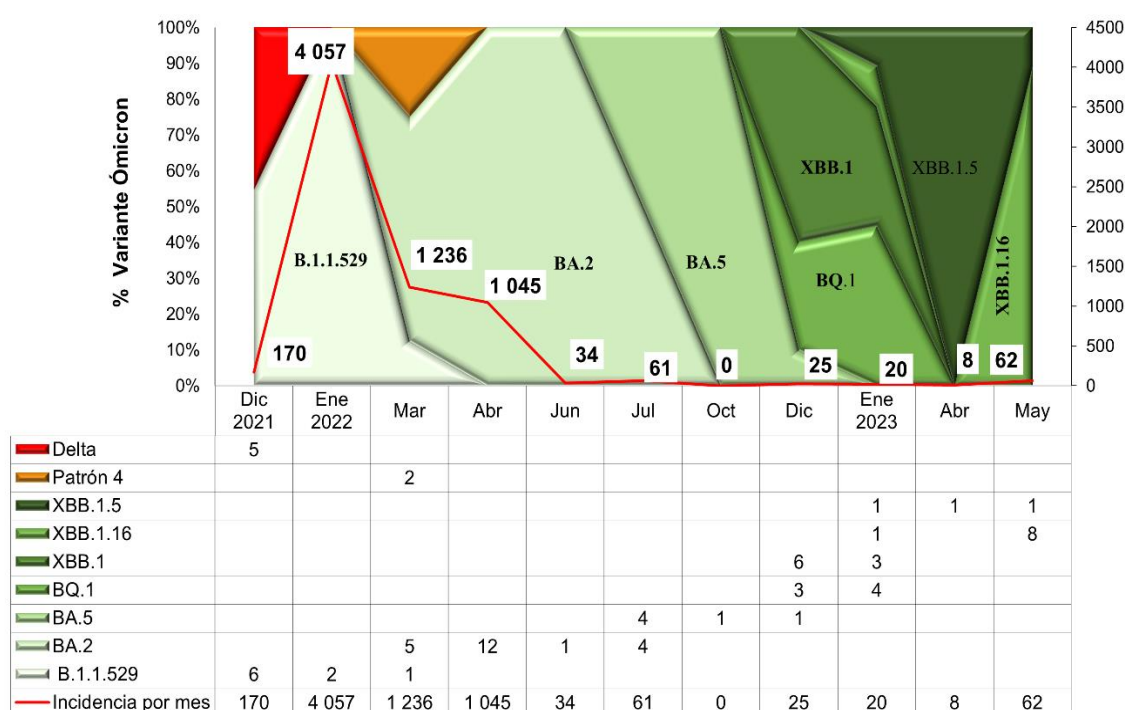


Figura 16. Distribución de casos con variante Ómicron y subvariantes en Villa Clara diciembre 2021- mayo 2023.

Entre junio de 2022 y mayo de 2023, fecha de culminación de la pandemia, la incidencia de casos reportados disminuyó hasta cifras de dos dígitos y no se notificaron fallecidos. En ese período circularon las subvariantes BA.2, BA.5, BQ.1, XBB.1, XBB.1.16 y XBB.1.5 (Figura 16).

En la tabla 19 se muestran las variantes de SARS-CoV-2 secuenciadas y su relación con la clasificación clínica de los pacientes en vigilancia genómica (n=106). Los pacientes infectados con la variante Delta presentaron formas graves de la enfermedad en el 43,75% de los casos, mientras que el 37,50% se clasificó como críticos, en el momento del diagnóstico. En los pacientes infectados con la variante Ómicron o alguna de sus subvariantes, el 75,76% se clasificó como leves y el 22,73% como graves. Los pacientes infectados con la variante Beta no mostraron casos graves, por lo que el 75% se presentó con formas leves de la enfermedad y el 25% se clasificó como formas moderadas.

Tabla 19. Variantes de SARS-CoV-2 y clasificación clínica de los pacientes para vigilancia genómica en Villa Clara. Diciembre 2021- mayo 2023.

Variantes del SARS-CoV-2	Clasificación clínica								Total	
	Leve		Moderado		Grave		Crítico			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Variante D614G	7	87,50	0	0,00	0	0,00	1	12,50	8	100
Beta	6	75,00	2	25,00	0	0,00	0	0,00	8	100
Delta	2	12,50	1	6,25	7	43,75	6	37,50	16	100
Ómicron y subvariantes	50	75,76	0	0,00	15	22,73	1	1,52	66	100
Otras*	4	50,00	2	25,00	2	25,00	0	0,00	8	100
Total	69	65,09	5	4,72	24	22,64	8	7,55	106	100

Porcentaje calculado con relación al Total de cada fila.

Prueba exacta de Fisher Chi cuadrado=45,999 p=0,000

Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

La relación entre las variantes del virus y el fallecimiento se muestra en la tabla 20. Del total de casos infectados con la variante Delta, el porcentaje de fallecidos fue de 31,25%, con la Beta del 25,00% y con la Ómicron del 1,52%.

Tabla 20. Pacientes fallecidos con variantes SARS-CoV-2 en vigilancia genómica Villa Clara diciembre 2021- mayo 2023.

Variantes SARS-CoV-2	Fallecidos				Total	
	No		Si			
	Número	%	Número	%	Número	%
Variante D614G	7	87,50	1	12,50	8	100
Beta	6	75,00	2	25,00	8	100
Delta	11	68,75	5	31,25	16	100
Ómicron y subvariantes	65	98,48	1	1,52	66	100
Otras*	8	100,00	0	0,00	8	100
Total	97	91,51	9	8,49	106	100

Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

En la tabla 21 y en la figura 17 se observa la tendencia central y la dispersión del valor del ciclo umbral según las variantes del virus. El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas entre las medianas de los valores de ciclo umbral ($\chi^2=14,587$; $p=0,006$). La mediana más baja la presentó la variante Delta (18,50), y la más alta la variante D614G (27,50). Los valores mínimos más bajos (14) se observaron en las variantes Delta y Ómicron. La mayor dispersión se evidenció en la variante D614G, con un rango intercuartil de 10 valores.

Tabla 21. Tendencia central y dispersión del valor del ciclo umbral según variantes del virus.

Variantes del virus	Estadísticos descriptivos (valor del ciclo umbral)					
	Mínimo	Máximo	Mediana	Cuartiles		Rango intercuartil
				Primero	Tercero	
Variante D614G	17	32	27,50	20,50	30,50	10,00
Beta	20	30	24,50	22,00	26,50	4,50
Delta	14	25	18,50	16,50	22,50	6,00
Ómicron y subvariantes	14	30	23,00	20,00	28,00	8,00
Otras*	18	30	24,50	21,50	28,50	7,00

Prueba de Kruskal Wallis χ^2 cuadrado=14,587 $p=0,006$

Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

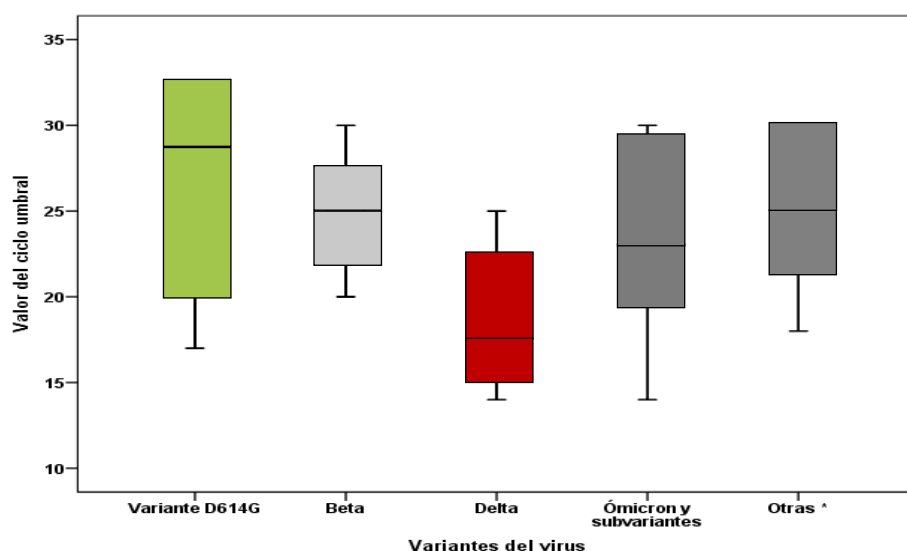


Figura 17. Tendencia central y dispersión del valor del ciclo umbral según las variantes del virus.

Fuente: Registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

La tendencia central y la dispersión de los valores del ciclo umbral según clasificación clínica se detallan en la tabla 22 y en la figura 18. Al aplicar el ensayo de las medianas existieron diferencias significativas entre los valores del ciclo umbral ($\chi^2=23,007$; $p=0,000$). Los pacientes clasificados como críticos presentaron los valores más bajos: mínimo de 14, máximo de 18 y mediana de 16. Los casos clasificados como leves, presentaron un valor mínimo de 16, máximo de 32, una mediana de 23 y el mayor rango intercuartil ($RIQ=7$). Además, se apreció que mientras más desfavorable era la evolución clínica, más bajos eran los valores de ciclo umbral, con un Coeficiente de Correlación de Pearson de $-0,409$ y una significación de $p=0,000$.

Tabla 22. Tendencia central y dispersión de los valores del ciclo umbral según clasificación clínica.

Clasificación clínica	Estadísticos descriptivos (valor del ciclo umbral)					
	Mínimo	Máximo	Mediana	Cuartiles		Rango intercuartil
				Primero	Tercero	
Leve	16	32	23,00	21,00	28,00	7,00
Moderado	22	25	24,00	24,00	25,00	1,00
Grave	17	30	21,00	19,50	25,00	5,50
Crítico	14	18	16,00	14,50	18,00	3,50

Prueba de Kruskal Wallis Chi cuadrado=23,007 $p=0,000$

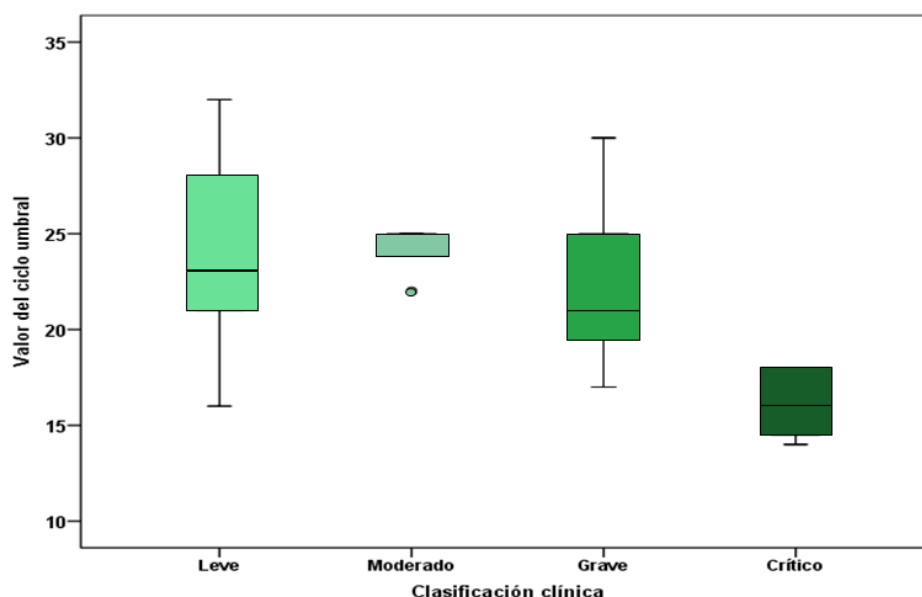


Figura 18. Tendencia central y dispersión del valor del ciclo umbral según la clasificación clínica.

Fuente: Registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

A las mutaciones del SARS-CoV-2 con efectos biológicos potenciales se les aplicó el procedimiento de conglomerados en dos fases. Se identificaron tres subgrupos naturales (clústeres) similares dentro de ellos, pero diferentes entre sí.

La figura 19 muestra la frecuencia y el perfil de estos subgrupos.

Subgrupo 1: Mayor representación de las mutaciones D614G, N501Y, E484K y K471N.

Subgrupo 2: Mayor representación de las mutaciones D614G, N501Y, P681H, T478K, N440K.

Subgrupo 3: Mayor representación de las mutaciones D614G, L452R, P681H, T478K.

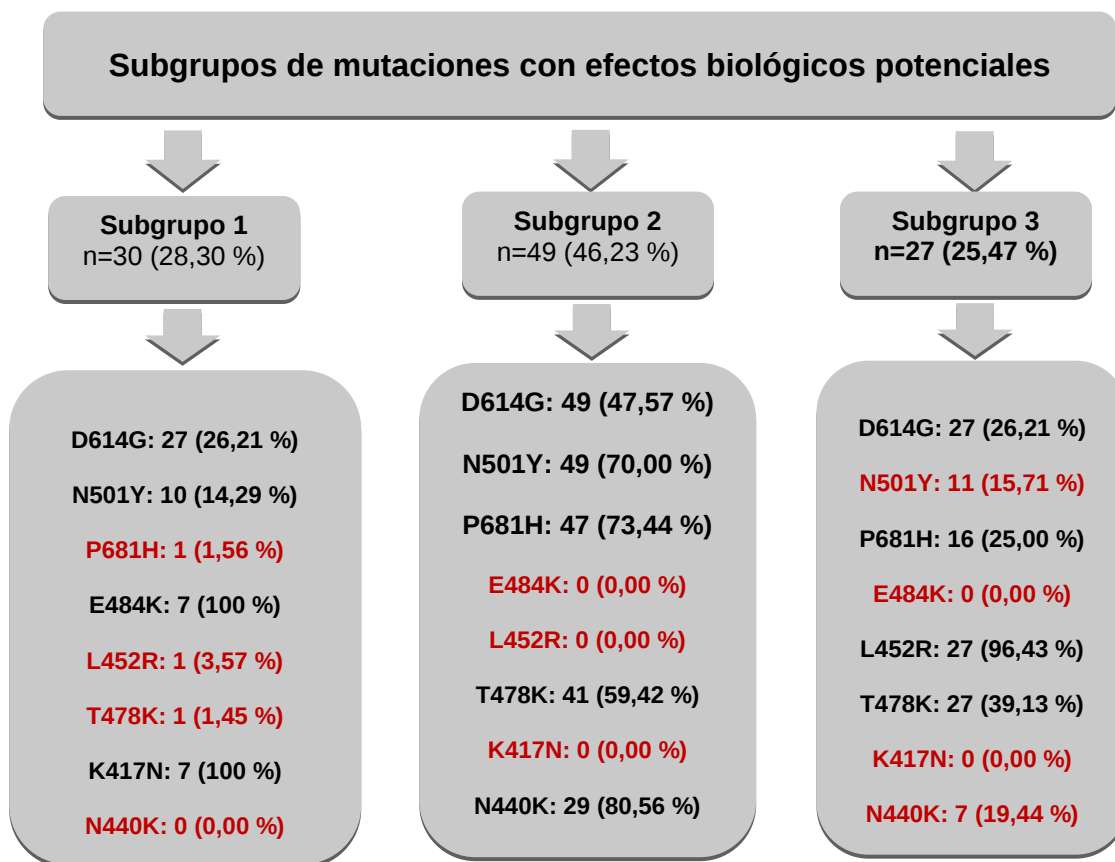


Figura 19. Frecuencia y perfil de los subgrupos de mutaciones del SARS-CoV-2 con efectos biológicos potenciales.

Fuente: Base de datos LBM-VC y LNR-IVR-IPK.

La tabla 23 muestra la relación entre las variantes genéticas y los subgrupos de mutaciones con efectos biológicos potenciales. Se observa de manera significativa ($p=0,000$) que el 100% de los pacientes con la variante Delta tenían las mutaciones que se encontraban en el subgrupo tres. Los casos con las variantes D614G, Beta y otras, se encontraban en el subgrupo uno y la mayoría de los casos con Ómicron y sus subvariantes se encontraban en el subgrupo dos.

Tabla 23. Relación de las variantes del SARS-CoV-2 y subgrupos de mutaciones con efectos biológicos potenciales.

Variantes del virus	Subgrupos de mutaciones con efectos biológicos potenciales						Total	
	Subgrupo 1		Subgrupo 2		Subgrupo 3			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Variante D614G	8	100	0	0,00	0	0,00	8	100
Beta	8	100	0	0,00	0	0,00	8	100
Delta	0	0,00	0	0,00	16	100	16	100
Ómicron y subvariantes	8	12,31	47	72,31	10	15,39	66	100
Otras*	6	66,67	2	22,22	1	11,11	8	100
Total	30	28,30	49	46,23	27	25,47	106	100

Porcentaje calculado con relación al total de la fila

Prueba exacta de Fisher Chi cuadrado=92,492 p=0,000

Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

Al realizar el análisis filogenético de las muestras de Villa Clara secuenciadas (Figura 20), se constató que las secuencias identificadas se agrupaban en cinco grandes clados, según las variantes. Dos de las secuencias (61226 y 61215) de la variante D614G, presentaron una mayor longitud de la rama, relacionada con un mayor número de sustituciones. Al analizar el clado en que se agrupaban las secuencias de la variante Beta, la mayoría fueron similares genéticamente, solo una (32057) mostró un número superior de mutaciones. Es de destacar que la rama que agrupó a la variante Ómicron, mostró una elevada diversidad genética. De este clado surgieron dos nuevas ramas, una de ellas presentó mayor variabilidad. Las ramas que se formaron se agruparon según las subvariantes (BA2, B.1.1.529, BA5, BQ1, XBB1, XBB.1.16, JN1), independientemente del tiempo en que se identificaron.

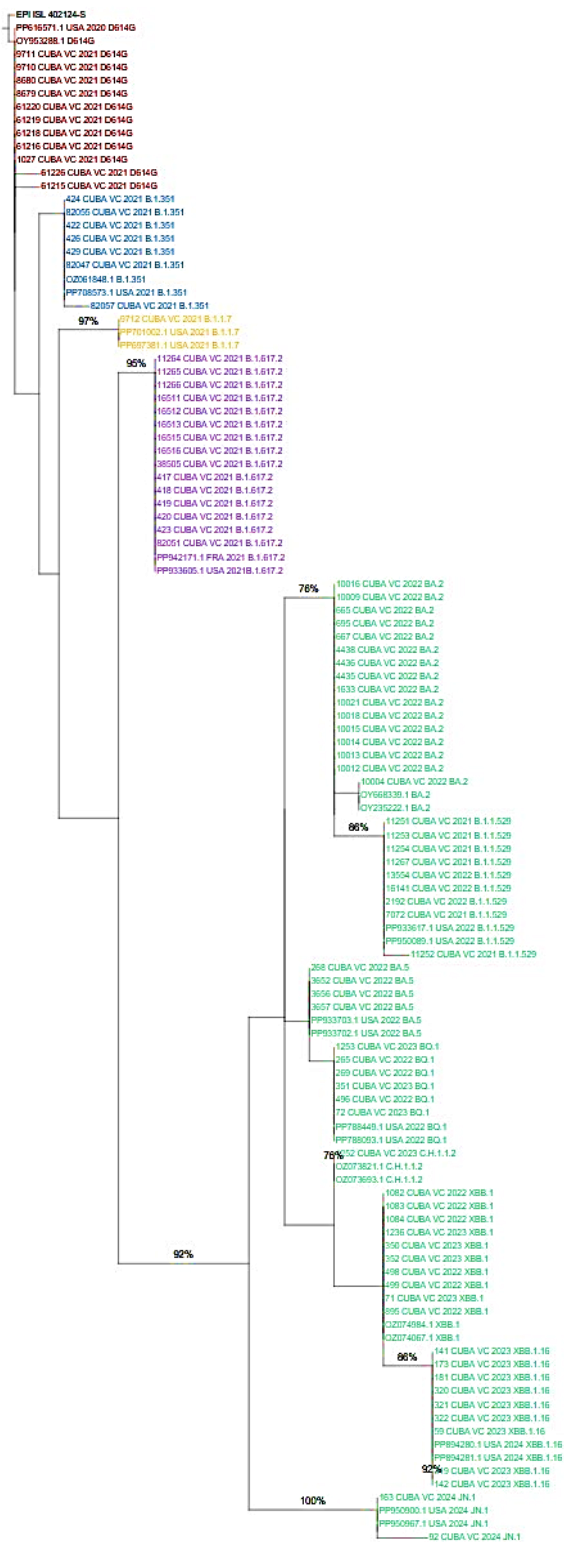


Figura 20.Árbol filogenético del SARS-CoV-2.

Fuente: registro de casos secuenciados en LNR-IVR-IPK.

DISCUSIÓN

V. Discusión

En Cuba se reforzaron todos los mecanismos para la vigilancia clínico-epidemiológica y microbiológica del SARS-Cov2, antes de que la OMS declarara la pandemia de COVID-19 en marzo de 2020.

Los laboratorios de biología molecular desempeñaron un papel fundamental en la implementación del diagnóstico etiológico del SARS-CoV-2. Para el LBM de Villa Clara constituyó un gran reto enfrentar la demanda del procesamiento de un total de 664 994 pruebas de RT-PCR.

La necesidad de adaptar y mejorar rápidamente la infraestructura del laboratorio, y la introducción de nuevas técnicas diagnósticas, sin detener las operaciones en curso, requirió de un reordenamiento con enfoque innovador, en un periodo corto de tiempo. Durante este período se realizaron diferentes acciones, entre las que se destacan:

- La capacitación de recursos humanos en el diagnóstico molecular.
- Digitalización de la información en los centros de toma de muestras.
- Reestructuración del área informática.
- Confección de los procedimientos normalizados de operaciones.
- Estandarización de los protocolos de laboratorio.
- El desarrollo de convenios con otras instituciones para la elaboración de materiales de laboratorio como gradillas, termos para el transporte de muestras, libros de registros para la entrada de muestras y protocolos de trabajo.
- Alianzas con las universidades en la transferencia tecnológica, en el proceso de informatización y para la colecta de las muestras.
- Se gestiona la adquisición de equipos especializados, entre ellos, nuevas plataformas de extracción y amplificación de ácidos nucleicos para ampliar las capacidades diagnósticas del laboratorio.

Las transformaciones realizadas no solo representan ajustes operativos, técnicos y estructurales, sino que encapsulan dos principios fundamentales: adaptabilidad y escalabilidad. La adaptabilidad es la capacidad para incrementar rápidamente nuevos métodos diagnósticos y técnicas, siguiendo la evolución del virus. La escalabilidad consiste en la habilidad para aumentar el número de pruebas

diagnósticas en respuesta a la demanda creciente, durante los picos pandémicos y sin comprometer el rendimiento y la calidad.

En este sentido, en el LBM de Villa Clara se ejecutaron estrategias internas dinámicas, según las etapas por la que transitó la pandemia.

En sus inicios, la OMS recomendó intensificar exponencialmente el número de pruebas diagnósticas a realizar, como la mejor estrategia de lucha contra la COVID-19 ⁽³¹⁾.

En el LBM de Villa Clara, de marzo a abril de 2020, la alta demanda de pruebas diagnósticas propició la ejecución de un diagrama de proceso de tipo hilo o recorrido para visualizar de manera clara y secuencial la interacción entre el personal, los espacios físicos y los recursos en las distintas etapas desde que la muestra llegaba al área de recepción hasta su procesamiento final. Esto, en combinación con el diagrama de flujo operativo del laboratorio ayudó a cumplir estrictamente los protocolos de aislamiento por zonas limpias y sucias, lo que garantizó una respuesta más rápida y segura ante un momento de alta presión epidemiológica.

Se reorganizó la composición del personal del laboratorio en dos grupos de trabajo que laboraban en jornadas extensas de más de ocho horas.

En noviembre de 2020 se incorporaron al laboratorio un grupo de jóvenes estudiantes del último año de la licenciatura en Bioanálisis Clínico, de licenciados en Biología y de médicos residentes en Microbiología de tercer año. Se conformaron cuatro equipos de trabajo (integrados por 8 personas) que trabajaban en turnos de 24 por 72 horas. El personal se distribuyó en cuatro áreas de trabajo: recepción de muestras, extracción de ácidos nucleicos, preparación de la mezcla de reacción y RT-PCR.

Las medidas de bioseguridad acapararon la atención de la comunidad científica con el surgimiento del nuevo agente que presentó una elevada letalidad, y para el que no existía tratamiento conocido ⁽¹³³⁾.

El LBM no estuvo exento de este riesgo, y desde la etapa preparatoria de implementación del diagnóstico, se activó la gestión de bioseguridad conforme al protocolo establecido. Se garantizó el suministro de los equipos de protección individual a todos los trabajadores y se capacitó en materias de bioseguridad. En el

laboratorio se realizó análisis de riesgo; se actualizó el plan de manejos de desechos peligrosos y el expediente de traslado de muestras. Los gabinetes de seguridad biológica se certificaron por la norma NC 1201-1:2017 ⁽¹³⁴⁻¹³⁷⁾.

El LBM, con alcance territorial, abarcó el diagnóstico de SARS-CoV-2 de las cinco provincias de la región central (Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila y Camagüey) hasta finales del año 2020. El laboratorio, en conjunto con el LNR-IVR-IPK, se convirtió en un referente para la capacitación y control de calidad, en función de la puesta en marcha de los nuevos laboratorios de la región central ⁽¹³⁸⁾.

El control de calidad constituye un pilar fundamental en el desarrollo de los laboratorios dedicados al diagnóstico molecular, permite estandarizar los procesos y también garantiza la competencia técnica y la calidad de los servicios ofrecidos ⁽¹³⁹⁾. Un programa de control de la calidad externo evalúa el desempeño de los laboratorios mediante la comparación de sus resultados con estándares establecidos y con otros laboratorios. La implementación de estos programas suele basarse en las normas ISO 17043, que establecen los requisitos para los ensayos de aptitud y las normas ISO 15189, que regulan la calidad de los laboratorios clínicos ^(140, 141). Son herramientas valiosas para el control de los procesos, ya que hacen posible la implementación de acciones correctivas para mejorar la calidad y asegurar el desempeño de los métodos ⁽¹⁴²⁾.

Asegurar la calidad se consideró tan importante como el diagnóstico etiológico de la enfermedad, por lo que, desde sus inicios, el laboratorio se insertó en el programa de control de la calidad externo del LNR-IVR-IPK para la validación de los procedimientos implementados ⁽¹⁴³⁾. Esta sinergia permitió verificar la exactitud y fiabilidad de las pruebas realizadas para la detección del virus, estándares técnicos imprescindibles, para la vigilancia y el control de la pandemia.

Los resultados de este control externo de calidad permitieron corroborar la clasificación correcta de los sospechosos en enfermos y sanos, con valores de sensibilidad de un 98,09% y de especificidad de un 98,77%. Estos indicadores son similares a los reportados en investigaciones que evalúan el desempeño de los ensayos moleculares para diagnóstico de COVID-19 como los obtenidos por Dust y

colaboradores ⁽¹⁴⁴⁾, en un estudio realizado en Canadá, con una sensibilidad y especificidad del 100%, donde no encuentran resultados falsos positivos, falsos negativos, ni reactividad cruzada con otros virus. Craney y colaboradores ⁽¹⁴⁵⁾, en una investigación realizada en un hospital de New York, Estados Unidos, encuentran valores de sensibilidad de 99% y especificidad de 97,6%. Un estudio realizado en Perú muestra los resultados de la evaluación del desempeño de dos ensayos de RT-PCR; Logix Smart mostró una sensibilidad de un 98,5 y una especificidad de 95,6%, y WGene SARS-CoV-2 con una sensibilidad de 97,0% y una especificidad de 100% ⁽¹⁴⁶⁾. En Cuba, la RT-PCR se utilizó como patrón de oro para evaluar diferentes métodos diagnósticos rápidos empleados en la pandemia. La técnica UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno tuvo una sensibilidad de 86,3% y la especificidad fue de 97,0% ⁽¹⁴⁷⁾. Los estuches PanbioTM COVID-9 Ag RapidTest Device, Antigen one SARS-CoV-2, Core test COVID-19 Ag Test y WANTAI SARS-CoV-2 IFA presentaron una sensibilidad entre 80-95% y la especificidad entre 90-98% ^(148, 149). Los resultados indican que la prueba de RT-PCR es altamente efectiva para detectar el virus en diferentes regiones y bajo diferentes protocolos.

En la presente investigación, los valores predictivos que se obtuvieron en la evaluación, revelaron que un paciente tenía una probabilidad de 99,72% de estar enfermo cuando la prueba resultara positiva, y una probabilidad de un 91,95% de estar sano cuando la prueba era negativa. La RT-PCR es una prueba diagnóstica sensible y específica, prácticamente un resultado concluyente, e influye, de manera decisiva, en la probabilidad para identificar los individuos sanos y enfermos. Los resultados obtenidos en la investigación son similares a los reportados por Meléndez Villalobos y colaboradores ⁽¹⁴⁶⁾, que muestran valores predictivos muy buenos (VPP: 100% y VPN 91,8%). Ellos también la clasifican como una prueba muy potente. En Villa Clara, los valores predictivos ayudaron a interpretar mejor los resultados de la RT-PCR y a tomar decisiones en cada contexto clínico y epidemiológico.

El Nomograma de Fagan ⁽¹⁵⁰⁾ aportó otro elemento para la evaluación de la tecnología. En el LBM se evidenció la precisión y el rendimiento diagnóstico después de aplicada la prueba. Estas herramientas se utilizan, en la práctica clínica, para detectar con mayor exactitud la enfermedad en los pacientes. Además, permite

tomar decisiones clínicas más informadas al tener una estimación cuantitativa de la probabilidad de que un paciente tenga la enfermedad, lo que significa comunicar de manera más eficiente y segura la precisión en el diagnóstico^(150, 151). La evaluación de la concordancia de la RT-PCR estimada mediante el índice de Kappa de Cohen, mostró un nivel óptimo, lo que corrobora la alta fiabilidad de la prueba y demuestra su capacidad para generar resultados precisos, más allá de la variabilidad esperada por el azar⁽¹¹⁰⁾.

El LBM de Villa Clara utilizó los siguientes diagnosticadores: OPS in house, RIDA-GENE SARS-CoV-2 y STAT-NAT COVID-19 MICRO. Todos los diagnosticadores presentaron buenos indicadores de validez y concordancia con los resultados LNR-IVR-IPK; los mejores valores (sensibilidad 100%, especificidad 100% y concordancia índice de Kappa de Cohen=1,000) se obtuvieron con el estuche STAT-NAT COVID-19 MICRO. Este estuche no requiere cadena de frío, detecta cuatro dianas moleculares y es de fácil ejecución por los laboratoristas. Además, la ventaja de identificar cuatro dianas moleculares del SARS-CoV-2 evita las reacciones cruzadas con otros coronavirus endémicos, minimizando los falsos positivos. El sistema RIDA-GENE SARS-CoV-2 también presentó excelentes indicadores de validez.

Los resultados obtenidos concuerdan con un meta-análisis de pruebas diagnósticas realizadas en diferentes países, para la detección de COVID-19, que destaca los resultados de la sensibilidad y especificidad de 17 diagnosticadores, la mayoría con valores por encima de un 90%⁽¹⁵²⁾.

En el desarrollo del diagnóstico del SARS-CoV-2, la evaluación de la sensibilidad y especificidad de los estuches comerciales y caseros empleados resultan cruciales para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados. Estos parámetros varían entre los diferentes diagnosticadores y dependen de factores como el diseño de los cebadores o primers, la calidad de los reactivos y las condiciones de procesamiento. La validación continua de su desempeño en contextos locales, permite optimizar el diagnóstico, asegurando una respuesta más efectiva frente a la pandemia⁽¹⁵³⁾.

En el presente trabajo, el desempeño de las pruebas moleculares en individuos sintomáticos y asintomáticos mostró valores de sensibilidad y especificidad por encima del 90%, y una adecuada concordancia. No existen diferencias marcadas en

los indicadores de validez de ambas categorías; sin embargo, la prueba fue más sensible en los pacientes sintomáticos que en los asintomáticos, relacionado con una menor proporción de falsos negativos en este grupo. La especificidad fue mayor en los asintomáticos. La menor sensibilidad de la RT-PCR en pacientes asintomáticos en la provincia durante la pandemia de COVID-19 planteó desafíos importantes en la vigilancia y el control de la enfermedad. Este aspecto requirió estrategias integradas para garantizar una detección efectiva, que incluía la realización de pruebas seriadas a las 48 horas en grupos de riesgo, la búsqueda activa de contactos en casos provenientes de zonas de alto riesgo de transmisión o contacto estrecho con pacientes confirmados, priorizando el riesgo epidemiológico sobre el diagnóstico molecular ⁽¹⁵⁴⁾.

Según el consenso argentino sobre la utilización de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2, la sensibilidad general en pacientes asintomáticos varía entre el 75% y el 95%, lo que se evidenció en los resultados obtenidos en esta investigación ⁽¹⁵⁵⁾.

Los protocolos de RT-PCR para el diagnóstico de SARS-COV-2, evaluados y recomendados por la OMS, utilizan diversas dianas moleculares ⁽³²⁾. La disponibilidad de las secuencias del virus depositadas en diferentes bases internacionales de datos de secuencias (GISAID, Nexstrain y GeneBank) permitió el diseño de cebadores específicos para regiones génicas altamente conservadas, con el objetivo de no afectar la sensibilidad y la especificidad de los estuches diagnósticos, por la presencia de mutaciones en sus dianas moleculares ^(7, 156).

En esta investigación, los parámetros de validación de las dianas moleculares (gen E y RdRp) mostraron una alta sensibilidad y especificidad, destacó el gen RdRp con mayor especificidad y la menor sensibilidad, lo que coincide con una investigación realizada por Van Kasteren y colaboradores ⁽¹⁵⁷⁾. Su informe refiere que el gen RdRp presenta una menor sensibilidad, por eso no se sugiere como única diana molecular. Sin embargo, el gen E demuestra una sensibilidad ligeramente mayor que el RdRp, por lo que la OPS lo recomienda para la confirmación ⁽¹⁵⁸⁾. La combinación de ambos genes en los protocolos de RT-PCR, permite alcanzar un equilibrio entre sensibilidad y especificidad, que mejora el diagnóstico en las diferentes fases de la infección y en contextos epidemiológicos variados ^(21, 159, 160).

Más allá de resultados cualitativos positivos y negativos, la RT-PCR expresa los valores cuantitativos en forma de ciclo umbral ⁽²⁷⁾.

En esta investigación se muestran las diferencias en los valores del ciclo umbral entre pruebas realizadas en el LBM de Villa Clara (intralaboratorio) y entre estos valores y los del LNR-IVR-IPK (interlaboratorio). Las diferencias intralaboratorio fueron de menos de dos ciclos y las interlaboratorios de tres ciclos y más. En el caso de la observación intralaboratorio, en función de las dianas moleculares utilizadas (gen E y RdRp), se destaca que un 83,33% de las muestras no mostró diferencias entre los ciclos umbrales.

La comparación interlaboratorio de los valores de ciclo umbral permite detectar estas variaciones y garantizar la armonización de los resultados, asegurando la calidad de los diagnósticos. Además, este proceso fomenta la mejora continua, al identificar discrepancias y proponer soluciones conjuntas. De esta forma, la uniformidad en la interpretación de los valores de ciclo umbral fortalece la vigilancia epidemiológica y la toma de decisiones clínicas basada en evidencias ⁽¹⁶¹⁾.

En el presente trabajo los resultados obtenidos coinciden con una investigación realizada en Chile por Quiroz Ruiz y colaboradores ⁽¹⁶²⁾. Estos autores plantean que dentro de una sola prueba, realizada con distintas dianas moleculares en la misma plataforma, la diferencia en los valores medios de ciclo umbrales de hasta 3,0 ciclos, en los laboratorios que encuestaron.

Los valores del ciclo umbral de la RT-PCR muestran una correlación significativa con la clasificación clínica de los pacientes infectados con SARS-CoV-2. Un Ct bajo indica una alta carga viral y se asocia con casos más graves de la enfermedad, mientras que valores más altos de Ct suelen observarse en pacientes con síntomas leves o asintomáticos. Sin embargo, la utilidad del Ct como predictor de gravedad es limitada, debido a la influencia de otros factores como son la calidad de la muestra y las características individuales del paciente. Estos hallazgos sugieren la importancia de considerar el Ct como un complemento de la evaluación clínica, más que como un indicador único.

La evaluación del desempeño del diagnóstico molecular mediante la RT-PCR es esencial para la identificación precisa de casos durante la pandemia. Refuerza el

diagnóstico etiológico, clave para construir datos epidemiológicos sólidos y evaluar la transmisión comunitaria. La integración de estos datos al sistema de vigilancia permite detectar tendencias, evaluar riesgos y diseñar estrategias de control más efectivas en el enfrentamiento a la pandemia ⁽¹⁶³⁾.

En Villa Clara se confirmaron un total de 60 141 casos; convirtiéndose en el epicentro del país en abril de 2020, por la alta incidencia reportada. El 2021 se caracterizó por un aumento sostenido de la incidencia de casos, hospitalizaciones y mortalidad, con una tendencia a la disminución en los años 2022 y 2023. Este último año con la declaración del fin de la pandemia, mostró un comportamiento similar al resto del país ⁽¹⁶⁴⁾.

Debido al elevado número de muestras diarias a procesar, en el LBM de Villa Clara, se emplearon distintas plataformas automatizadas de alto rendimiento para la extracción de ácidos nucleicos, lo que permitió optimizar el proceso de aislamiento y purificación del ARN viral. Estas tecnologías incluyeron sistemas avanzados, que combinaron eficiencia y precisión, reduciendo significativamente los tiempos de procesamiento y aumentando la capacidad operativa del laboratorio. Además, se utilizaron estuches comerciales, especialmente diseñados para garantizar un aislamiento rápido y fiable, asegurando la pureza y la calidad del material genético extraído ⁽¹⁶⁵⁾.

Las limitaciones impuestas por el bloqueo económico a Cuba y la demanda excesiva de diagnosticadores a nivel internacional, afectaron significativamente la adquisición de los estuches de extracción necesarios para la RT-PCR en el diagnóstico del SARS-CoV-2 ⁽¹⁶⁵⁾.

Estas restricciones dificultaron el acceso a los reactivos y equipos esenciales, obligando a los países a buscar alternativas locales. En nuestro país se destaca el desarrollo del estuche CEA-NANO+RNA 3.0, un producto nanotecnológico para la extracción magnética de ácidos nucleicos, diseñado por el Centro de Estudios Avanzados de Cuba, perteneciente al Grupo de la Industria Biotecnológica y Farmacéutica de Cuba ⁽¹³⁰⁾. Este desarrollo permitió garantizar la continuidad de los diagnósticos y demostró la capacidad innovadora del país para enfrentar adversidades mediante el desarrollo de tecnologías propias. Este avance refuerza la

independencia tecnológica y fortalece las capacidades diagnósticas nacionales en situaciones críticas.

Para el LBM de Villa Clara, las plataformas de amplificación disponibles fueron el Rotor-Gene y SLAN-YGP ambas combinan tecnologías avanzadas de detección de fluorescencia y capacidad de amplificar, simultáneamente, diferentes dianas genéticas, con alta sensibilidad y especificidad ^(166, 167).

Estas plataformas lograron incrementar significativamente la capacidad de procesamiento, logrando más de 2 000 muestras por día y su introducción fue clave para enfrentar los desafíos que impuso la pandemia, y fortalecer el diagnóstico molecular en la región central del país.

La automatización tecnológica del diagnóstico de la infección por SARS-COV-2 permitió la confirmación de un elevado número de muestras de casos sospechosos por día. El análisis de los datos de todos los casos confirmados proporcionó información fundamental para comprender el comportamiento clínico-epidemiológico y la evolución de la pandemia en Villa Clara.

Desde el punto de vista epidemiológico, en Villa Clara no se describe un patrón diferencial en relación a la edad y el sexo. La COVID-19 afecta a personas de todas las edades y supone mayor riesgo para la vida en los individuos de edad avanzada y con comorbilidades ⁽¹⁶⁸⁾.

En esta investigación predominó el grupo de edad de 19 a 59 años, con menor proporción de casos en edades extremas de la vida. Resultados similares a los que se describieron en Santiago de Cuba, con 57,1% de los casos en el rango de edad de 21 a 60 años ⁽¹⁶⁹⁾, diferente a los reportes de Martínez y colaboradores en Guantánamo⁽¹⁷⁰⁾, otra provincia cubana, donde predominaron los mayores de 60 años. Los resultados también coinciden con los obtenidos en el área de salud “19 de abril” de La Habana, donde Lage y colaboradores ⁽¹⁷¹⁾ encuentran un número menor de casos en las edades extremas. Este grupo de menor incidencia, presenta mayor vulnerabilidad, en especial los ancianos, relacionado con el fenómeno de la inmunosenescencia, debido a que, con la edad, la respuesta inmune es menos eficaz, porque afecta la producción de células T por el timo ⁽¹⁷²⁾. En un estudio

realizado en Perú ⁽¹⁷³⁾, encontraron que el 51,9% de los pacientes estuvieron en el rango de 30 a 59 años.

Varios informes justifican la menor susceptibilidad femenina al contagio; desde los inicios de la pandemia se plantea la posible resistencia femenina al virus. Se especula que la poca susceptibilidad de las mujeres a las infecciones virales puede deberse a la protección que brinda tener doble cromosoma X, en comparación con los hombres ⁽¹⁷⁴⁾.

La notificación de casos de COVID-19 varía con relación al sexo afectado en los distintos países del mundo. En cifras absolutas, China contabiliza más casos en hombres a diferencia de la serie de Villa Clara donde se detectó un discreto predominio del sexo femenino, lo que coincidió con lo notificado por Corea del Sur ⁽¹⁷⁵⁾. La frecuencia de casos en España, es similar en ambos sexos. Las diferencias entre países, en la prevalencia de COVID-19 en ambos sexos, pueden ser reales o fruto de comparaciones transversales preliminares en diversos estadios de la pandemia ⁽¹⁷⁵⁾. El predominio del sexo femenino detectado en este estudio concuerda con lo reportado por otros investigadores ^(170, 176, 177), sin embargo, la mayor incidencia de casos positivos en la enfermedad de la COVID-19 en el sexo masculino, es comunicado también por varios autores ^(173, 178, 179).

Rojas y colaboradores refieren que Cuba no muestra diferencia significativa en la variable sexo y existe igual probabilidad de enfermar ambos ⁽¹⁷⁷⁾, y coincide con un trabajo de revisión de 140 historias clínicas de pacientes positivos para la COVID-19 en un hospital de Lima, Perú, donde concluyen que se afectan en iguales proporciones la población femenina y la masculina ⁽¹⁸⁰⁾.

Durante la enfermedad COVID-19, los pacientes pueden manifestar un amplio espectro de formas clínicas, que van desde asintomáticos a sintomáticos, graves y fallecidos. Los signos y síntomas clínicos aparecen entre los dos y 14 días posteriores a la exposición al virus ⁽¹⁷³⁾. Los síntomas habituales que presentan las personas infectadas por SARS-CoV-2 son: fiebre, tos, cansancio, pérdida del gusto y del olfato ⁽¹⁷⁹⁾.

En la presente investigación hubo un predominio de los pacientes sintomáticos. Entre los síntomas y signos más frecuentes destacan fiebre, tos, rinorrea, pérdida del gusto

y malestar general. La literatura informa como síntomas cardinales, la fiebre y tos seca. Los síntomas más frecuentes; fiebre, tos y rinorrea; durante la pandemia en Villa Clara, coinciden con los que refieren Bandera y colaboradores ⁽¹⁶⁹⁾. Otros investigadores difieren al informar la tos como el más frecuente ^(173, 177, 181).

En el Hospital Civil de Culiacán, México, en 192 pacientes confirmados, las dos manifestaciones más frecuentes resultaron la fiebre y la tos ⁽¹⁸²⁾. Una investigación realizada en Holguín, Cuba, comunica que la manifestación más frecuente es la fiebre, seguida de la tos ⁽¹⁸³⁾. Los síntomas que predominan en la provincia Guantánamo, Cuba, son la fiebre, la congestión nasal y la tos ⁽¹⁷⁰⁾. El hospital “Frank País García”, de La Habana, Cuba, informa, en una serie de 17 pacientes, como síntomas más frecuentes el malestar general, la fiebre y la tos seca ⁽¹⁸⁴⁾.

La pérdida súbita del olfato y el gusto se notifican por muchos investigadores ^(169, 170, 179, 185, 186), esto respalda lo encontrado en este informe. Sin embargo, otros autores no informan estos síntomas, o no los tienen en cuenta ^(173, 182).

Yan y colaboradores notifican que los pacientes con disfunción olfativa pueden estar asociados con un curso clínico más leve ⁽¹⁸⁷⁾. Pang y colaboradores también informan que los pacientes con disfunción olfativa más grave, tienen menos probabilidades de ser hospitalizados; sin embargo, los pacientes intubados o fallecidos en el momento de la recopilación de datos, no pudieron ser incluidos en el estudio ⁽¹⁸⁸⁾.

Es cierto que la alteración de la sensación del gusto puede ocurrir como resultado de afecciones locales y sistémicas, y otras causas muy variadas ⁽¹⁸⁹⁾. La disfunción olfativa notificada por el paciente, es un síntoma muy específico de la COVID-19, que debe incluirse en la evaluación previa a la prueba de los pacientes sospechosos ^(188, 189). Un estudio realizado por Mendoza Gutiérrez y colaboradores en México plantea que la pérdida del gusto y el olfato son síntomas relevantes con alto grado de predicción de la COVID-19 ⁽¹⁹⁰⁾.

Los pacientes asintomáticos son una fuente de virus potencialmente transmisible ⁽¹⁹¹⁾. El 16% de los casos confirmados en Villa Clara estaban asintomáticos. En estudios revisados, la frecuencia de pacientes asintomáticos con COVID-19 es variable y ubican el rango asintomático entre un 20% y un 80% ^(192, 193).

En China, un estudio en la población tibetana, encuentra un 22% de portadores asintomáticos ⁽¹⁹²⁾. La investigación realizada por la Universidad de Padua, Italia, y el Imperial College de Londres en el poblado italiano de Vó, muestra que el 40% de la población analizada no tiene síntomas en el momento de realizar la prueba diagnóstica, a la vez que poseen una carga viral similar a la de los pacientes sintomáticos ⁽¹⁹⁴⁾. En India, una encuesta muestra que el 47,1% de la población infectada es asintomática y el 35,3% tiene síntomas leves ⁽¹⁹⁵⁾.

En el presente trabajo los resultados reportados difieren de otros estudios que informan diferentes porcentajes de pacientes asintomáticos en el momento del diagnóstico ^(169, 170, 185, 193, 196-199), que van desde un 17,9% aun 68,7% ^(185, 193, 196-199).

La presencia de antecedentes patológicos personales como hipertensión, diabetes *mellitus*, cáncer, enfermedad cardíaca o cerebrovascular e insuficiencias renal o hepática, son de interés desde el punto de vista práctico, ya que permiten pronosticar, en buena medida, qué paciente puede desarrollar una forma grave de la COVID-19 ^(180, 184). En los pacientes con COVID-19 se incrementa el riesgo de enfermar y morir si coexisten comorbilidades ^(180, 184).

En este análisis, la hipertensión fue el antecedente patológico más frecuente, similar a lo obtenido por Bandera ⁽¹⁶⁹⁾. Otros autores coinciden que la hipertensión y la diabetes son los antecedentes patológicos más frecuentes ^(176, 180, 184). Un estudio en Perú describe a la diabetes *mellitus* como la comorbilidad más frecuente y no informa casos con hipertensión ⁽¹⁷³⁾. Una investigación en Iraq, conducida por la Universidad de Liverpool, encuentra la hipertensión arterial y la diabetes *mellitus* como las comorbilidades más frecuentes ⁽²⁰⁰⁾.

Amancio y colaboradores ⁽¹⁸⁰⁾ reportan que la presencia de comorbilidades, como enfermedades crónicas propias de la edad, incrementan el riesgo de enfermar y morir, frente a un cuadro de COVID-19. Un estudio en Perú informa que la edad avanzada y las comorbilidades se asocian al desarrollo de formas graves de COVID-19 ⁽²⁰¹⁾.

Según el espectro clínico de la enfermedad por COVID-19, los pacientes se pueden clasificar con enfermedad leve, moderada, grave o crítica ^(186, 188). En el 80% de los casos de la COVID-19, afortunadamente la enfermedad es leve, el 15% de los

pacientes muestran síntomas graves que requieren hospitalización y el 5% de los infectados pueden progresar a críticos, que requieren ventilación de apoyo y Unidades de Cuidados Intensivos ^(186, 202). En la presente investigación estos indicadores quedaron por debajo; solo 0,41% evolucionaron a graves y a críticos el 0,52%, lo que difiere con lo reportado por la literatura. Una investigación en Perú comunica que el 77,7% (718) de los pacientes resultan casos leves, 21,3% (153) moderados y 1% (7) graves, que requieren hospitalización en Unidades de Cuidados Intensivos ⁽¹⁵⁸⁾. En Paraguay informan que 12,8% de los pacientes necesitan Unidades de Cuidados Intensivos ⁽²⁰³⁾. En Chile, el 25% de los casos es hospitalizado en una Unidad de Paciente Crítico o trasladado a ésta durante su estancia hospitalaria ⁽²⁰⁴⁾. Otra investigación en Chile de Vial y colaboradores ⁽²⁰⁵⁾ publica que el 3,7% de los pacientes requirieron cuidados intensivos o fallecieron.

La aplicación de la metodología espacial constituyó otra importante herramienta en el ámbito de la investigación científica a nivel internacional para el seguimiento y control de la pandemia ^(206, 207). A partir de la confirmación de casos por la RT-PCR se obtuvo la información necesaria acerca de la distribución del riesgo de enfermar en determinados territorios. Esto generó las hipótesis de investigación que dieron inicio a estudios epidemiológicos y microbiológicos para identificar posibles factores asociados o causales, permitió la vigilancia rápida, en aras de orientar a las autoridades gubernamentales y sanitarias en la ejecución y seguimiento de medidas de control para disminuir la transmisión del virus.

Entre los estudios publicados, destaca, la vigilancia rápida de la COVID-19 en los Estados Unidos ⁽²⁰⁶⁾, a partir de la detección y evaluación de conglomerados emergentes como unidades de análisis a nivel de condados. Observaron que al hacer el análisis por conglomerados se incrementó el riesgo y una distribución espaciotemporal nueva en un plazo de 18 días. También en Corea del Sur ⁽²⁰⁷⁾ se identificaron patrones de distribución espaciotemporal de la COVID-19 que utilizaron para la respuesta gubernamental a la pandemia. Se tomaron medidas de distanciamiento social y estrategias de intervención basadas en realizar pruebas de RT-PCR, localizar a los contactos y tratar a los pacientes. Como resultado de estas

medidas, los conglomerados se tornaron más pequeños y las trasmisiones de más corta duración.

En Bangladesh ⁽²⁰⁸⁾ se observaron cambios en los patrones espaciotemporales del riesgo de la COVID-19 en los escenarios sometidos a una intervención, y concluyen, que la visualización de la dinámica de transmisión de COVID-19 permite establecer pautas y ejecutar medidas tempranas de preparación, en los países con escasos recursos, para controlar eficazmente otras enfermedades infecciosas.

En Brasil ⁽²⁰⁹⁾ priorizaron la distribución de las pruebas diagnósticas para COVID-19, sobre la base de la integración de la vigilancia tradicional, la vigilancia participativa y el análisis espaciotemporal. En Nepal ⁽²¹⁰⁾, los investigadores consideraron que los resultados del análisis espaciotemporal facilitaron una asignación adecuada de recursos y contribuyó a mejorar las intervenciones para controlar eficazmente la pandemia. La vigilancia de la dinámica de la transmisión del SARS-CoV-2, se realizó además, en países como Ecuador ⁽²¹¹⁾, Etiopía ⁽²¹²⁾, Colombia⁽²¹³⁾, Brasil⁽²¹⁴⁾ y Argentina ⁽²¹⁵⁾.

Durante el 2020, en Villa Clara se propuso, por primera vez en Cuba, el enfoque de la vigilancia espacial prospectiva para COVID-19 ⁽²¹⁶⁾. Esta metodología fue de gran utilidad durante los meses de julio a octubre de 2021, periodo en el que se registró la mayor incidencia de casos en la provincia. En el presente informe se muestra la estrategia en un segmento de esta serie temporal, que coincidió con la circulación de las variantes Beta y Delta (Figura 21).

El enfoque intersectorial y multidimensional para la vigilancia y control de la transmisión del SARS-CoV-2. A través de la integración de datos estadísticos, estudios epidemiológicos en el terreno y análisis espacial de series temporales, establece una arquitectura diagnóstica que no sólo identifica los clústeres activos, sino que anticipa aumentos de transmisión con base en indicadores sociodemográficos, climáticos y de capacidad sanitaria. La incorporación de variables biológicas y conductuales permite contextualizar los eventos epidemiológicos dentro de sistemas complejos, promoviendo decisiones sanitarias dinámicas e informadas. Esta estrategia responde a la necesidad de un sistema de salud resiliente capaz de actuar preventivamente sobre focos emergentes.

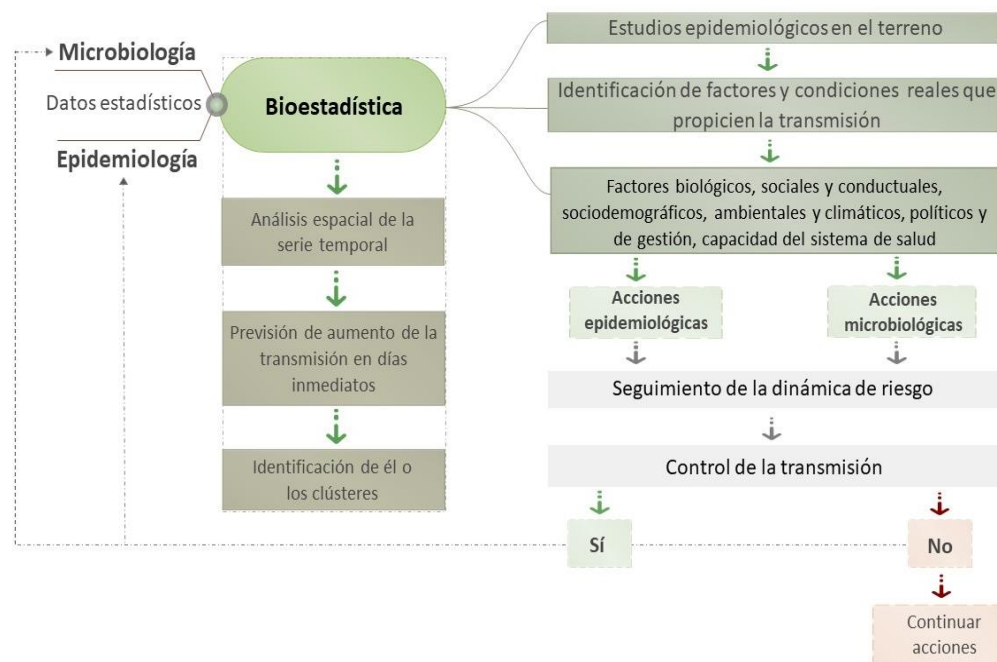


Figura 21. Modelo integrado de detección temprana y control espacial de clústeres de SARS-CoV-2.

La observación de la dinámica de la transmisión del virus permitió orientar las acciones epidemiológicas y de vigilancia microbiológica. A partir de la vigilancia espacial prospectiva, se manejó el aseguramiento de los recursos necesarios, con énfasis en la distribución de medios de transporte viral, la elevación del número de pruebas diagnósticas, la supervisión de la colecta de muestras, el monitoreo de las muestras procedentes de las áreas de mayor riesgo y la identificación de las nuevas variantes genéticas circulantes.

Como resultado de esta política de vigilancia prospectiva, se observó la modificación del patrón de distribución espaciotemporal, con una disminución paulatina de las tasas de infección en los conglomerados identificados y con una disminución de la transmisión. Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios ⁽²⁰⁹⁻²¹⁵⁾.

La vigilancia genómica es una herramienta eficaz para monitorear y entender la evolución del SARS-CoV-2 y permite la detección temprana de nuevas variantes circulantes ⁽¹⁶⁴⁾.

En Villa Clara, de marzo de 2020 a abril de 2021 circuló la variante D614G. Este período epidémico fue el de menor incidencia, lo que pudo estar determinado por el rigor del confinamiento, el cierre de aeropuertos y otras medidas epidemiológicas dispuestas por las autoridades gubernamentales y sanitarias.

La prevalencia mundial de la variante D614G durante el 2020 alcanza aproximadamente el 100%; debido a la presión de selección evolutiva genética del SARS-CoV-2 ⁽²¹⁷⁾.

En Cuba, hasta noviembre de 2020 se detectó la circulación de una única variante, la D614G, en más del 90% de las muestras estudiadas por secuenciación ^(218, 219, 220). Igualmente, de enero a marzo de 2021, predomina en el país la circulación de D614 ⁽²²¹⁾. En diciembre de 2020 entra en el país la variante Alfa, que co-circula con la D614G ⁽²¹⁹⁾. Esta nueva variante no se asoció con un incremento de casos y de fallecidos ⁽²²¹⁾.

Villa Clara reportó una situación similar a la de Cuba en el mismo período de tiempo, tanto en la circulación de variantes como en la incidencia de casos y fallecidos, aun cuando las fronteras se encontraban abiertas y no se había iniciado la vacunación.

En EE. UU. y países europeos, la circulación de la variante Alfa se asoció con una mayor transmisibilidad, un mayor riesgo de reinfección y una reducida eficacia de la vacuna. La mortalidad aumentó a un 50% ⁽²¹⁸⁾.

La variante Beta se detecta, por primera vez, en Sudáfrica en octubre de 2020 ⁽¹²⁾. Se asoció con un riesgo mayor de padecer una enfermedad grave, crítica o de morir ⁽²²²⁾. En Cuba, la variante Beta se detectó inicialmente en La Habana a finales de diciembre de 2020 y se extendió progresivamente al resto del país ⁽²¹⁹⁾. Mundialmente, el linaje Beta B.1.351 se asoció con aumentos significativos en el número de casos, disminución de la respuesta a los anticuerpos neutralizantes ante los diferentes formatos de vacunas, riesgo de hospitalización, gravedad clínica y mortalidad ⁽²²³⁾.

En Villa Clara, en 2021, la variante Beta se detectó en co-circulación con la variante Delta. En este período ocurrió el mayor incremento de casos y defunciones; similar a lo reportado por otros investigadores ^(218, 222, 224, 225).

Un estudio en La Habana, de casos graves y críticos, demostró la presencia de la variante Beta en el 87,7% de los pacientes y en el 80,4 % de los fallecidos ⁽²²⁶⁾. En Qatar, la infección con Beta se asoció con mayores riesgos de enfermedad grave, crítica y muerte ⁽²²²⁾.

La variante Delta B.1.617.2, fue responsable de la segunda ola mortal de infecciones por COVID-19 en abril de 2021 en la India ⁽¹²⁾. En agosto de 2021, se convierte en la variante dominante en el mundo ⁽²²⁴⁾. La mayor infectividad de la variante se debe a una combinación de mutaciones clave que le dan a la proteína de la espícula una mayor afinidad para unirse a ECA2. Esto provoca una menor eficacia de las vacunas contra ella y mayores cargas virales en las personas infectadas ⁽²²⁴⁾.

En Matanzas, Cuba, la variante Delta, se detecta a finales de abril de 2021, en dos meses se extendió rápidamente al resto de las provincias ⁽²¹⁹⁾. La variante Delta, que venía desde mayo de 2021co-circulando con Beta en Villa Clara, se estableció como única variante en agosto y circuló hasta diciembre de 2021.

Según GISAID, la variante Delta ocupa el 90% de las secuencias reportadas globalmente desde junio hasta septiembre de 2021 ⁽²¹⁹⁾.

La disminución drástica de casos confirmados de COVID-19 en Villa Clara a partir del mes de septiembre, se atribuye principalmente a una respuesta altamente efectiva a la vacunación masiva, más que a la inmunidad colectiva alcanzada por la infección natural ⁽²²⁷⁾.

La evidencia de Cuba y otros países de América Latina ⁽²²⁸⁾ muestra que la introducción y rápida cobertura de esquemas completos de vacunación, como los de Abdala y SOBERANA ⁽²²⁹⁻²³²⁾, se asoció con una reducción significativa de casos graves, hospitalizaciones y muertes ⁽²³⁰⁾. En La Habana, la efectividad de Abdala en la vida real fue superior al 98% para prevenir enfermedad grave y muerte, con una caída de casos y fallecimientos que coincidió temporalmente con la vacunación masiva, lo que respalda el impacto directo de la vacunación sobre la transmisión y la carga de enfermedad ⁽²³³⁾.

Estudios de modelado en Cuba confirman que la reducción de la transmisión y la incidencia tras la vacunación no puede explicarse solo por la inmunidad natural, ya que la proporción de población infectada antes de la vacunación era insuficiente para

alcanzar umbrales de inmunidad colectiva, especialmente ante variantes más transmisibles ⁽²³⁴⁾. A nivel regional, análisis en América Latina y el Caribe demuestran que la cobertura vacunal fue el factor más relevante en la reducción de mortalidad y casos en la fase posvacunación, superando el impacto de la inmunidad natural y de las medidas de contención ⁽²³⁵⁻²³⁷⁾.

En Estados Unidos y Europa ⁽²³⁸⁾, la disminución de casos y hospitalizaciones también se asoció temporal y causalmente con la vacunación masiva, y no con la inmunidad de rebaño por infección natural ⁽²³⁹⁾. En China, la estrategia de vacunación masiva y medidas de contención permitieron controlar brotes sin depender de la inmunidad colectiva natural ⁽²³⁴⁾.

Con la disminución de la circulación de la variante Delta surge una nueva variante del SARS-CoV-2: Ómicron que logra evadir, en cierta medida, la respuesta inmunológica generada por las vacunas existentes. El primer caso de esta variante se informa el 24 de noviembre de 2021 en Botsuana ⁽¹²⁾. En diciembre de 2021 la variante Ómicron (B.1.1.529) de SARS-CoV-2 rápidamente predomina en todo el mundo ⁽²⁴⁰⁾.

En Cuba se identifica por primera vez la variante Ómicron, el 1 de diciembre de 2021 ⁽²¹⁹⁾ aún cuando la Delta era la variante circulante predominante, y la desplazó rápidamente, debido a su mayor tasa de transmisión, infectividad y evidencia una capacidad limitada de eludir la respuesta del sistema inmunitario. El país se encontraba, en ese momento, en un contexto epidemiológico favorable con un número bajo de casos nuevos y de muertes ⁽²⁴¹⁾.

También en diciembre de 2021 se detecta la introducción de la variante Ómicron en Villa Clara, y desplaza definitivamente a la variante Delta ⁽²⁴¹⁾;

En Villa Clara, la llegada de Ómicron B.1.1.529 modificó el escenario clínico-epidemiológico; a pesar de que el 91,8% de la población de la provincia tenía un esquema de vacunación completo con Abdala y Soberana. Los casos se incrementaron en enero de 2022 en relación con los meses de noviembre y diciembre de 2021, aunque con menor severidad clínica por el nivel de inmunidad alcanzado en la población.

Una investigación en Cuba, detecta la variante Ómicron en el 83,0% (239/288) de los casos confirmados durante el período ⁽²¹⁹⁾. El 65,3% de los mismos estaban vacunados completamente.

La presencia de la variante Ómicron también provoca las tasas más altas de incidencia de COVID-19, jamás registradas a nivel mundial ^(241, 242), incluso en países con altas coberturas de vacunación como España ⁽²⁴⁰⁾, pero la gravedad de la enfermedad y las muertes disminuyeron. Esto pudo estar relacionado con la mejora de los tratamientos, las coberturas de vacunación y la inmunidad derivada de las infecciones previas con otras variantes ^(219, 241, 243).

La explicación al aumento de la incidencia pudiera estar en relación con la cantidad mayor de mutaciones adquiridas por Ómicron, en comparación con otras variantes ⁽²⁴⁴⁾. El comportamiento más leve de la enfermedad pudo deberse a que la inmunidad de los coronavirus contra la infección es de corta duración, mientras que la inmunidad contra enfermedades graves es de larga duración. Sucedió que la mayoría de las personas ya habían adquirido inmunidad contra enfermedades graves de la COVID-19 cuando aparece la variante Ómicron ⁽²⁴⁴⁾. En niños, la vacunación con SOBERANA-02/Plus mostró una protección robusta y sostenida contra la infección sintomática y la enfermedad grave durante la ola de Ómicron ⁽²⁴⁵⁾.

La circulación de Ómicron subvariante BA.2 se detectó en Villa Clara entre marzo de 2022 y julio de 2022, con 2 560 casos notificados. El último fallecimiento por COVID-19 ocurrió en marzo de 2022, cuando co-circulaba Ómicron (B.1.1.529) con los primeros casos de la subvariante BA.2.

La subvariante de Ómicron, BA.2, provoca una enfermedad menos grave que las variantes Delta y Ómicron ⁽²⁴³⁾. Muchos países y regiones experimentaron oleadas sucesivas de infecciones causadas por sublinajes de Ómicron, principalmente BA.2 y BA.5 ⁽²⁴⁶⁾.

Los primeros linajes recombinantes XBB y derivados (XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.1.9, XBB.2.3, EG.5.1, XBB.1.9.2.5.1, HK.3, XBB.1.9.2.5.1.1.3), tuvieron una adaptación suficiente para desplazar a las variantes precedentes. Todas ellas coexisten en un periodo de gran diversidad genética y evolución convergente, conocido como “sopa de variantes” ⁽²⁴⁶⁾.

La vigilancia epidemiológica y genómica son esenciales para adaptar las estrategias de salud pública y mantener la efectividad de las medidas de control ⁽²⁴⁷⁾.

Con la vigilancia genómica se identifican las mutaciones con efectos biológicos negativos potenciales y es crucial para el manejo de los casos a nivel de una comunidad ⁽²⁴⁷⁾. Permite, además, comprender la dinámica de la biodiversidad y las ventajas adaptativas que el virus puede desarrollar. Estas mutaciones influyen en la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y la eficacia de las vacunas y los tratamientos contra la COVID-19 ^(248, 249). También afectan la precisión de las pruebas diagnósticas, lo que complica la detección temprana y el posterior control de la transmisión ⁽²⁴⁸⁾.

Al analizar las mutaciones con efectos biológicos negativos potenciales identificadas en la población villaclareña, se detectaron tres subgrupos, según la frecuencia de mutaciones que se encontraron en las muestras secuenciadas. Existe una relación significativa entre los subgrupos identificados y las variantes genéticas del virus. El 100% de los pacientes con la variante Delta tenían las mutaciones del subgrupo 3; en su mayoría, los casos con las variantes D614G y Beta presentaron las mutaciones del subgrupo 1; la mayoría de casos con Ómicron y sus subvariantes se encontraban en el subgrupo 2 que mostró la mayor variedad de mutaciones.

Los resultados obtenidos coinciden con la investigación “Diversidad genética de aislamientos cubanos del SARS-CoV-2 durante el periodo 2020-2022”, de López Rizo y colaboradores ⁽¹³⁾, donde evidencian que la variante genética Alfa se asocia a 17 mutaciones, y se destaca la “N501Y”. En la variante Beta se detectaron las tres mutaciones en el RBD: K417N, E484K y N501Y. La variante Delta posee diversidad de mutaciones con predominio de L452R, P681R, D614G y T487K. Ómicron se diferencia de otras variantes por las numerosas mutaciones en su genoma.

Los datos obtenidos en el desarrollo de este trabajo coinciden con los hallazgos en Brasil ⁽²⁵⁰⁾, según datos de la red genómica del Instituto Fiocruz, que encuentran circulación de la variante Alfa con siete mutaciones en la proteína S, incluida la N501Y, asociada a mayor afinidad del virus por el receptor ECA2. La variante Beta, con un alto número de mutaciones en las regiones inmunodominantes de la proteína S, incluidos tres mutaciones (K417N, E484K e N501Y), asociadas a mayor afinidad

del virus al receptor y mayor evasión de la respuesta inmunológica. Al igual que en el presente estudio, en la variante Delta identifican 13 mutaciones, incluidas la L452R y la E484Q.

En una investigación realizada por Gómez Osorio y colaboradores ⁽²⁵¹⁾ identificaron las variantes genéticas de mayor relevancia en Colombia. Para las variantes B.1.1.7, B.1.3.5.1, P.1 Gamma reportaron cuatro mutaciones: D614G, E484K, K417T, N501Y, para B.1.617.2 Delta las mutaciones: T478K, L452R, y para B.1.621 muy B.1.1.529.3 las mutaciones: R346K, E484K, N501Y. Este estudio de Colombia reporta la circulación de una variante, la B.1.621 mu, que no circuló en Villa Clara. Las mutaciones con efectos potencialmente negativos identificadas en el resto de las variantes en Villa Clara coinciden con las reportadas en Colombia.

Cuatro de las mutaciones encontradas en la presente investigación (K417N, K417T, N501Y, E484K) coinciden con las identificadas en el Reino Unido por Barton y colaboradores ⁽²⁵²⁾, donde reportan sus efectos biológicos en el SARS-CoV-2. Ellos demuestran el aumento de su afinidad a ECA2. Demuestran también que K417N/T facilita el escape inmunológico y que E484K mejora la unión al receptor y el escape inmunológico.

Otro aspecto a tener en cuenta en el enfoque integral del manejo de una pandemia es el resultado de los estudios filogenéticos. Tienen como propósito fundamental comprender la evolución y propagación del virus a nivel global, regional y local. A través de la secuenciación genómica y la comparación de las distintas variantes virales se identifican las mutaciones clave y los patrones de transmisión, que influyen en la dinámica de la pandemia. También la filogenia proporciona una visión detallada de los mecanismos evolutivos de los virus que tiene implicaciones importantes para el diseño de vacunas y estrategias de control epidemiológico ⁽²⁵³⁾. Estas herramientas filogenéticas fueron aplicadas para los estudios del virus SARS-CoV-2.

El análisis filogenético de las secuencias de las muestras de Villa Clara detectó la presencia de gran variedad de clados. Las secuencias se agruparon según la variante principal de cada rama del árbol filogenético. Las primeras muestras analizadas presentaron la mutación D614G, posteriormente aparecieron clados con

secuencias de las variantes Beta y Delta; Ómicron se detectó en el 62,3% de los casos y presentó la mayor diversidad genética.

Estudios realizados en Estados Unidos ⁽²⁵⁴⁾, Turquía ⁽²⁵⁵⁾, China ⁽²⁵⁶⁾, y Líbano ⁽²⁵⁷⁾ describen cómo ocurre la introducción del virus, la dispersión en cada territorio y la diversidad genética de variantes que circularon.

Un estudio cubano, realizado por Pérez y colaboradores ⁽²⁵⁸⁾ en el LNR-IVR-IPK muestra el análisis filogenético de 34 secuencias del gen S, y se observó la presencia de la mutación D614G en 32 secuencias. Resultados similares obtienen otros investigadores que refieren que al inicio de la pandemia en Cuba se evidenció un bajo nivel de diversidad del genoma viral, debido más a la deriva genética aleatoria, que a la presión selectiva del SARS-CoV-2 ⁽²⁵⁹⁾.

En el contexto de este análisis los resultados obtenidos de las muestras secuenciadas coinciden con la caracterización genética de los aislamientos virales cubanos de SARS-CoV-2 obtenidos en el laboratorio NSB3 del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, donde se muestra una elevada diversidad genética, con un predominio de la variante Ómicron ⁽²²³⁾. También coincide con otra investigación en Ecuador ⁽²⁶⁰⁾ que identificó nueve clados y 160 sublinajes de la variante Ómicron que evolucionaron dinámicamente a lo largo del 2022. El análisis también revela que existen 37 mutaciones puntuales, 19 de ellas que conllevan a cambios de aminoácidos en la glicoproteína S, ejemplo de la diversidad genética de esta variante.

Existieron algunas limitaciones en la presente investigación en sistemas y servicios de salud, realizada en Villa Clara, y que no se pueden dejar de mencionar. Entre ellas, la necesidad de incorporar personal sin experiencia en el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2, al inicio de la pandemia, la utilización de diferentes diagnosticadores y plataformas para la extracción y amplificación de ácidos nucleicos, en dependencia de la disponibilidad del país durante la pandemia. Además, la variación en los protocolos de actuación para el manejo de la COVID-19 a nivel territorial, nacional e internacional a medida que se fue ganando en experiencia, la reutilización de bloques y magnetos para el proceso de extracción, debido a la escasez de recursos a nivel internacional provocado por la pandemia, la

no disponibilidad de un laboratorio de secuencia genómica en la provincia, lo que limitó la posibilidad de realizar los estudios en tiempo real y el número de muestras procesadas.

No obstante, el trabajo integral desarrollado por el LBM del CPHEM de Villa Clara durante la pandemia de COVID-19, fortaleció la formación técnica y profesional de los investigadores y mejoró la capacidad diagnóstica y tecnológica del laboratorio, lo que permite, no sólo mantener el diagnóstico de SARS-CoV-2 en la provincia, sino la detección de nuevos agentes virales emergentes.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

- Los indicadores de desempeño del diagnóstico molecular mediante la RT PCR en tiempo real implementada en LBM de Villa Clara demostraron su robustez como un método válido para el enfrentamiento a la pandemia de COVID-19.
- Se confirma la adaptabilidad de la técnica de RT PCR en tiempo real en entornos provinciales con recursos limitados, superando desafíos económicos y reflejando la capacidad de descentralización diagnóstica, esencial para el sistema de salud cubano.
- La confirmación de casos a partir de la RT- PCR permitió la construcción de datos sólidos en la vigilancia clínico-epidemiológica y virológica para la identificación de patrones en la vigilancia frente a la pandemia de COVID-19 en Villa Clara.
- La integración de herramientas geoespaciales mediante la metodología espacial prospectiva de geo-referenciación de casos permitió identificar focos de transmisión en tiempo real, optimizar recursos sanitarios mediante decisiones basadas en datos y fortalecer la vigilancia epidemiológica integrada.
- La vigilancia genómica del SARS-CoV-2 jugó un papel crucial en la identificación y monitoreo de variantes genómicas, linajes y patrones mutacionales circulantes en la provincia, así como su correlación con cambios clínico-epidemiológicos, lo que tuvo un impacto positivo en las estrategias epidemiológicas y vacunales.
- La implementación del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en el LBM del CPHEM de Villa Clara durante el enfrentamiento a la pandemia de COVID-19 constituye un modelo replicable, establece un precedente en la detección temprana integral (molecular, geoespacial y genómica) y ofrece lecciones para respuestas locales eficientes en países con limitaciones de insumos.

RECOMENDACIONES

VII. Recomendaciones

- Mantener el diagnóstico y el monitoreo continuo de las variantes genéticas de SARS-CoV-2 mediante la vigilancia genómica, que permita identificar rápidamente la aparición de nuevas variantes potencialmente peligrosas y responder de forma pro-activa en el control de una epidemia.
- Fomentar la mejora continua del personal del laboratorio en técnicas moleculares y vigilancia genómico para asegurar la capacidad de respuesta ante nuevas emergencias epidémicas.
- Desarrollar modelos predictivos, utilizando la inteligencia artificial, que incorporen resultados virológicos y elementos clínico-epidemiológicos, que faciliten la toma de decisiones en salud para el control de futuras epidemias.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

- 1- Dabancha J. Emergencia de SARS-CoV-2: aspectos básicos sobre su origen, epidemiología, estructura y patogenia para clínicos [Internet]. *Rev Med Clin Condes*. 2021 [citado 2021 jun 11];32(1):456-69. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7849593/>
- 2- Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-CoV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud: recomendaciones basadas en consenso de expertos e informadas en la evidencia [Internet]. *Infectio*. 2020 [citado 2021 jun 11];24(3 Suppl 1):1-XX. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v24n3s1/0123-9392-inf-24-03-s1-77.pdf>
- 3- Pastrian-Soto G. Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2): mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune [Internet]. *Int J Odontostomat*. 2020 [citado 2021 jun 11];14(3):331-7. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v14n3/0718-381X-ijodontos-14-03-331.pdf>
- 4- Organización Mundial de la Salud. La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [citado 2024 may 16]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia>
- 5- World Health Organization. Timeline: WHO's COVID-19 response [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [citado 2024 may 16]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---COVID-19>
- 6- Denis-Rodríguez M, Luis-León C. Similitudes y diferencias entre el síndrome respiratorio agudo severo causado por SARS-CoV y la COVID-19 [Internet]. *Rev Cubana Pediatr*. 2020 [citado 2025 feb 19];92(Suppl 1):[aprox. 20 pantallas]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v92s1/1561-3119-ped-92-s1-e1223.pdf>

- 7- Henriquez-Cruz L, Peña-Herrera G, Cercado-Jean P. Pruebas diagnósticas de laboratorio para Covid-19: un análisis de la sensibilidad y la especificidad [tesis de grado en Internet]. [Ecuador]: Universidad Estatal del Sur de Manabí; 2020 [citado 2025 feb 19]. Disponible en:
<https://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2522>
- 8- Grupo de Análisis Científico del Coronavirus. Origen del coronavirus SARS-CoV-2 [Internet]. 2021 [citado 2022 feb 20];[aprox. 4 pantallas]. Disponible en:
<https://www.isciii.es/w/origen-del-coronavirus-sars-cov-2>
- 9- Urgilés-Esquivel J, Gerardo-Ortiz J. Métodos diagnósticos de laboratorio para coronavirus 2019 n-cov [Internet]. *VIVE Rev Invest Salud*. 2021 [citado 2024 may 16];4(10):107-27. Disponible en:
<http://www.scielo.org.bo/pdf/vrs/v4n10/2664-3243-vrs-4-10-107.pdf>
- 10-Aguilar-Ramírez P, Enriquez-Valencia Y, Quiroz-Carrillo C, Valencia-Ayala E, de León-Delgado, Pareja-Cruz A. Pruebas diagnósticas para la COVID-19: la importancia del antes y el después [Internet]. *Horiz Med*. 2020 [citado 2024 may 16];20(2):[aprox. 7 pantallas]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v20n2/1727-558X-hm-20-02-e1231.pdf>
- 11-Salas-Asencios R, Iannacone-Oliver J, Guillén-Oneeglio A, Tantaléan-Da Fieno J, Alvariño-Flores L, Castañeda-Pérez L, et al. Coronavirus Covid-19: conociendo al causante de la pandemia [Internet]. *Biologist (Lima)*. 2020 [citado 2024 may 16];18(1):9-27. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/9397965.pdf>
- 12-Aguilar-Gamboa FR, Suclupe-Campos DO, Vega-Fernández JA, Silva-Diaz H. Diversidad genómica en SARS-CoV-2: mutaciones y variantes [Internet]. *Rev Cuerpo Med HNAAA*. 2021 [citado 2022 abr 16];14(4):572-82. Disponible en:
<http://cmhnaaa.org.pe/ojs/index.php/rcmhnaaa/article/download/1465/556/6163>
- 13-López-Rizo LS, Machado-Zaldívar LY, Noa-Romero E, Blanco de Armas M, Enríquez-Puertas J, Romay D. Diversidad genética de aislamientos cubanos del SARS-CoV-2 durante el periodo 2020-2022 [Internet]. En: *Cuba Salud*

2022. *IV Convención Internacional de Salud*; 2022 oct 17–21; La Habana (Cuba). La Habana: Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil; 2022 [citado 2024 jun 22]. 7 p. Disponible en:

<https://convencionsalud.sld.cu/index.php/convencionsalud22/2022/paper/download/2447/>

- 14-Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, et al. From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants [Internet]. *Gene*. 2022 [citado 2024 may 16];814:1–5. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8725615/pdf/main.pdf>

- 15-Reina J, Fraile-Ribot P. Impact of spike genetic variants in vaccines against SARS-CoV-2 [Internet]. *Vacunas*. 2021 [citado 2024 may 16];22(2):59–61.

Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8040529/pdf/main.pdf>

- 16-García LML, Bautista CP, Ángel AAH. Caracterización genómica y variantes del virus SARS-CoV-2 [Internet]. *Acta Méd*. 2021 [citado 2024 may 16];19(3):445–56. Disponible en:

<https://www.mediagraphic.com/pdfs/actmed/am-2021/am213v.pdf>

- 17-Organización Mundial de la Salud. Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2 [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [citado 2024 may 16];[aprox. 3 pantallas]. Disponible en:

<https://www.biolabltida.cl/2021/09/28/clasificaciones-y-definiciones-de-las-variantes-del-sars-cov-2/>

- 18-Organización Mundial de la Salud. Número acumulado de casos de coronavirus en el mundo desde el 22 de enero de 2020 hasta el 2 de agosto de 2023 [Internet]. Ginebra: OMS; 2023 [citado 2024 may 16];[aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1104227/numero-acumulado-de-casos-de-coronavirus-covid-19-en-el-mundo-enero-marzo/>

- 19-Organización Panamericana de la Salud. *Monthly COVID-19 Epidemiological Update – Region of the Americas* [Internet]. Washington: OPS; 2023 [citado 2024 may 16]. 12 p. Disponible en:

<https://www.paho.org/sites/default/files/2023-07/sitreprementmonthly2023-06-28.pdf>

- 20-Ministerio de Salud Pública. Ingresos y muestras estudiadas en Cuba: parte de cierre del 23 al 31 de diciembre de 2023 [Internet]. La Habana: MINSAP; 2023 [citado 2024 may 16];[aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <https://salud.msp.gob.cu/parte-de-cierre-del-23-al-31-de-diciembre-de-2023/>
- 21-Organización Panamericana de la Salud. *Laboratory guidelines for detection and diagnosis of the novel coronavirus (2019-nCoV) infection* [Internet]. Washington, DC: OPS; 2020 [citado 2021 jun 8]. 10 p. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-novel-coronavirus-2019-ncov-infection>
- 22-Acosta-Herrera B. Virus respiratorios emergentes en Cuba en el período 2005–2010 [tesis doctoral en Internet]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; 2012 [citado 2024 may 16]. 159 p. Disponible en: <https://tesis.sld.cu/index.php?P=DownloadFile&Id=712>
- 23-Organización Mundial de la Salud. *Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance* [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [citado 2021 jun 8]. 10 p. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52140/PAHOPHEIMSCOV-19200003_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 24-Sánchez-Alvarez MDL, Roque de Escobar-Martín HD, Delgado-Cura N. Detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real en el Laboratorio de Biología Molecular de Villa Clara [Internet]. *Medicentro Electron*. 2020 [citado 2024 may 16];24(3):470–5. Disponible en: <https://medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/download/3273/2574>
- 25-Salazar-Carranza LA, Maldonado-Santacruz FE, Cruz-Villegas JA. La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID-19 [Internet]. *Recimundo*. 2020 [citado 2024 may 16];4(2):64–74. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/download/824/1722/2276>

- 26-Yin NDS, Daubie V. Leveraging of SARS-CoV-2 PCR cycle thresholds values to forecast COVID-19 trends [Internet]. *Front Med (Lausanne)*. 2021 [citado 2024 may 16];8:1–9. Disponible en:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8591051/pdf/fmed-08-743988.pdf>
- 27-Walker AS, House T, Robotham JV, Birrell PJ, Bell I, Pouwels KB, et al. Ct threshold values, a proxy for viral load in community SARS-CoV-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time [Internet]. *eLife*. 2021 [citado 2021 jun 19];10:25 p. Disponible en:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8282332/pdf/elife-64683.pdf>
- 28-Singanayagam APM, Charlett A, Lopez BJ, Saliba V, Ellis J, Ladhani S, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020 [Internet]. *Euro Surveill*. 2020 [citado 2021 jun 19];25(32):1–5. Disponible en:
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>
- 29-Aguilar-Gamboa FR. Desarrollo y aplicación de técnicas innovadoras de biología molecular para mejorar la detección del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19 [Internet]. *Rev Exp Med*. 2023 [citado 2024 mar 3];9(3):167–73. Disponible en:
<https://www.rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/download/707/415/4506>
- 30-Acevedo Muñoz W, Benadof Fuentes DN, Farfán Urzúa MJ. Rol de los laboratorios públicos en el diagnóstico SARS-CoV-2 en la pandemia de COVID-19: experiencia, desafíos y oportunidades [Internet]. *Rev Chil Infectol*. 2021 [citado 2024 may 16];38(2):135–43. Disponible en:
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/184641/Role-of-public-laboratories-in-the-SARS-CoV-2-diagnosis.pdf?sequence=1>
- 31-Contreras H, Gastelbondo-Pastrana B, Torres K, Contreras V, Echeverri-De la Hoz D, et al. Resultados del aprendizaje del IIBT durante la pandemia: detección molecular de SARS-CoV-2. En: Máttar S, Gastelbondo-Pastrana B, editores. *Lecciones aprendidas del COVID-19: Una mirada interdisciplinaria*

[Internet]. Colombia: Editorial CECAR; 2023 [citado 2024 may 16]. p. 209–29.
Disponible en:

<https://repositorio.cecar.edu.co/server/api/core/bitstreams/b26fc0d4-bdee-4dc5-a614-376194212983/content>

32-Portal Miranda JA. Intervención en la Asamblea Nacional del Poder Popular. La ciencia y la innovación tecnológica en el enfrentamiento a la COVID-19

[Internet]. *INFODIR*. 2024 [citado 2024 dic 29];(33):7 p. Disponible en:
<https://revinfodir.sld.cu/index.php/infodir/article/download/1047/1250>

33-Durán-García FA. *Epidemiología de la Covid-19* [tesis doctoral en Internet]. [La Habana]: Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Escuela de Salud Pública; 2022 [citado 2024 abr 22]. 157 p. Disponible en:

<https://revinfodir.sld.cu/index.php/infodir/article/download/1382/1676>

34-Cordero-Lezama A. COVID-19: una zoonosis esperadamente inesperada [Internet]. *Herreriana*. 2021 [citado 2021 jun 12];2(2):6–8. Disponible en:

<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/herreriana/article/download/6125/7771/>

35-Zi-Wei Y, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses [Internet]. *Int J Biol Sci*. 2020 [citado 2021 jun 12];16(10):1686–97. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7098031/pdf/ijbsv16p1686.pdf>

36-Nauque-Villacís JD. *Análisis comparativo de las proteínas espiga de los coronavirus: MERS CoV, SARS CoV y SARS-CoV-2 y sus respectivos receptores* [tesis doctoral en Internet]. [Ecuador]: Universidad Técnica de Ambato; 2021 [citado 2024 may 16]. 94 p. Disponible en:

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstreams/7d50a42f-fac7-4162-91c3-34d19be1a446/download>

37-Rivera-Silva G, León-Orsonio O. Las zoonosis emergentes y la infección provocada por el SARS-CoV-2 [Internet]. *Rev Méd Sinergia*. 2021 [citado 2021 jun 12];6(3):e656. 2 p. Disponible en:

<https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/download/656/1176/5992>

- 38-Piña-Sánchez P. Biología del SARS-CoV-2: hacia el entendimiento y tratamiento de COVID-19 [Internet]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2020 [citado 2021 jun 12];58(Suppl 2):194–214. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4577/457769376010/457769376010.pdf>
- 39-Cabrera KLL, Ordóñez K, Sierra FA. Revisión rápida sobre la utilidad del Umbral de Ciclos de la RT-PCR en pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 [Internet]. Colombia: Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud; 2020 [citado 2024 abr 22]. 13 p. Disponible en: [https://www.iets.org.co/Archivos/18.RSrapida_Utilidad_Ct_en_RT-PCRpara_COVID-19\(VA\).pdf](https://www.iets.org.co/Archivos/18.RSrapida_Utilidad_Ct_en_RT-PCRpara_COVID-19(VA).pdf)
- 40-Pipes L, Wang H, Huelsenbeck JP, Nielsen R. Assessing uncertainty in the rooting of the SARS-CoV-2 phylogeny [Internet]. *Mol Biol Evol*. 2021 [citado 2024 jun 4];38(4):1537–43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7798932/pdf/msaa316.pdf>
- 41-Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19 [Internet]. *Viruses*. 2020 [citado 2024 jun 4];12(4):372. 17 p. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232198/pdf/viruses-12-00372.pdf>
- 42-Rodríguez-Duque R, Rodríguez-Moldón Y, Díaz-Armas MT. Genes humanos asociados a la infección por el SARS-CoV-2 [Internet]. *Gac Méd Espirit*. 2022 [citado 2024 jun 6];24(1):102–19. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/gme/v24n1/1608-8921-gme-24-01-102.pdf>
- 43-Arandia-Guzmán J, Antezana-Llaveta G. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19 [Internet]. *Gac Med Bol*. 2020 [citado 2024 jun 6];43(2):93–102. Disponible en: https://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009

- 44-Lam-Cabanillas E, León-Risco A, León-Risco K, Llamo-Hoyos G, López-Zavaleta R, Luzuriaga-Tirado E, et al. Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios *in silico* de posibles tratamientos farmacológicos [Internet]. *Rev Fac Med Hum*. 2021 [citado 2024 jun 6];21(2):417–32. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rfmh/v21n2/2308-0531-rfmh-21-02-417.pdf>
- 45-Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy [Internet]. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 [citado 2024 jun 6];6(1):233. 19 p. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8193598/pdf/41392_2021_Article_653.pdf
- 46-Forero-Argüello H, Hernández-Martínez A, Lobo-Moncada D, García-Bohórquez DF, Fajardo-Rivera JE. Caracterización y fisiopatología del Sars-Cov-2: revisión de la literatura actual [Internet]. *Médicas UIS*. 2021 [citado 2024 jun 11];34(2):61–75. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v34n2/1794-5240-muis-34-02-61.pdf>
- 47-Behl T, Kaur I, Aleya L, Sehgal A, Singh S, Sharma N, et al. CD147-spike protein interaction in COVID-19: get the ball rolling with a novel receptor and therapeutic target [Internet]. *Sci Total Environ*. 2021 [citado 2024 may 16];808:152072. 14 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8634688/pdf/main.pdf>
- 48-Sociedad Argentina de Virología, Asociación Argentina de Microbiología. Informe sobre SARS-CoV-2 [Internet]. Argentina: Sociedad Argentina de Virología; 2020 [citado 2024 jun 11]. 13 p. Disponible en: <https://fibamdp.wordpress.com/wp-content/uploads/2020/03/informe-coronavirus-19-03-2020-sociedad-argentina-de-virologia.pdf>
- 49-Cobar-Pino OM. *Mutaciones del SARS-CoV-2; estructura e implicaciones: revisión de literatura* [Internet]. 2021 [citado 2024 abr 22]. 39 p. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/349826783>

- 50-Arandia-Guzmán J, Antezana-Llaveta G. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19 [Internet]. *Gac Méd Bol*. 2020 [citado 2024 jun 11];43(2):93–102. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/pdf/gmb/v43n2/v43n2a9.pdf>
- 51-Oliva-Marín JE. SARS-CoV-2: origen, replicación y patogénesis [Internet]. *Alerta*. 2020 [citado 2024 jun 11];3(2):79–86. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/09/1095641/document.pdf>
- 52-Chaparro-Merida NA, Franco A. Aspectos clínicos e inmunológicos de la infección por SARS-CoV-2 [Internet]. *Salud UIS*. 2020 [citado 2024 jun 11];52(3):295–309. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v52n3/2145-8464-suis-52-03-295.pdf>
- 53-Alhusseini LB. Persistence of SARS-CoV-2: a new paradigm of COVID-19 management [Internet]. *Ann Ig*. 2021 [citado 2024 jun 11];33(5):426–32. Disponible en: <https://www.annali-igiene.it/articoli/2021/5/03-Al-Husseini.pdf>
- 54-Ashutosh K, Narayan RK, Prasoon P, Kumari Ch, Kaur G, Kumar S, et al. Mecanismos del COVID-19 en el cuerpo humano: lo que sabemos hasta ahora [Internet]. *Kompass Neumol*. 2022 [citado 2024 jun 11];4(1):3–20. Disponible en: https://cofybcf.org.ar/src/img_up/14072022.0.pdf
- 55-Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento [Internet]. *Gac Méd Méx*. 2021 [citado 2024 jun 4];157(1):88–93. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v157n1/0016-3813-gmm-157-1-88.pdf>
- 56-Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. The role of neuropilin-1 (NRP-1) in SARS-CoV-2 infection: review [Internet]. *J Clin Med*. 2021 [citado 2024 jun 4];10(13):2772. 13 p. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/13/2772>
- 57-Esqueff-Díaz N, Roche-González ER, Jacomino-Fernández D, Sánchez-Gutiérrez L. Bases fisiopatológicas de las manifestaciones clínicas de la COVID-19 [Internet]. *Rev Electron Medimay*. 2022 [citado 2024 jun

11];29(3):447–62. Disponible en:

<https://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/download/1861/pdf/6602>

58-Espinosa-Rosales FJ. Inmunopatología de la infección por virus SARS-CoV-2 [Internet]. *Acta Pediatr Méx.* 2020 [citado 2024 jun 11];41(Supl 1):S42–S50.

Disponible en:

<https://ojs.actapediatrica.org.mx/index.php/APM/article/download/2070/1195>

59-Soriano-Torres O, González-Losada C, Veitía-Quintana D. Elementos de la dinámica de la respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2 [Internet]. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2021 [citado 2024 jun 12];40(2):e1014. 10 p.

Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v40n2/1561-3011-ibi-40-02-e1014.pdf>

60-Sanz JM, Gómez-Lahoz AM, Martín RO. Papel del sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: inmunopatología de la COVID-19 [Internet]. *Medicine (Madr).* 2021 [citado 2024 jun 12];13(33):1917–31. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8158328/pdf/main.pdf>

61-Valdés-Cabodevilla RC, Montero-López IL, Castillo-López W. Respuesta inmune al SARS-CoV-2 e inmunoterapia anti-COVID-19 [Internet]. *Pol Con.* 2022 [citado 2024 jun 12];7(8):2072–92. Disponible en:

<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/9042780.pdf>

62-Alves-Cunha AL, Quispe-Cornejo AA, Ávila-Hilari A, Valdivia-Cayojá A, Chino Mendoza JM, Vera Carrasco OM. Breve historia y fisiopatología del COVID-19 [Internet]. *Rev Cuadernos Hosp Clín.* 2020 [citado 2024 jun 12];61(1):130–43.

Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/chc/v61n1/v61n1_a11.pdf

63-Sánchez-Valverde AJ, Miranda-Temoche CE, Castillo-Caicedo CR, Arellano-Hernández NB, Tixe Padilla M. Covid-19: fisiopatología, historia natural y diagnóstico [Internet]. *Rev Eugenio Espejo.* 2021 [citado 2024 jun 12];15(2):98–114. Disponible en:

<https://eugenioespejo.unach.edu.ec/index.php/EE/article/download/223/23/908>

64-Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Venkata-Prasad P, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms

- [Internet]. *JAMA Netw Open*. 2021 [citado 2024 jun 12];4(1):e2035057. 7 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7791354/>
- 65-Noriega-Bravo VPBM, Corral-Martín A, Álvarez-Lauzarique ME, Bonet-Gorbea M. La infección asintomática por el SARS-CoV-2: evidencias para un estudio poblacional en Cuba [Internet]. *Rev Cubana Salud Pública*. 2020 [citado 2024 jun 12];46(Supl 1 esp):e2707. 10 p. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v46s1/1561-3127-rcsp-46-s1-e2707.pdf>
- 66-Pulgar ARC. Revisión narrativa: enfermedad por Coronavirus 19 (COVID-19) [Internet]. *Acta Cient Estud*. 2020 [citado 2024 jun 12];13(2):35–46. Disponible en: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACE/article/view/19221/144814485602
- 67-Sánchez-Valverde AJ, Aparicio-Díaz K, Miranda-Temoche CE, Castillo-Caicedo CR, Arellano-Hernández NB. COVID-19: epidemiología, virología y transmisibilidad [Internet]. *Rev Eugenio Espejo*. 2021 [citado 2024 jun 12];15(3):90–104. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2661-67422021000300090
- 68-Tom MRM, Mina MJ. To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value [Internet]. *Clin Infect Dis*. 2020 [citado 2024 jun 12];71(16):2252–4. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article-pdf/doi/10.1093/cid/ciaa619/34393078/ciaa619.pdf>
- 69-Ghanbarian M, Mahdavi S, Enayatrada M, Zare F, Majidnia M, Emamian MH, et al. Spatial distribution of COVID-19 in Shahrud [Internet]. Iran: Using GIS; 2020 [citado 2024 jun 12]. 13 p. Disponible en: https://www.preprints.org/frontend/manuscript/81c47eb66dad3eafce6bd531592ba8c5/download_pub
- 70-Sampaio SA, Cunha GCS, de Souza-Reis F, Souza SO. Análise espacial dos casos da COVID-19 e leitos de terapia intensiva no estado da Bahia-Brasil [Internet]. *Hygeia*. 2021 [citado 2022 nov 20];17:198–215. Disponible en:

https://web.archive.org/web/20220518121733id_/https://seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/download/58324/32527

- 71-Pinilla-BG, Cruz-BCA, Navarrete-OJ. Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 [Internet]. *NOVA*. 2020 [citado 2022 nov 20];18(spe35):33–9. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v18nspe35/1794-2470-nova-18-spe35-35.pdf>
- 72-Escalante-Maldonado O, Vidal-Anzardo M, Donaires F, Solis-Sanchez G, Gallesi I, Pampa-Espinoza L, et al. Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2 [Internet]. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2021 [citado 2024 jun 13];38(1):7–16. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v38n1/1726-4642-rins-38-01-7.pdf>
- 73-Herrera EM. Diagnóstico de laboratorio de SARS-CoV2 [Internet]. *Rev Invest Universit Salud*. 2020 [citado 2024 jun 13];2(2):25–9. Disponible en: <https://publicaciones.uap.edu.ar/index.php/revistaRIUS/article/download/909/839>
- 74-Organización Panamericana de la Salud. Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19 [Internet]. Ginebra: OPS; 2020 [citado 2024 jun 13]. 11 p. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID-19200038_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 75-Abreu-Duarte R, Sánchez-Álvarez ML, González-Lorenzo L, Delgado-Cura NR, Rivero-Pérez YF, Sánchez-Padrón G. Aspectos relacionados con la toma de muestra en la detección de SARS-CoV-2 en Villa Clara [Internet]. *Acta Méd Centro*. 2022 [citado 2024 jun 14];16(4):738–46. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/amdc/v16n4/2709-7927-amdc-16-04-738.pdf>
- 76-Morales-Angulo C, González-Zubizarreta R, Martín-Toca G, Ramírez-Bonilla A, Gozalo-Margüello M, Rodríguez-Fernández A. Toma de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de COVID-19 [Internet]. *Rev ORL*. 2020

[citado 2024 jun 14];11(4):389–94. Disponible en:

<https://scielo.isciii.es/pdf/orl/v11n4/2444-7986-orl-11-04-389.pdf>

- 77-López P, Ballesté R, Seija V. Diagnóstico de laboratorio de COVID-19 [Internet]. *Rev Méd Urug*. 2020 [citado 2024 jun 14];36(4):131–55. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v36n4/1688-0390-rmu-36-04-131.pdf>
- 78-Instituto Nacional de Salud del Niño. Guía de procedimiento para toma de muestra de secreción nasofaríngea para la detección de SARS-CoV-2 [Internet]. Perú: INSN; 2023 [citado 2024 jun 14]. 11 p. Disponible en: <https://www.insnsb.gob.pe/docstrans/resoluciones/archivopdf.php?pdf=2023%20FGP+N50-Toma+de+Muestra+hisopado+COVID.pdf>
- 79-Cuba-Quispe RO. Influencia de la carga viral, extracción de ARN y conservación de las muestras en el diagnóstico de COVID-19 mediante la PCR-RT en tiempo real [tesis doctoral]. [Huancavelica]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2022 [citado 2024 jun 13]. 94 p. Disponible en: <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/f39956b2-c59d-4838-b70f-6ed1d1a454a5/content>
- 80-Duré R, González S, Zarate RN, Fernández A, García Y, Martínez de Filartiga M. Reutilizar, un acto poco trabajado en biología molecular. Aprendizaje de la pandemia por SARS-CoV-2 [Internet]. *Cienc Lat Rev Cient Multidiscip*. 2022 [citado 2024 jun 20];6(2):612–30. Disponible en: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/1910/2719>
- 81-Onoda M, Martínez-Chamorro MJ. Pruebas diagnósticas de laboratorio de COVID-19 [Internet]. España: Grupo de Patología Infecciosa de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria; 2020 [citado 2024 jun 20]. 9 p. Disponible en: https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/pruebas_diagnostics_de_laboratorio_de_covid_vfinal.pdf
- 82-Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real [Internet]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 [citado 2024 abr 20];22(5):299–305. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas->

[microbiologia-clinica-28-articulo-reaccion-cadena-polimerasa-pcr-tiempo-S0213005X0473092X](#)

- 83-Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real [Internet]. *Invest Discap*. 2013 [citado 2024 abr 20];2(2):70–8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- 84-Vibholm LK, Nielsen SSF, Pahus MH, Frattari GS, Olesen R, Andersen R, et al. SARS-CoV-2 persistence is associated with antigen-specific CD8 T-cell responses [Internet]. *EBioMedicine*. 2021 [citado 2024 jun 20];64:103230. 10 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7847186/pdf/main.pdf>
- 85-Reijns MAM, Thompson L, Acosta JC, Black HA, Sánchez-Luque FJ, Diamond A, et al. A sensitive and affordable multiplex RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 detection [Internet]. *PLoS Biol*. 2020 [citado 2024 jun 20];18(12):e3001030. 18 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7771873/pdf/pbio.3001030.pdf>
- 86-Daniel-Gutiérrez L, Batista-Lozada Y, Mokdse-Beltrán Y, González-González YJ. Características analíticas del ensayo RT-PCR en tiempo real SUMASIGNAL SARS-CoV-2 para la detección del gen de envoltura del SARS-CoV-2 [Internet]. En: Convención Internacional de Salud; 2022 oct 17–21; La Habana (Cuba). La Habana: Palacio de Convenciones; 2022 [citado 2024 jun 20]. 8 p. Disponible en: <https://convencionsalud.sld.cu/index.php/convencionsalud22/2022/paper/download/2951/1599>
- 87-Salvatore PP, Reses HE, Vuong J, Pawloski TD, Bhattacharyya S, et al. Epidemiological correlates of polymerase chain reaction cycle threshold values in the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [Internet]. *Clin Infect Dis*. 2021 jul;72(11):e761–e767 [citado 2024 abr

20]. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7543310/pdf/ciaa1469.pdf>

- 88-Goldschmidt P. Dificultades en la detección de genomas del nuevo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [Internet]. *Rev Argent Salud Pública*. 2020 [citado 2024 abr 20];12(Suppl 7):e17. 6 p. Disponible en: https://web.archive.org/web/20210116163428id_/http://rasp.msal.gov.ar/rasp/articulos/vol12supl/REV_Goldschmidte17.pdf
- 89-Díaz-Alonso C, Garrote-Santana H, Amor-Vigil AM, Suárez-González Y, Fernández-Martínez L, Ruiz-Moleón V. Nuevos métodos de extracción de ácidos nucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular [Internet]. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2015 [citado 2024 abr 20];31(4):466–9. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v31n4/hih15415.pdf>
- 90-Thermo Fisher Scientific. PCR en tiempo real: Qué es el Ct y cómo interpretarlo [Internet]. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific Inc.; [fecha desconocida] [citado 2025 jun 1]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
- 91-Rozenberg G, Erster O, Ghersin I, Mandelboim M, Neuberger A, Schwartz E. Evaluation of the relationship between quantitative PCR results and cell culturing of SARS2-CoV with respect to symptoms onset and viral load – a systematic review [Internet]. *medRxiv*. 2021 [citado 2024 abr 20]. 19 p. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.23.21262162v1.full.pdf>
- 92-Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer [Internet]. *Int J Mol Sci*. 2020 [citado 2024 abr 20];21(8):3004. 18 p. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/3004>
- 93-Serrano-Cumplido A, Ruiz-García A, Segura-Fragoso A, Olmo-Quintana V, Micó-Pérez RM, Barquilla-García A, Morán-Bayón A. Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19 [Internet].

Semergen. 2021 [citado 2024 dic 2];47(5):337–41. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8156904/pdf/main.pdf>

94-Cruz-Loustaunau D, Álvarez-Hernández G, Candia-Plata MC, Leyva-Gastelum M. Tiempo de ciclado y carga viral en pacientes infectados por SARS-CoV-2 en Sonora, México [Internet]. *Gac Med Mex*. 2023 [citado 2024 abr 20];159(3):231–7. Disponible en:

https://www.gacetamedicademexico.com/files/gmm_23_159_3_231-237.pdf

95-Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2 [Internet]. *BMJ*. 2020 [citado 2024 abr 20];371:m3862. 10 p. Disponible en:

<https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3862.full.pdf>

96-El Zein S, Chehab O, Alkassis S, Mishra T, Trivedi V, et al. Declining trend in the initial SARS-CoV-2 viral load during the pandemic: preliminary observations from Detroit, Michigan [Internet]. *medRxiv*. 2020 [citado 2024 abr 20]. 9 p. Disponible en:

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.16.20231597v1.full.pdf>

97-Gavina K, Franco LC, Robinson CM, Hymas W, Lei GS, Sinclair W, et al. Standardization of SARS-CoV-2 cycle threshold values: multisite investigation evaluating viral quantitation across multiple commercial COVID-19 detection platforms [Internet]. *Microbiol Spectr*. 2023 [citado 2024 abr 20];11(1):e04470-22. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9927101/pdf/spectrum.04470-22.pdf>

98-Díaz-Jiménez IV. Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-CoV-2 [Internet]. *Acta Pediatr Méx*. 2020 [citado 2024 abr 20];41(Supl 1):S51–S57. Disponible en:

<https://ojs.actapediatrica.org.mx/index.php/APM/article/download/2079/1196>

99-Niu P, Lu R, Zhao L, Wang H, Huang B, Ye F, et al. Three novel real-time RT-PCR assays for detection of COVID-19 virus [Internet]. *China CDC Wkly*. 2020 [citado 2024 abr 20];2(25):453–7. Disponible en:

<https://weekly.chinacdc.cn/fileCCDCW/journal/article/ccdcw/2020/25/PDF/PCR.pdf>

- 100-Organización Mundial de la Salud. Protocol: real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 [Internet]. París: Institut Pasteur; 2020 [citado 2024 abr 20]. 9 p. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>
- 101-Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, Kamili S, et al. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [Internet]. *Emerg Infect Dis*. 2020 [citado 2024 abr 20];26(8):1654–65. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7392423/pdf/20-1246.pdf>
- 102-Shirato K, Nao N, Katano H, Takayama I, Saito S, Kato F, et al. Development of genetic diagnostic methods for detection for novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan [Internet]. *Jpn J Infect Dis*. 2020 [citado 2024 abr 20];73(4):304–7. Disponible en: https://www.istage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2020.061/_pdf
- 103-Chu DKW, Poon LLM, Peiris M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR [Internet]. Hong Kong: HKU Med; 2020 [citado 2024 abr 20]. 6 p. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf>
- 104-Department of Medical Sciences. This document contains RT-PCR protocol for the detection of 2019-nCoV [Internet]. Tailandia: Ministry of Public Health; 2023 [citado 2024 abr 20]. 6 p. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.pdf>
- 105-Puenpa J, Suwannakarn K, Chansaenroj J, et al. Molecular epidemiology of the first wave of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection in Thailand in 2020 [Internet]. *Sci Rep*. 2020 [citado 2024 abr 20];10:16602. 11 p. Disponible en:

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7538975/pdf/41598_2020_Article_73554.pdf

- 106-Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR [Internet]. Berlín: Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2020 [citado 2024 abr 20]. 11 p. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>
- 107-Nalla AK, Casto AM, Huang MLW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit [Internet]. *J Clin Microbiol*. 2020 [citado 2024 abr 20];58(6):e00557-20. 10 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7269385/pdf/JCM.00557-20.pdf>
- 108-Reina J, Suárez L. Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección [Internet]. *Rev Esp Quimioter*. 2021 [citado 2024 abr 20];34(3):210–4. Disponible en: https://seq.es/seq/2021/vol34_3/34_3_2021_reina.pdf
- 109-Delgado-López SN, Pincay-Castillo JA. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 y sus variantes [tesis doctoral en Internet]. Ecuador: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí; 2023 [citado 2024 abr 20]. 72 p. Disponible en: <https://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/4902/1/Delgado%20L%c3%b3pez%20Sabrina%20Nicole%20-%20Pincay%20Castillo%20Juan%20Alberto.pdf>
- 110-Ochoa-Sangrador C, Orejas G. Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): pruebas diagnósticas [Internet]. *An Esp Pediatr*. 1999 [citado 2024 abr 20];50(3):301–14. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/50-3-19.pdf>
- 111-Martín-Conejero A. Validación de test diagnósticos (primera parte). Test categóricos [Internet]. *Angiología*. 2023 [citado 2025 jun 1];75(2):101–105. Disponible en: <https://www.revistaangiologia.es/filesPortalWeb/1157/MA-00473-01.pdf>

- 112-Sagaró del Campo NM, Zamora-Matamoros L. Evolución histórica de las técnicas estadísticas y las metodologías para el estudio de la causalidad en ciencias médicas [Internet]. *MEDISAN*. 2019 [citado 2024 abr 20];23(3):534–56. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/journal/3684/368460217013/368460217013.pdf>
- 113-Molina-Arias M, Ochoa-Sangrador C. Evaluación de la validez de las pruebas diagnósticas (III): valores predictivos [Internet]. *Evid Pediatr*. 2016 [citado 2024 abr 20];12:69. Disponible en: https://evidenciasenpediatria.es/files/41-12906-RUTA/Fundamentos_MBE_69.pdf
- 114-Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica [Internet]. *Av Biomed*. 2012 [citado 2024 abr 20];1(2):73–81. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/3313/331328015005.pdf>
- 115-Ongay-Larios L, Códiz-Huerta G. Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger [Internet]. *Mens Bioquím*. 2021 [citado 2024 abr 20];45:23–34. Disponible en:
<http://biosensor.facmed.unam.mx/mensajebioquimico/wp-content/uploads/2021/06/6-Ongay-Larios-secuenciacion.pdf>
- 116-Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica [Internet]. *Univ Med*. 2020 [citado 2024 abr 20];61(2):49–60. Disponible en:
<https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/download/27461/24137/113245>
- 117-Rojas-Villalta D, Benavides-Villegas D, Angulo-Hidalgo B, Muñoz-Solorzano L, Consumi-Tubito C. Caracterización de las tecnologías de secuenciación genética de segunda y tercera generación [Internet]. *Rev Tecnol Marcha*. 2024 [citado 2024 abr 20];37(2):70–81. Disponible en:
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v37n2/699878260009.pdf>
- 118-Hernández M, Quijada NM, Rodríguez D, Eiros JM. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico

[Internet]. *Rev Argent Microbiol*. 2020 [citado 2024 abr 20];52(2):150–61.

Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300811>

119-Organización Mundial de la Salud. Secuenciación del genoma del SARS-CoV-2 con fines de salud pública: orientaciones provisionales [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021 [citado 2024 abr 20]. 21 p. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338892/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1-spa.pdf

120-Urrutikoetxea-Gutierrez M, Ugalde-Zarraga E, Gallego-Rodrigo M, Díaz de Tuesta del Arco JL. Aparición de novo de la mutación E484K en una variante del linaje B.1.1.7 de SARS-CoV-2 [Internet]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2022 [citado 2024 abr 20];40(9):520–2. Disponible en: <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S0213005X21002251&r=28>

121-Yang WT, Huang WH, Liao TL, Hsiao TH, Chuang HN, Liu PY, et al. SARS-CoV-2 E484K mutation narrative review: epidemiology, immune escape, clinical implications, and future considerations [Internet]. *Infect Drug Resist*. 2022 [citado 2024 abr 20];15:373–85. Disponible en: <https://www.dovepress.com/sars-cov-2-e484k-mutation-narrative-review-epidemiology-immune-escape--peer-reviewed-fulltext-article-IDR>

122-Agencia FAPESP. La variante gamma (P.1) es más agresiva, pero puede frenársela con vacunas y confinamiento [Internet]. 2021 [citado 2024 abr 20]. Disponible en: <https://agencia.fapesp.br/la-variante-gamma-p1-es-mas-agresiva-pero-puede-frenarsela-con-vacunas-y-confinamiento/36620>

123-López-Mora E, Espinoza-Rojas J, Dabanch-Peña J, Cruz-Choappa R. Emergencia de variante Delta-B.1.617.2. Su impacto potencial en la evolución de la pandemia por SARS-CoV-2 [Internet]. *Bol Micol*. 2021 [citado 2024 abr 20];36(1):1–9. Disponible en: <https://panambi.uv.cl/index.php/bolmicol/article/download/2883/pdf>

- 124-Organización Mundial de la Salud. Clasificación de la variante ómicron (B.1.1.529) del SARS-CoV-2 como variante preocupante [Internet]. 2021 [citado 2024 abr 20]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-%28b.1.1.529%29-sars-cov-2-variant-of-concern>
- 125-Expósito-Lara A, Fera-Díaz GE, González-Benítez SN, Miguel-Soca PE. Variantes genéticas del SARS-CoV-2 y sus implicaciones clínicas [Internet]. *MEDISAN*. 2021 [citado 2024 abr 20];25(6):1424–34. Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/san/v25n6/1029-3019-san-25-06-1424.pdf>
- 126-European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). SARS-CoV-2 variants of concern as of 28 May 2025 [Internet]. Stockholm: ECDC; 2025 [citado 2025 jun 14]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
- 127-Naranjo-Vargas E, Erazo-Rodríguez JD, Acosta-Velarde JI, Morales-Machado EH. Análisis comparativo entre los principales esquemas visuales para la representación de procesos: Revisión Sistemática [Internet]. *Polo Conocimiento*. 2023 [citado 2024 jul 1];8(7):955–76. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9234527>
- 128-QIAGEN. QIAamp Viral RNA Mini Kit [Internet]. Hilden: QIAGEN; 2023 [citado 2025 abr 8]. 49 p. Disponible en: <https://www.qiagen.com/bz/resources/download.aspx?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>
- 129-QIAGEN. QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit [Internet]. Hilden: QIAGEN; 2025 [citado 2024 abr 8]. 49 p. Disponible en: <https://www.qiagen.com/pm/resources/download.aspx?id=6417881e-d614-4e1c-8d32-ee884e9d7909&lang=en>
- 130-Centro de Estudios Avanzados de Cuba. CEA-NANO+ RNA 3.0. Sistema de extracción magnética de ARN a partir de muestras biológicas: instrucciones para el uso [Internet]. La Habana: Centro de Estudios Avanzados de Cuba; 2020 [citado 2025 abr 8]. 49 p. Disponible en: <https://www.cea.cu/wp-content/uploads/2024/07/Instructivo-Ed.04-01-2023-1.pdf>

- 131-Centers for Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2_Sequencing [Internet]. GitHub; [citado 2025 abr 8]. Disponible en: https://github.com/CDCgov/SARS-CoV-2_Sequencing
- 132-Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [Internet]. *Mol Biol Evolut*. 2013 [citado 2024 abr 8];30:2725–9. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3840312/pdf/mst197.pdf>
- 133-Lazcano-Ponce E, Alpuche-Aranda C. Alfabetización en salud pública ante la emergencia de la pandemia por Covid-19 [Internet]. *Salud Pública Méx*. 2020 [citado 2024 abr 28];62(3):331–40. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v62n3/0036-3634-spm-62-03-331.pdf>
- 134-Sitio Web Oficial de las Normas Cubanas (NC). Volumen 152, número 8, año XIII, del Boletín NC online que constituye un complemento a NC online (Normas Cubanas Online) [Internet]. [fecha desconocida] [citado 2024 abr 8]. [aprox. 50 pantallas]. Disponible en: <https://www.nconline.disaic.cu/Manual/Boletin%20NCOnline%20Ano%20MMXXIV,%20No.%206%20-junio%202024.rar>
- 135-Cobos-Valdés D. Biosafety in the current context [Internet]. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2021 [citado 2024 mar 28];58:1–9. Disponible en: <https://scielo.sld.cu/pdf/hie/v58/1561-3003-hie-58-e192.pdf>
- 136-Organización Mundial de la Salud. Orientaciones sobre la bioseguridad en el laboratorio relacionada con la COVID-19. Orientaciones provisionales [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021 [citado 2024 mar 28]. 6 p. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/339696/WHO-WPE-GIH-2021.1-spa.pdf?sequence=1>
- 137-Ibarra-Miranda DC, Espinosa-García LM, Vega de la Cruz LO, García-Pujadas LM, et al. Gestión de riesgos en tiempos de COVID-19 en una entidad de educación superior [Internet]. *Rev Cubana Educ Super*. 2022 [citado 2024 mar 28];41(2):1–13. Disponible en: <https://scielo.sld.cu/pdf/rces/v41n2/0257-4314-rces-41-02-3.pdf>

- 138-Mas-Bermejo P, Sánchez-Valdés L, Somarriba-López L, Valdivia-Onega NC, Vidal-Ledo MJ, Alfonso-Sánchez I, et al. Equidad y respuesta del Sistema Nacional de Salud de Cuba ante la COVID-19 [Internet]. *Rev Panam Salud Publica*. 2020 [citado 2024 mar 28];44:e138. 7 p. Disponible en: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53122/v44e1382020.pdf?sequence=1>
- 139-Moreira-Macias C, Pinargote-Moreira M, Lino-Villacreses W, Parrales-Chiquito K. Estandarización y control de calidad en los laboratorios de análisis clínicos [Internet]. *RUCS*. 2025 [citado 2024 mar 28];8(1):78–98. Disponible en: <https://revista.uniandes.edu.ec/ojs/index.php/RUCSALUD/article/download/3692/4377/18196>
- 140-Organización Internacional de Normalización (ISO). ISO/IEC 17043:2023. Evaluación de la conformidad: Requisitos generales para los ensayos de aptitud [Internet]. Ginebra: ISO; 2023 [citado 2024 mar 28]. 46 p. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso-iec:17043:ed-2:v1:es>
- 141-Organización Internacional de Normalización. ISO 15189:2022. Laboratorios clínicos: Requisitos para la calidad y la competencia [Internet]. Ginebra: ISO; 2022 [citado 2024 mar 28]. 62 p. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:es>
- 142-Bariandarán A, Pérez-Garofalo M, Batalla M, Costa M, Salama F, Villafañe S, et al. Programa alternativo de evaluación externa de calidad para serología de SARS-CoV-2: calidad en tiempos de pandemia [Internet]. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2021 [citado 2024 mar 28];55(4):455–65. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/535/53571074008/53571074008.pdf>
- 143-Louro PY, Pérez PI, Tudela CM, Concepción ÁA, Acosta ST, et al. Estrategia de aseguramiento de la calidad en el laboratorio de diagnóstico de COVID-19 del Centro Nacional de Genética Médica [Internet]. *Rev Cubana Gen Com*. 2022 [citado 2024 mar 28];14(2):1–21. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubgencom/cgc-2022/cgc222d.pdf>

- 144-Dust K, Hedley A, Nichol K, Stein D, Adam H, Karlowsky JA, et al. Comparison of commercial assays and laboratory developed tests for detection of SARS-CoV-2 [Internet]. *J Virol Methods*. 2020 [citado 2024 mar 28];285:113970. 6 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7482591/pdf/main.pdf>
- 145-Craney AR, Velu PD, Satlin MJ, Fauntleroy KA, Callan K, Robertson A, et al. Comparison of two high-throughput reverse transcription-PCR systems for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [Internet]. *J Clin Microbiol*. 2020 [citado 2024 mar 28];58(8):e00890-20. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7383551/pdf/JCM.00890-20.pdf>
- 146-Luna C, Cochachin SA, Meléndez-Villalobos PL. Rendimiento diagnóstico de dos métodos moleculares para la detección de SARS-CoV-2 en un laboratorio privado del Perú durante 2022 [tesis de licenciatura en Medicina]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2023 [citado 2024 mar 28]. 47 p. Disponible en: https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/668876/Mel%C3%A9ndez_VP.pdf?sequence=14&isAllowed=y
- 147-Valdivia-Alvarez I, Delahanty-Fernández A, Palenzuela-Díaz A, Ortega-León D. Validación de un ensayo basado en la tecnología SUMA para la detección de la proteína N del SARS-CoV-2. En: Cuba Salud 2022. IV Convención Internacional de Salud en La Habana (Cuba) [Internet]. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2022 [citado 2024 mar 28]. 8 p. Disponible en: <https://convencionsalud.sld.cu/index.php/convencionsalud22/2022/paper/download/2487/1095>
- 148-Gómez-Rodríguez A, Rodríguez-Lay LA, Pelegrino-Martínez de la Cotería JL, Montalvo-Villalba MC, Serrano-Álvarez S, García-Sardiña D, et al. Evaluación del desempeño de estuches de detección de antígenos SARS-CoV-2 [Internet]. *Rev Cubana Med Trop*. 2023 [citado 2024 nov 21];75(2):1–9. Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/download/939/667/7495>

- 149-Rodríguez-Lay LA, Tejero-Suárez Y, Pelegrino-Martínez de la Cotería JL, Gómez-Rodríguez A, Montalvo-Villalba MC, Menes-Llerena D, et al. Evaluación clínica del ensayo UMELISA SARS-CoV-2 Antígeno [Internet]. *Rev Cubana Med Trop*. 2023 [citado 2024 mar 28];75(3):1–9. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v75n3/1561-3054-mtr-75-03-e1071.pdf>
- 150-Díaz-Badillo A, Muñoz ML, Morales-Gómez MC, Martínez-Ezquerro JD, Quispe-Siccha RM, López-Alvarenga JC. Pruebas de diagnóstico para detectar la COVID-19: una metodología híbrida [Internet]. *Cir Cir*. 2020 [citado 2024 mar 28];88(5):537–41. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/cicr/v88n5/0009-7411-cir-88-5-537.pdf>
- 151-Rizo-Tello VZ, Londoño-Espinel AM, Páez-Mora CD, et al. Evaluación de pruebas diagnósticas para especialistas en rehabilitación cardiopulmonar [Internet]. *Rev Investig Salud Univ Boyacá*. 2021 [citado 2024 nov 20];9(2):173–93. Disponible en: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/download/871/773/8094#pdfjs.action=download>
- 152-Ochoa-Díaz D, Mendoza-Olazarán S, Zarate X, Casillas-Vega N, et al. Metaanálisis de pruebas diagnósticas para la detección de COVID-19 [Internet]. *Rev Méd Instit Mex Seguro Soc*. 2021 [citado 2024 nov 20];59(3):182–8. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4577/457768119003/457768119003.pdf>
- 153-Hernández C, Garcés MF, Hernández E, et al. Detección del SARS-CoV-2 y diagnóstico de COVID-19: a más de 6 meses de la declaración de la pandemia [Internet]. *Acta Cient Socd Venezolana Bioanal Esp*. 2020 [citado 2024 mar 28];23(2):170–89. Disponible en: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/download/21198/144814487492/144814495152
- 154-García F, Melón S, Navarro D, Paño JR, Galán JC, et al. Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización [Internet]. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2020

- [citado 2024 jul 1]. 15 p. Disponible en: https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2020/12/SEIMC-Modulo-II_final_OrganizacionDiagnostics.pdf
- 155-Ministerio de Salud Argentina. Consenso sobre el uso de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 [Internet]. Argentina: Ministerio de Salud Argentina; 2021 [citado 2024 mar 28]. 22 p. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/bancos/2021-06/CONSENSO_Diagnostico_SARS_CoV-2_Actualizacion_Mayo_2021.pdf
- 156-Dorta-Gorrín A. Evaluación de métodos de detección moleculares del coronavirus SARS-CoV-2 [tesis doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria; 2024 [citado 2024 jul 1]. 174 p. Disponible en: https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/32727/TESIS_ADG.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 157-van-Kasteren PB, van-der Veer B, van-den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van-den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19 [Internet]. *J Clin Virol*. 2020 [citado 2024 nov 20];128:104412. 6 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7206434/pdf/main.pdf>
- 158-Palacio-Rua K, García-Correa JF, Aguilar-Jiménez W, Afanador-Ayala C, Rugeles MT, Zuluaga AF, et al. Validación de una técnica de PCR dúplex usando el gen E y RNasa P para el diagnóstico de SARS-CoV-2 [Internet]. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2022 [citado 2024 nov 20];40(8):428–35. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7816606/pdf/main.pdf>
- 159-Kalita D, Deka S, et al. Effectiveness of Different Gene-Target Strategies for SARS-CoV-2 Screening by RT-PCR and Other Modalities: A Scoping Review [Internet]. *J Med Diagn Meth*. 2020 [citado 2024 jun 9];9(4):298. 6 p. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access-pdfs/effectiveness-of-different-genetarget-strategies-for-sarscov2-screening-by-rtpcr-and-other-modalities-a-scoping-review.pdf>
- 160-Lutaaya P, Ocung G, Ssentamu HN, Kasule GW, Akumu M, et al. The development and implementation of a proficiency testing program for SARS-

- CoV-2 using dried tube specimens in resource-limited countries [Internet]. *BMC Infect Dis*. 2024 [citado 2025 mar 2];24(1):646. 12 p. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-024-09555-y>
- 161-Montiel D, Torres E, Samudio M, López M, Duarte V, Sobarzo-Vysokolán PM, et al. Asociación del umbral de ciclos (Ct) en prueba RT-PCR para SARS-CoV-2 y severidad de la COVID-19 en pacientes de un hospital de referencia en Paraguay [Internet]. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2022 [citado 2024 mar 28];20(1):53–63. Disponible en: <https://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/download/2452/2266/3955>
- 162-Quiroz-Ruiz HR, Chimoy-Effio PJ, Vértiz-Osores JJ, Bazán-Mayra JE, et al. Correlation between real-time PCR cycle threshold and clinical classification of COVID-19 [Internet]. *Rev Chil Infectol*. 2022 feb [citado 2024 dic 2];39(1):35–44. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v39n1/0716-1018-rci-39-01-0035.pdf>
- 163-Pinilla BG, Cruz BCA, Navarrete OJ, et al. Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 [Internet]. *Nova*. 2020 dic [citado 2024 mar 30];18(spe35):35–41. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v18nspe35/1794-2470-nova-18-spe35-35.pdf>
- 164-Guzmán MG, Pérez L, Tejero Y, Mederos D, Aguado ME, et al. Emergence and evolution of SARS-CoV-2 genetic variants during the Cuban epidemic [Internet]. *Rev Virol Clín Plus*. 2022 nov [citado 2024 dic 3];2(4):1–10. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9394106/pdf/main.pdf>
- 165-Guzmán-Tirado M, Resik-Aguirre S, Kourí-Cardellá V, et al. Los Sistemas de Salud y la ciencia en el enfrentamiento a la COVID-19. Transición de pandemia a endemia [Internet]. *Anal Acad Cienc Cuba*. 2023 [citado 2024 mar 30];13(2):1–10. Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/download/1422/1762>
- 166-Qiagen. Rotor-Gene® Q User Manual. Versión 2 [Internet]. Hilden (Alemania): Qiagen; 2012 feb [citado 2024 mar 30]. 225 p. Disponible en: <https://www.avicenna.ac.ir/documents/research/fa/corefacility/pcr/rotrorgene.pdf>

- 167-Zeesan Biotech. SLAN-96P Real-Time PCR System [Internet]. Xi'an (China): Zeesan Biotech; 2025 [citado 2025 mar 10]. 12 p. Disponible en: <https://www.zeesandx.com/downloadpdf.php?id=1542>
- 168-Bravo-Segal S, Villar F, et al. La representación de los mayores en los medios durante la pandemia COVID-19: ¿hacia un refuerzo del edadismo? [Internet]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2020 [citado 2021 jun 5];55(5):266–71. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-geriatria-gerontologia-124-pdf-S0211139X20300901>
- 169-Bandera-Jiménez DC, Morandeira-Padrón H, Valdés-García LE, Rodríguez-Valdés A, Sagaró-del Campo N, et al. Morbilidad por COVID-19: análisis de los aspectos epidemiológicos, clínicos y diagnósticos [Internet]. *Rev Cubana Med Trop*. 2020 [citado 2024 feb 5];72(3):1–14. Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/download/574/374/4018>
- 170-Martínez-Moreira MCBI, Francisco-Local D, Pérez-Ferreiro YC, Poldo-Ferrer Y, et al. La COVID-19 en el Policlínico Universitario "Emilio Daudinot Bueno", Guantánamo [Internet]. *Rev Inf Cient*. 2021 [citado 2023 feb 2];100(3):1–9. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ric/v100n3/1028-9933-ric-100-03-e3483.pdf>
- 171-Lage-Dávila C, Álvarez-Pérez AG, García-Carmenate M, Bell-Bollet L, Alpharo-Guzmán A, et al. Trabajo del área de salud "19 de Abril" en la atención a enfermos de COVID-19 (marzo-junio 2020) [Internet]. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2020 [citado 2024 jun 5];57:1–20. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v57/1561-3003-hie-57-e352.pdf>
- 172-Picazo JJ, et al. Vacuna frente al COVID-19 [Internet]. *Rev Esp Quimioter*. 2021 [citado 2024 jun 5];34(6):569–98. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8638770/pdf/revespquimioter-34-569.pdf>
- 173-Narro-Cornelio KM, Vásquez-Tirado GA, et al. Características clínico-epidemiológicas en pacientes con diagnóstico covid-19 [Internet]. *Rev Cuer*

- Méd. 2020 [citado 2024 jun 5];13(4):372–7. Disponible en:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rcmhnaaa/v13n4/2227-4731-rcmhnaaa-13-04-372.pdf>
- 174-Cheng MI, Li JH, Riggan L, Chen B, Tafti RY, Chin S, et al. The X-linked epigenetic regulator UTX controls NK cell-intrinsic sex differences [Internet]. *Nat Immunol*. 2023 [citado 2024 dic 3];24(5):780–91. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41590-023-01463-8.pdf?pdf=button%20sticky>
- 175-Ruiz-Cantero MT, et al. Las estadísticas sanitarias y la invisibilidad por sexo y de género durante la pandemia de COVID-19 [Internet]. *Gac Sanit*. 2021 [citado 2024 feb 8];35:95–8. Disponible en:
https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/gs/v35n1/0213-9111-gs-35-01-95.pdf
- 176-Carbajales-León EB, Medina-Fuentes G, Carbajales-León AI, et al. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes positivos a la COVID-19 de la provincia Camagüey [Internet]. *Rev Electr Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta*. 2020 [citado 2024 feb 20];45(6):1–10. Disponible en:
https://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/2363/pdf_716
- 177-Rojas NH, Fernández PG, Gilart AL, Castillo FC, et al. Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con la COVID-19 en el policlínico Ramón López Peña [Internet]. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2021 [citado 2024 feb 8];58:1–16. Disponible en:
<https://revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/download/1117/1076/3840>
- 178-Parra-Linares E, Lanio-Posada CA, et al. Caracterización de la COVID-19 en Artemisa [Internet]. *Rev Cienc Méd Pinar del Río*. 2021 [citado 2024 feb 20];25(1):1–8. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v25n1/1561-3194-rpr-25-01-e4642.pdf>
- 179-Quintana S, Giustina S, Belmonte JM, Di Gerónimo VM, Fedele S, Sanz Y, et al. Estudio del valor de Ct y el polimorfismo D/I del gen ECA1 en la respuesta al SARS-COV-2 [Internet]. *Rev Bioq Patol Clín*. 2023 [citado 2024 mar

8];87(1):35–9. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/journal/651/65174086004/65174086004.pdf>

180-Amancio-Castro AM, del Carpio-Flórez S, et al. Relación entre las comorbilidades y la morbilidad y la mortalidad en la COVID-19 [Internet]. *Anal Acad Cienc Cuba*. 2021 [citado 2024 mar 8];11(2):1–6. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/aacc/v11n2/2304-0106-aacc-11-02-e936.pdf>

181-Heudobler M, Baurecht H, Schmied H, Heudobler D, Jochem C, Sedlmeier A, et al. Association of epidemiological and clinical features with PCR cycle threshold values of SARS-CoV-2 infection: a cross-sectional study [Internet].

Pathog Glob Health. 2022 [citado 2024 mar 8];117(5):476–84. Disponible en:

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10262808/pdf/YPGH_117_2158003.pdf

182-Villagrán-Olivas KA, Torrontegui-Zazueta LA, Entzana-Galindo A, et al.

Características clínico-epidemiológicas de pacientes de COVID-19 en un

Hospital de Sinaloa, México [Internet]. *Rev Méd Univ Autónoma Sinaloa*. 2020

[citado 2024 ene 11];10(2):65–79. Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/sinaloa/uas-2020/uas202c.pdf>

183-González Leyva Y, Rodríguez Pérez M, Peña Peña Y, et al. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes confirmados con COVID-19 en la provincia Holguín [Internet]. *Multimed*. 2022 [citado 2024 ene 11];26(1):1–10.

Disponible en:

http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-48182022000100004

184-Cobas-Planchez L, Mezquia-de Pedro N, Armenteros-Terán SS, et al.

Características clínicas de pacientes con sospecha de COVID-19 ingresados en el hospital “Frank País García”, La Habana [Internet]. *Rev Elec Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta*. 2020 [citado 2024 ene 11];45(4):1–7. Disponible en:

<https://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/download/2339/1301>

185-Ruiz-Nápoles JB, Ruiz-Nápoles K, et al. Comparación de las características clínicas y epidemiológicas entre pacientes asintomáticos y sintomáticos con la

- COVID-19 [Internet]. *Rev Cubana Med Militar*. 2021 [citado 2024 ene 11];50(2):1–15. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v50n2/1561-3046-mil-50-02-e919.pdf>
- 186-Pérez MR, Gómez JJ, Dieguez RA, et al. Características clínico-epidemiológicas de la COVID-19 [Internet]. *Rev Haban Cienc Méd*. 2020 [citado 2024 ene 11];19(2):1–15. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v19n2/1729-519X-rhcm-19-02-e3254.pdf>
- 187-Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Boone CE, DeConde AS. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms [Internet]. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020 [citado 2024 ene 11];10(7):806–13. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/alr.22579>
- 188-Pang KW, Chee J, Subramaniam S, Ng CL, et al. Frequency and clinical utility of olfactory dysfunction in COVID-19: a systematic review and meta-analysis [Internet]. *Curr Allerg Asthma Rep*. 2020 [citado 2024 ene 11];20(12):1–17. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11882-020-00972-y.pdf>
- 189-Cirillo N, et al. Taste alteration in COVID-19: significant geographical differences exist in the prevalence of the symptom [Internet]. *J Infect Public Health*. 2021 [citado 2024 feb 20];14(8):1099–105. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034121001891>
- 190-Mendoza SM, Zepeda KI, Gallardo CA, Obed I, et al. Disfunción gustativa y olfativa en un contexto de predicción de infección por SARS-CoV-2 [Internet]. *Rev ADM*. 2022 [citado 2025 abr 9];79(2):92–6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2022/od222f.pdf>
- 191-Ruiz-Nápoles JB, Ruiz-Nápoles K, et al. Pacientes asintomáticos positivos a la COVID-19 [Internet]. *Rev Cub Med Mil*. 2021 Mar [citado 2025 abr 1];50(1):1–9. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v50n1/1561-3046-mil-50-01-e893.pdf>
- 192-Tso C, Garikipati A, Green-Saxena A, Mao Q, Das R, et al. Correlation of population SARS-CoV-2 cycle threshold values to local disease dynamics:

exploratory observational study [Internet]. *JMIR Public Health Surveill.* 2021 [citado 2024 feb 20];7(6):e28265. 11 p. Disponible en:
<https://publichealth.jmir.org/2021/6/e28265>

193-Malagón-Rojas JGRC, Parra ELAJ, Palma R, López R, et al. SARS-CoV-2 y RT-PCR en pacientes asintomáticas: resultados de una cohorte de trabajadores del Aeropuerto Internacional El Dorado de Bogotá [Internet]. *Biomédica.* 2020 [citado 2024 feb 20];40(2):167–72. Disponible en:
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5802>

194-Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo' [Internet]. *Nature.* 2020 [citado 2024 feb 20];584(7821):425–9. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2488-1.pdf>

195-Kshatri JS, Bhattacharya D, Praharaj I, Mansingh A, Parai D, Kanungo S, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 in Bhubaneswar, India: findings from three rounds of community surveys [Internet]. *Epidemiol Infect.* 2021 [citado 2024 feb 20];149:e139. Disponible en:
<https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/seroprevalence-of-sarscov2-in-bhubaneswar-india-findings-from-three-rounds-of-community-surveys/29A7905F297A1EFA68749AC3C6383300>

196-Quiroga-Meriño LE, Estrada-Brizuela Y, Hernández-Agüero M, Peña-Galván LY, Torres-Pérez L, Romero-González AT, et al. Caracterización de los pacientes con COVID-19 según grupos clínicos [Internet]. *Arch Méd Camagüey.* 2021 [citado 2023 feb 20];25(4):1–12. Disponible en:
<https://revistaamc.sld.cu/index.php/amc/article/view/8148/4057>

197-Zambrano LI, Sierra-Santos MA, Mejía-Santos HM, Palou EY, Muñoz-Lara F, Lorenzana I, et al. Spatial distribution of COVID-19 in Honduras at the early phase of the pandemic using geographic information systems [Internet]. *Preprints.org.* 2020 [citado 2023 jun 5];1:1–22. Disponible en:
https://www.preprints.org/frontend/manuscript/bbc087fce99c0b3a7aae919ff7644b3c/download_pub

- 198-Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G, et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan [Internet]. *Euro Surveill*. 2020 [citado 2023 jun 5];25(10):1–12. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7078829/pdf/eurosurv-25-10-.pdf>
- 199-Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, Suzuki A, Jung SM, Hayashi K, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19) [Internet]. *Int J Infect Dis*. 2020 [citado 2023 jun 5];94:154–5. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.03.20020248v2.full.pdf>
- 200-Yousif MG, Al-Jumeily D, Al-Amran FG, Sadeq AM, Rawaf S, et al. Epidemiological and clinical characteristics of COVID-19 in the Middle Euphrates region, Iraq: a retrospective study [Internet]. *Internat Soc Health Educat*. 2023 [citado 2024 jun 5];1(1):1–10. Disponible en: <https://www.isohe.org/wp-content/uploads/2023/07/Epidemiological-and-clinical-characteristics-of-COVID-19-in-the-Middle-Euphrates-region-Iraq-A-retrospective-study-1.pdf>
- 201-Cárdenas-Zavala LS, Redlic SC, et al. La mortalidad por COVID-19 con la edad y sexo en pobladores residentes a diferentes alturas [tesis doctoral]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021 [citado 2023 jun 5]. 72 p. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/10054/Relacion_CardenasZavala_Laura.pdf?sequence=1
- 202-Sampaio SA, Cunha GCS, de Souza Reis F, Souza SO, et al. Análise espacial dos casos da COVID-19 e leitos de terapia intensiva no estado da Bahia-Brasil [Internet]. *Hygeia*. 2021 [citado 2023 nov 20];17:198–215. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Sirius-Souza-2/publication/354683625_ANALISE_ESPACIAL_DOS_CASOS_DA_COVID-19_E_LEITOS_DE_TERAPIA_INTENSIVA_NO_ESTADO_DA_BAHIA-BRASIL1/links/61463149a595d06017d786f0/ANALISE-ESPACIAL-DOS-

[CASOS-DA-COVID-19-E-LEITOS-DE-TERAPIA-INTENSIVA-NO-ESTADO-DA-BAHIA-BRASIL1.pdf](#)

- 203-Montiel D, Torres E, Samudio M, López M, Duarte L, Sobarzo Vysokolán PM, et al. Asociación del umbral de ciclos (Ct) en prueba RT-PCR para SARS-CoV-2 y severidad de la COVID-19 en pacientes de un hospital de referencia en Paraguay [Internet]. *Mem Inst Invest Cienc Salud*. 2022 [citado 2023 nov 20];20(1):53–63. Disponible en: <https://scholar.archive.org/work/ziyfbf53qnglhirqvmtf4cbtru/access/wayback/http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v20n1/1812-9528-iics-20-01-53.pdf>
- 204-Simian-Marín ME, Cifuentes DM, et al. Caracterización epidemiológica de pacientes con Covid-19 en el Hospital Clínico Universidad de Chile [Internet]. *Rev Hosp Clin Univ Chile*. 2020 [citado 2023 nov 20];31(2):103–8. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/177128/Caracterizacion-epidemiologica.pdf?sequence=1>
- 205-Vial MR, Peters A, Pérez I, Spencer-Sandino M, Barbé M, Porte L, et al. Covid-19 in South America: clinical and epidemiological characteristics among 381 patients during the early phase of the pandemic in Santiago, Chile [Internet]. *BMC Infect Dis*. 2020 [citado 2023 jun 20];20(955):1–8. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s12879-020-05665-5.pdf>
- 206-Desjardins MR, Hohl A, Delmelle EM, et al. Rapid surveillance of COVID-19 in the United States using a prospective space-time scan statistic: Detecting and evaluating emerging clusters [Internet]. *Appl Geogr*. 2020 May [citado 2023 dic 5];118:1–10. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7139246/pdf/main.pdf>
- 207-Kim S, Castro MC, et al. Spatiotemporal pattern of COVID-19 and government response in South Korea (as of May 31, 2020) [Internet]. *Int J Infect Dis*. 2020 [citado 2023 dic 5];98:328–33. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/342696098_Spatiotemporal_pattern_of_COVID-19_and_government_response_in_South_Korea_as_of_May_31_2020/fulltext/5

[f01240a299bf18816037162/Spatiotemporal-pattern-of-COVID-19-and-government-response-in-South-Korea-as-of-May-31-2020.pdf](https://doi.org/10.1240a299bf18816037162/Spatiotemporal-pattern-of-COVID-19-and-government-response-in-South-Korea-as-of-May-31-2020.pdf)

208-Masrur A, Yu M, Luo W, Dewan A, et al. Space-Time Patterns, Change, and Propagation of COVID-19 Risk Relative to the Intervention Scenarios in Bangladesh [Internet]. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 [citado 2023 dic 5];17(16):5911. 22 p. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7569836/pdf/ijerph-17-05911.pdf>

209-Vieira-Cavalcante F, Oliveira A, Queiroga-de Araujo S, Pacheco C, da Conceição-Costa R, Sacco S, et al. Brazilian diagnostic tests: essential health supplies for COVID-19 syndromic surveillance [Internet]. *Saúde em Debate*. 2022 [citado 2023 dic 4];46(134):665–81. Disponible en:

<https://www.scielo.org/pdf/sdeb/2022.v46n134/665-681/en>

210-Acharya BK, Khanal L, Mahyoub AS, Ruan Z, Yang Y, Adhikari SK, Pandit S, Neupane BK, Paudel BK, Lin H, et al. Execution of intervention matters more than strategy: a lesson from the spatiotemporal assessment of COVID-19 clusters in Nepal [Internet]. *MedRxiv*. 2020 [citado 2023 ene 22];2020(11):1–28. Disponible en:

<https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/11/10/2020.11.07.20227520.full.pdf>

211-Ballesteros P, Salazar E, Sánchez D, Bolaños C, et al. Spatial and spatiotemporal clustering of the COVID-19 pandemic in Ecuador [Internet]. *Rev Fac Med*. 2021 [citado 2023 ene 22];69(1):1–8. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v69n1/0120-0011-rfmun-69-01-e201.pdf>

212-Azmach NN, Tesfahannes TG, Abdulsemed SA, Hamza TA, et al. Prospective time periodic geographical Covid-19 Surveillance in Ethiopia Using a Space-time Scan Statistics: detecting and evaluating emerging clusters [Internet]. *Res Square*. 2020 [citado 2023 ene 22];2020(11):1–28. Disponible en:

<https://europepmc.org/article/ppr/ppr216565>

213-Cuartas DE, Arango-Londoño D, Guzmán-Escarria G, Muñoz E, Caicedo D, Ortega D, Fandiño-Losada A, et al. Análisis espacio-temporal del SARS-CoV-2

- en Cali, Colombia [Internet]. *Rev Salud Pública*. 2020 [citado 2023 feb 10];22(2):138–43. Disponible en: https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rsap/v22n2/0124-0064-rsap-22-02-138.pdf
- 214-Andrade LA, Gomes DS, Lima SVMA, Duque AM, Melo MS, Góes MAO, et al. COVID-19 mortality in an area of northeast Brazil: epidemiological characteristics and prospective spatiotemporal modelling [Internet]. *Epidemiol Infect*. 2020 [citado 2023 feb 10];148(288):1–7. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/2FFA23FE6583147AB9339D1055C458E4/S0950268820002915a.pdf/covid19_mortality_in_an_area_of_northeast_brazil_epidemiological_characteristics_and_prospective_spatiotemporal_modeling.pdf
- 215-Leveau CM, et al. Variaciones espacio-temporales de la mortalidad por COVID-19 en barrios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina [Internet]. *Rev Argent Salud Pública*. 2021 [citado 2024 oct 29];13(Supl COVID-19):e27. 9 p. Disponible en: https://www.rasp.msal.gov.ar/rasp/articulos/vol13supl/AO_Leveaue27.pdf
- 216-Durán-Morera N, Ramírez-Botello E, et al. Detección de conglomerados «activos» emergentes de altas tasas de incidencia, para la vigilancia rápida de la COVID-19 [Internet]. *Medicent Electrón*. 2020 [citado 2023 oct 4];24(3):642–55. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v24n3/1029-3043-mdc-24-03-642.pdf>
- 217-Maza-Malave MF, Celis LG, et al. Mutaciones del virus SARS-CoV-2 y el impacto de la enfermedad COVID-19 en el sistema de salud [Internet]. *Salud Uninorte*. 2021 [citado 2023 oct 4];37(3):534–8. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v37n3/2011-7531-sun-37-03-534.pdf>
- 218-Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, Shafer RW, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants [Internet]. *Nat Rev Genet*. 2021 [citado 2024 ago 12];22(12):757–73. Disponible en:

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8447121/pdf/41576_2021_Article_408.pdf

219-Guzmán-Tirado MG, Mederos D, Aguado ME, et al. Vigilancia genómica de las variantes de SARS-CoV-2 que circularon en Cuba [Internet]. *An Acad Cienc Cuba*. 2024 jun [citado 2024 ago 12];13(4):1–11. Disponible en:

<https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/download/1507/1866>

220-Grubaugh ND, Hanage WP, Rasmussen AL, et al. Making sense of mutation: what D614G means for the COVID-19 pandemic remains unclear [Internet]. *Cell*. 2020 [citado 2024 ago 14];182(4):794–5. Disponible en:

<https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674%2820%2930817-5.pdf>

221-Miranda JAP, et al. Intervención sanitaria con candidatos vacunales, como estrategia temporal de enfrentamiento a la COVID-19, Cuba, 2021 [Internet]. *Rev Cubana Salud Pública*. 2022 [citado 2023 nov 1];48(1):1–20. Disponible en:

<https://revsaludpublica.sld.cu/index.php/spu/article/download/3513/1765/18420>

222-Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Ayoub HH, Yassine HM, Benslimane FM, Al Khatib HA, et al. Severity, criticality, and fatality of the SARS-CoV-2 Beta variant [Internet]. *Clin Infect Dis*. 2022 [citado 2023 nov 1];75(1):e1188–e1191. Disponible en:

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.02.21261465v1.full.pdf>

223-Machado-Zaldívar LY, Noa-Romero E, López-Rizo LS, Blanco-de Armas M, González-Sosa NL, et al. Caracterización genética de aislamientos de SARS-CoV-2 en las diferentes etapas pandémicas de COVID-19 en Cuba [Internet]. *Rev Cubana Med Mil*. 2024 [citado 2025 abr 1];53(1):1–23. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v53n1/1561-3046-mil-53-01-e16539.pdf>

224-Shiehzhadegan S, Alaghemand N, Fox M, Venketaraman V, et al. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19 [Internet]. *Clin Pract*. 2021 [citado 2024 oct 29];11(4):778–84. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2039-7283/11/4/93>

225-Suárez Rivas R, et al. Nuevas variantes del SARS-CoV-2 presentes en la mayoría de los casos graves y los fallecidos en Cuba [Internet]. *Periódico Granma*. 2021 mayo 13 [citado 2024 oct 16]. Disponible en:

<https://www.granma.cu/cuba-covid-19/2021-05-13/nuevas-variantes-del-sars-cov-2-presentes-en-la-mayoria-de-los-casos-graves-y-los-fallecidos-en-cuba-13-05-2021-02-05-45>

226-Gobierno de La Habana, et al. Encuentran presencia de nuevas variantes del SARS-CoV-2 en la mayoría de los casos graves y los fallecidos en Cuba [Internet]. La Habana: Gobierno de La Habana; 2021 mayo 14 [citado 2024 jul 10]. Disponible en:

https://www.lahabana.gob.cu/post_detalle/en/10894/encuentran-presencia-de-nuevas-variantes-del-sars-cov-2-en-la-mayoria-de-los-casos-graves-y-los-fallecidos-en-cuba-video

227-Segura-Mora M, Guerrero-Guerrero Y, Olivera-Fonseca Y, Milán-Celeiro DR, Fonseca-González Y, et al. Impacto de los inmunógenos anti Sars Cov 2 en el número de casos confirmados de covid-19 [Internet]. *Multimed*. 2023 [citado 2024 dic 10];27:1–21. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mmed/v27/1028-4818-mmed-27-e2918.pdf>

228-Escobar-Agreda S, Vargas J, Rojas-Mezarina L, et al. Evidencias preliminares sobre el efecto de vacunación contra la COVID-19 en el Perú [Internet]. *Bol Inst Nac Salud*. 2021 [citado 2024 dic 10];27(3-4):35–9. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Javier-Vargas-8/publication/353243146_Articulos_de_actualidad_EVIDENCIAS_PRELIMINARES SOBRE EL EFECTO DE VACUNACION CONTRA LA COVID-19 EN EL PERU/links/60eee60b0859317dbde0dc6e/Articulos-de-actualidad-EVIDENCIAS-PRELIMINARES-SOBRE-EL-EFECTO-DE-VACUNACION-CONTRA-LA-COVID-19-EN-EL-PERU.pdf

229-Vela-Valdés J, et al. Los principios de la salud pública socialista cubana ante la pandemia de COVID-19 [Internet]. *Rev Cubana Salud Pública*. 2020 [citado 2024 oct 14];46(Supl 1):1–8. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v47n2/1561-3127-rcsp-47-02-e3122.pdf>

230-Portal Miranda JA, et al. Intervención sanitaria con candidatos vacunales contra COVID-19: un enfoque desde la gerencia en Salud [tesis doctoral]. La

Habana: Escuela Nacional de Salud Pública, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana; 2021. 108 p. Disponible en:

<https://tesis.sld.cu/index.php?P=DownloadFile&Id=325>

231-Félix Mendoza A, et al. Desarrollo, distribución y cadena de suministro de vacunas contra el COVID-19 en Chile, Cuba y México [Internet]. Santiago de Chile: Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL); 2022 [citado 2024 jul 10]. 63 p. (Documentos de Proyectos; LC/TS.2022/131).

Disponible en: <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/00829765-8504-478e-abc2-2d6654103571/content>

232-Vela Valdés J, et al. ¿Qué significan los cinco candidatos vacunales cubanos contra la COVID-19? [Internet]. *Rev Cubana Salud Pública*. 2021 jun [citado 2024 abr 1];47(2):1–8. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v47n2/1561-3127-rcsp-47-02-e3122.pdf>

233-Más-Bermejo PI, Dickinson-Meneses FO, Almenares-Rodríguez K, Sánchez-Valdés L, Guinovart-Díaz R, Vidal-Ledo M, et al. Cuban Abdala Vaccine: Effectiveness in Preventing Severe Disease and Death From COVID-19 in Havana, Cuba; A Cohort Study [Internet]. *Lancet Reg Health Am*. 2022 [citado 2024 jul 10];16:100366. 10 p. Disponible en:

<https://doaj.org/article/ef9b91e082dd4428bbc330d343461a33>

234-Guinovart-Sanjuán D, Guinovart-Díaz R, Vajravelu K, Morales-Lezca W, Abelló-Ugalde I, et al. Multi-Population Analysis of the Cuban SARS-CoV-2 Epidemic Transmission Before and During the Vaccination Process [Internet]. *Phys Fluids*. 2021 [citado 2024 jul 10];33(10):107107. 10 p. Disponible en:

<https://pubs.aip.org/aip/pof/article/33/10/107107/1065272/Multi-population-analysis-of-the-Cuban-SARS-CoV-2>

235-Villar J, Maçaira P, Baião FA, et al. Lessons Learned From the COVID-19 Pandemic in Latin America: A Data Science Standpoint [Internet]. *PLoS One*. 2025 [citado 2025 jun 10];20(5):e0324171. 10 p. Disponible en:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0324171>

- 236-Nogareda F, Regan AK, Couto P, et al. Effectiveness of COVID-19 Vaccines Against Hospitalisation in Latin America During Three Pandemic Waves, 2021–2022: A Test-Negative Case-Control Design [Internet]. *Lancet Reg Health Am*. 2023 [citado 2024 jul 10];27:100626. 10 p. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/effectiveness-covid-19-vaccines-against-hospitalisation-latin-america-during-three>
- 237-Frauches TS, Costa CAS, Rodrigues CDS, de Azevedo MCV, Ferreira MdM, Ramos HBvdS, et al. COVID-19 Cross-Sectional Study in Maricá, Brazil: The Impact of Vaccination Coverage on Viral Incidence [Internet]. *PLoS One*. 2022 [citado 2024 jul 10];17(9):e0269011. 10 p. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0269011>
- 238-Plans-Rubió P, et al. Percentages of Vaccination Coverage Required to Establish Herd Immunity against SARS-CoV-2 [Internet]. *Vaccines*. 2022 [citado 2024 jun 10];10(5):736. 13 p. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-393X/10/5/736>
- 239-Powell MA, Erwin PC, Bermejo PM, et al. Comparing the COVID-19 Responses in Cuba and the United States [Internet]. *Am J Public Health*. 2021 [citado 2024 jul 10];111(12):2186–93. Disponible en: <https://multipluralworld.com/wp-content/uploads/2022/01/Comparing-the-Covid-19-responses-in-Cuba-and-the-United-States.pdf>
- 240-Monge S, Rojas-Benedicto A, Olmedo C, Mazagatos C, Sierra MJ, et al. Effectiveness of mRNA vaccine boosters against infection with the SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) variant in Spain: a nationwide cohort study [Internet]. *Lancet Infect Dis*. 2022 [citado 2024 oct 29];22(9):1313–20. Disponible en: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S1473-3099%2822%2900292-4>
- 241-Pérez-Santosa L, Kourí-Cardellá V, Tejeros Suárez Y, Macías Roig LM, Pintos-Saavedra Y, Medero-Díaz D, et al. Epidemiological characterization of patients in the first eight weeks following detection of SARS-CoV-2 B.1.1.529 (omicron) variant in Cuba [Internet]. *MEDICC Rev*. 2022 [citado 2024 oct

- 29];24(3–4):18–23. Disponible en: <http://mediccreview.org/wp-content/uploads/2022/10/MR2022-Vol24-N3–4-6.pdf>
- 242-Lewnard JA, Hong VX, Patel MM, Kahn R, Lipsitch M, Tartof SY, et al. Clinical outcomes among patients infected with Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant in southern California [Internet]. *Nat Med*. 2022 [citado 2024 oct 29];28(9):1933–43. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10208005/pdf/nihms-1897543.pdf>
- 243-Strasser ZH, Greifer N, Hadavand A, Murphy SN, Estiri H, et al. Estimates of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariant severity in New England [Internet]. *JAMA Netw Open*. 2022 [citado 2024 oct 29];5(10):e2238354. 11 p. Disponible en: https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/articlepdf/2797625/strasser_2022_oj_221086_1666016864.51241.pdf
- 244-Gupta S, et al. Evolution of pathogen virulence: Studying the complex interplay of pathogen interactions, virulence and transmission helps us understand how they evolve and spread [Internet]. *EMBO Rep*. 2023 [citado 2024 oct 29];24(8):e57611. 11 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10398641/pdf/EMBR-24-e57611.pdf>
- 245-Toledo Romaní ME, Valenzuela Silva C, Montero Díaz M, Iñiguez Rojas L, Rodríguez González M, Martínez Cabrera M, et al. Real-world effectiveness of the heterologous SOBERANA-02 and SOBERANA-Plus vaccine scheme in 2–11 years-old children during the SARS-CoV-2 Omicron wave in Cuba: a longitudinal case-population study [Internet]. *Lancet Reg Health Am*. 2024 [citado 2024 oct 29];34:100750. 15 p. Disponible en: <https://ediciones.finlay.edu.cu/wp-content/uploads/2023/07/08-Soberana-02-y-Plus-Real-world-effectiveness-of-the-heterologous.pdf>
- 246-Escalas-Bordoy A, et al. Breve historia y dinámica actual del SARS-CoV-2 [Internet]. *Enf Emerg*. 2024 [citado 2024 oct 29];23(2):110–7. Disponible en: https://www.enfermedadesemergentes.com/articulos/a907/dia11_me2.pdf

- 247-Organización Mundial de la Salud, et al. Estrategia mundial de vigilancia genómica de patógenos con potencial pandémico y epidémico, 2022–2032 [Internet]. Ginebra: OMS; 2022 [citado 2024 oct 16]. 23 p. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/365803/9789240058187-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 248-U.S. Food and Drug Administration, et al. Mutaciones virales del SARS-CoV-2: Impacto en las pruebas de COVID-19 [Internet]. Estados Unidos: FDA; 2023 oct 13 [citado 2024 oct 29]. [4 pantallas]. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/mutaciones-virales-del-sars-cov-2-impacto-en-las-pruebas-de-covid-19>
- 249-Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape [Internet]. *Nat Rev Microbiol*. 2021 [citado 2024 oct 29];19(7):409–24. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00573-0.pdf>
- 250-Michelon CM, et al. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil [Internet]. *Rev Bras Anal Clin*. 2021 [citado 2024 oct 29];53(2):109–16. Disponible en: https://rbac.org.br/wp-content/uploads/2021/10/RBAC-vol-53-2-2021_artigo01.pdf
- 251-Gómez-Osorio DS, et al. Principales variaciones genéticas del SARS-CoV-2 en Latinoamérica: ¿Cuáles son las variaciones genéticas del SARS-CoV-2 que se han manifestado en Colombia? [tesis de grado] [Internet]. Bogotá: Universidad de La Salle; 2021 [citado 2024 oct 29]. 48 p. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/bitstreams/9cd76d04-cb18-4148-922e-4e902025211b/download>
- 252-Barton MI, MacGowan SA, Kutuzov MA, Dushek O, Barton GJ, van der Merwe PA, et al. Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics [Internet]. *eLife*. 2021 [citado 2024 oct 29];10:e70658. 15 p. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/70658#downloads>

- 253-Catalá RM, Palacios-Arreola MI, et al. Un modelo didáctico para comprender la estructura y mecanismos de acción de los virus y su relación con el desarrollo de nuevas vacunas [Internet]. *Educ Quím*. 2020 [citado 2024 oct 29];31(3):45–58. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v31n3/0187-893X-eq-31-03-45.pdf>
- 254-Lemieux JE, Siddle KJ, Shaw BM, Loreth C, Schaffner SF, et al. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 in Boston highlights the impact of superspreading events [Internet]. *Science*. 2021 [citado 2024 oct 29];371(6529):1–14. Disponible en: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.abe3261>
- 255-Adebali O, Bircan A, Çirci D, Islek B, Kilinc Z, Selçuk B, et al. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 genomes in Turkey [Internet]. *Turk J Biol*. 2020 [citado 2024 oct 29];44(3):146–56. Disponible en: <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-20-44-7/biy-44-7-3-2005-18.pdf>
- 256-Pan Y, Wang L, Feng Z, Xu H, Li F, Shen Y, et al. Characterization of SARS-CoV-2 variants in Beijing during 2022: an epidemiological and phylogenetic analysis [Internet]. *Lancet*. 2023 [citado 2024 oct 29];401(10377):664–72. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9949854/pdf/main.pdf>
- 257-Feghali R, Merhi G, Kwasiborski A, Hourdel V, Ghosn N, Tokajian S, et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of the first SARS-CoV-2 variants introduced in Lebanon [Internet]. *PeerJ*. 2021 [citado 2024 oct 29];9:e11015. 15 p. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8447710/pdf/peerj-09-11015.pdf>
- 258-Pérez L, Tejero Y, Aguado M, Valdés O, Álvarez M, González G, Kourí V, Guzmán MG, et al. Sequencing of S and N Genes of SARS-CoV-2 Strains Circulating in Cuba during March–September 2020 [Internet]. *J Microbiol Infect Dis*. 2022 [citado 2024 nov 22];12(3):77–88. Disponible en: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jmid/issue/72586/1175386>
- 259-Jiménez-Garí JA, Castro-Martínez C, Ramaya-Soler KA, Oliva-Gregorio AJ, Ramos-Bermúdez PE, Rodríguez-Cruz YY, et al. Análisis preliminar de la potencialidad de las diferentes subregiones genómicas de SARS-CoV-2 para su

uso como marcadores filogenéticos [Internet]. *Rev Cubana Cienc Inform.* 2021 [citado 2024 dic 15];15(4 Supl 1):101–19. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rcci/v15n4s1/2227-1899-rcci-15-04-s1-101.pdf>

260-Herrera Yela MA, et al. Análisis comparativo del genoma de los diferentes sublinajes de la variante Ómicron de SARS-CoV-2 en Ecuador [tesis de maestría] [Internet]. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2023 [citado 2024 oct 29]. 66 p. Disponible en:

<https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/fbab1fa8-d386-4b18-958d-fdc6fb982735/content>

ANEXOS

IX. Anexos

Anexo 1

Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis:

Sánchez Álvarez ML, Roque de Escobar Martín HD, Hernández González G, Abreu Duarte R, Choy Marrero A, Pulido López JJ. Caracterización de los valores de ciclo umbral en oleadas de COVID-19 en Villa Clara, Cuba Revista Cubana de Medicina Tropical; 76:e1096. 2024.

Sánchez Álvarez ML, Pérez SL, Abreu Duarte R, Roque De Escobar Martín HD, Gravier HR and Fimia DR. Evolution of SARS-CoV-2 variants and their impact on the epidemic period in Villa Clara, Cuba Open Access Research Journal of Multidisciplinary Studies, ISSN2783 08;(02),116,125. 2024.

Sánchez Álvarez ML, Abreu Duarte R, García Alvarez E, Fernández García A, González Martínez EA, Mendoza Acosta M. Evolución e importancia de la Microbiología molecular en el Laboratorio del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología Acta Médica del Centro;(18):e2000. 2024.

González Álvarez Y, Roig Caraballo E, Pulido López JJ, Chaviano Carballea M, **Sánchez Álvarez ML**, Moya Pérez Y. Organización de los servicios de salud durante la COVID-19 en Villa Clara. Medicent Electrón, ISSN1029-3043; 28:e4281. 2024.

Abreu Duarte R, **Sánchez Álvarez ML**, González Lorenzo L, Delgado Cura NR, Rivero Pérez YF, Sánchez Padrón G. Aspectos relacionados con la toma de muestra en la detección de SARS-CoV-2 en Villa Clara Acta Médica del Centro / Vol. 16 No. 4 octubre-diciembre 2022.

Fernández García A, González Bermudez Y, del Valle Laveaga D, Andreu Alvarez D, Rodríguez Rodríguez LM, **Sánchez Alvarez ML**, Durán Morera N and Fimia-Duarte

R. Performance of UMELISA SARS-CoV-2 antigen and STANDARD F COVID-19 in the diagnosis of COVID-19 in Villa Clara, Cuba GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 19(03), 279–286. 2022.

Sánchez Álvarez ML, Roque de Escobar Martín HD, Delgado Cura NR. Detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real en el Laboratorio de Biología Molecular de Villa ClaraMedicent Electrón. 2020; 24: no 3 jul- sept [Internet]. 2023.

Eventos científicos donde han sido presentados los resultados de la tesis:

María de Lourdes Sánchez-Álvarez; Lissette Pérez-Santos; Hilda Roque de Escobar; Rafael Abreu-Duarte; María de Lourdes Peral-Sánchez. Variantes emergentes de SARS-COV-2 circulantes en Villa Clara. 2020-2023. III Encuentro Internacional sobre Organismos Vectores con incidencia en la Transmisión de Entidades Zoonóticas. IX Taller Internacional sobre Cambio Climático y Salud; I Coloquio Nacional sobre Parasitismo Intestinal en Niños de 1-14 Años. Topes de Collantes, Trinidad. 19 al 22 noviembre 2024.

María de Lourdes Sánchez-Álvarez; Lissette Pérez-Santos; Hilda Roque-de Escobar; Rafael Abreu-Duarte; María de Lourdes Peral-Sánchez. Caracterización genética mediante secuenciación genómica del SARS-COV-2 en muestras procedentes de Villa Clara. III Encuentro Internacional sobre Organismos Vectores con incidencia en la Transmisión de Entidades Zoonóticas. IX Taller Internacional sobre Cambio Climático y Salud; I Coloquio Nacional sobre Parasitismo Intestinal en Niños de 1-14 Años. Topes de Collantes, Trinidad. 19 al 22 noviembre 2024.

María de Lourdes Sánchez-Álvarez; Noira Durán Morera, Rafael Abreu Duarte. Contribución de la RT-PCR en la vigilancia prospectiva espaciotemporal en la COVID-19. CENTROPAT diciembre 2024.

González Álvarez Y, Roig Caraballo E, Pulido López JJ, Chaviano Carballea M, **Sánchez Álvarez ML**, Moya Pérez Y.Organización de los servicios de salud durante la COVID-19 enVilla Clara. CENTROPAT diciembre 2024.

María de Lourdes Sánchez Alvarez. Evaluación de las pruebas de laboratorio y su impacto en la gestión de la COVID-19. MicroCentro2024: Dr. José Antonio Rodríguez

Rodríguez *in Memoriam*. Enfoque Una Salud: perspectivas desde la Microbiología en Villa Clara. 23 diciembre 2024.

María de Lourdes Sánchez Álvarez; Hilda D. Roque de Escobar Martín; Adrian Fernández García; Yamila González Bermúdez; Geni Hernández González; Edenis García Álvarez; Rafael Abreu Duarte; Ermis Alexander González Martínez. Utilidad del Gen E en la RT- PCR SARS-COV-2 con el Gen Rprd comoconfirmatorio. III Taller Internacional de Zoonosis Parasitarias de Importancia Médica. VIII Taller Internacional sobre Cambio Climático y Salud. Topes de Collantes, Trinidad, 13 al 16 de noviembre del 2023.

María de Lourdes Sánchez Álvarez; Rafael Abreu Duarte; Lissette Pérez Santos; Déborah Galpert Cañizares; Liz Mery Martínez Montero. Análisis filogenético en muestras secuenciadas de SARS-CoV-2 en Villa Clara. VIII Taller Internacional sobre Cambio Climático y Salud. Topes de Collantes, Trinidad, 13 al 16 de noviembre del 2023.

María de Lourdes Sánchez Álvarez, Hilda D. Roque de Escobar Martín, Yessica Pérez Sánchez, Rafael Abreu Duarte. Valores del ciclo umbral de la RT-PCR Alerta temprana del incremento de casos de SARS-CoV-2. III Taller Internacional de Zoonosis Parasitarias de Importancia Médica VIII Taller Internacional sobre Cambio Climático 2023.

María de Lourdes Sánchez Álvarez, Lissette Pérez Santos, Rafael Abreu Duarte. Mutaciones con efectos biológicos potenciales identificadas en variantes genéticas circulantes en Villa Clara. GENOMACENTRO 2023.

María de Lourdes Sánchez Álvarez, Rafael Abreu Duarte, Hilda D. Roque de Escobar Martín. Correlación entre la severidad clínica de pacientes con variantes genéticas de SARS-CoV-2 y valor del ciclo umbral. GENOMACENTRO 2023.

María de Lourdes Sánchez Álvarez. Oleadas de SARS-CoV-2 en un año de pandemia Villa Clara Cuba. Cuba Salud IV Convención Internacional de Salud. Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología Ponencia. 17-21 octubre 2022

Trabajos de Tesis

Autor: Norlenis Morales Cueto. Caracterización genética por secuenciación nucleotídica al SARS- COV-2 Laboratorio de Biología Molecular de Villa Clara.Tesis para optar por el título de especialista de 1er grado en Microbiología.

Autor: Yessica Pérez Sánchez. Caracterización virológica y epidemiológica de COVID-19 en el primer año pandémico en Villa Clara. Tesis para optar por el título de especialista de 1er grado en Microbiología.

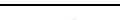
Reconocimientos a los resultados presentados en la tesis:

Premio CITMA Provincial otorgado a la Dra. María de Lourdes Sánchez Alvarez Por la innovación tecnológica año 2022. Detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en el laboratorio de Biología Molecular de Villa Clara.

Premio Relevante Fórum de Ciencia y Técnica otorgado a la Dra. María de Lourdes Sánchez Alvarez. Desempeño de UMELISA SARS-CoV-2 Standard F COVID-19 antígeno utilizando como prueba de referencia RT-PCR 2022.

Premio Relevante Fórum de Ciencia y Técnica otorgado a la Dra. María de Lourdes Sánchez Alvarez. Análisis filogenético en muestras secuenciadas de SARS-CoV-2 en Villa Clara 2022.

Premio Relevante Fórum de Ciencia y Técnica otorgado a la Dra. María de Lourdes Sánchez Alvarez 2022. Contribución de la RT-PCR en la vigilancia prospectiva espaciotemporal en la COVID-19 2023.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 1 DE 1
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Anexo 2

Siglas.

LBM: Laboratorio de Biología Molecular

EPP: Equipo de Protección Personal

CSB: Cabina de Seguridad Biológica

APP: Antecedentes Patológicos Personales

OBJETIVO

Describir el procedimiento de la entrada y recepción de muestras para diagnóstico de SARS CoV 2 de pacientes sospechosos.

ALCANCE

Este procedimiento se aplicará en el LBM de Villa Clara.

RESPONSABILIDADES

- Es responsabilidad de la dirección del laboratorio dar aseguramiento logístico de este proceso.
- Es responsabilidad de los especialistas, técnicos y licenciados que se ocupan de esta actividad, el estricto cumplimiento de este procedimiento.
- El jefe de laboratorio controlará y supervisará el cumplimiento de los requisitos generales de buenas prácticas en esta actividad.

FRECUENCIA

Esta operación se realiza diariamente

MEDIDAS DE SEGURIDAD

- Todos los procedimientos se efectúan en un Laboratorio BSL II y se cumplirán las normas de bioseguridad establecidas para el mismo.
- Utilizar guantes de seguridad durante el desarrollo del procedimiento de recepción que deberán ser desechados al terminar.
- Utilizar bata sanitaria que debe ser cambiada diariamente.
- Todos los pasos que conlleven manipulación de muestras biológicas se llevarán a cabo en un Cabina de seguridad biológica Clase II
- Local cerrado.
- Climatización permanente.
- Presencia de agua corriente.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 2 DE 2
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- Existencia de jabón o detergente y desinfectantes.

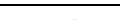
Materiales y Reactivos

- Laptops e Impresora láser hp
- CSB
- Refrigerador de 4°C – 8°C; Congeladores verticales de -20 °C y de -86 °C
- Etanol 70% (ver PNO preparación de soluciones y desinfectantes)
- Hipoclorito al 0,1% para desinfección de las manos y al 0,5% para uso sobre superficies
- Rotuladores
- Gradillas
- Cestos con bolsas de nylon identificadas como riesgo biológico
- Mesas de acero inoxidable
- EPP: Trajes de bioseguridad, batas, sobretapas, guantes de biología molecular, gorros.

PROCEDIMIENTO

Recepción de muestras

- Recepción de las muestras procedentes de las diferentes instituciones de salud de la provincia o región central por el pasillo lateral derecho hasta la ventana de Recepción de muestras donde la recepcionista, provista de EPP, las recibe en su triple empaque, en el interior de los termos, y aparte los listados de las muestras con las encuestas epidemiológicas correspondientes. El termo es colocado en un carro de metal con ruedas, que a su vez tiene una gaveta donde se colocan los listados de las muestras con las encuestas epidemiológicas. El carro con las muestras es trasladado por el pasillo central interior hasta la puerta del LBM.
- Revisar que cada muestra esté correctamente identificada y que se encuentre acompañada de un registro de solicitud individual con los siguientes datos:
 - Nombres y apellidos
 - Edad y sexo
 - Fecha de entrada
 - Número de identidad
 - Dirección del Carné de Identidad y dirección de residencia actual
 - Procedencia
 - Datos clínicos
 - Fecha de inicio de los síntomas
 - Fecha de toma de muestra

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 3 DE 3
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- Tipo de muestras
- Diagnóstico solicitado
- Ocupación
- APP y antecedentes epidemiológicos
- Identificación de las muestras con el código de la provincia y el número correspondiente según la base de datos.
- Entrada en la base de datos digital y libro de registro
- Cuantificación del número de muestras a procesar
- Selección del extractor de ácido nucleico que se utilizará según el número de muestras.
- Aceptar aquellas muestras que cumplan con los requisitos generales de las buenas prácticas:

Criterios de aceptación:

- Datos generales mencionados anteriormente
- Cuño del facultativo que la indica
- Volumen suficiente (en dependencia del tipo de muestra)
- Cumplir conservación y transporte establecidos para estudios moleculares

Criterios de rechazo:

- Muestras derramadas
- Uso de hisopos de algodón con vástagos de madera inadecuados para la toma de muestra de exudado nasofaríngeo
- El uso de medios de transporte virológicos que contengan heparina, etanol u otra sustancia que pueda inhibir la reacción de amplificación o que no sean compatibles con los kits de extracción disponibles
- Medios de transporte con cambios en su coloración
- Muestras contaminadas o que no cumplan con los requisitos mínimos de transporte biológico seguro con triple empaque
- Muestras que se transportan sin cadena de frío a temperatura de 4° C o que demoran más de 24 horas para su procesamiento
- Inadecuada identificación de los modelos de encuestas ni los medios de transporte con las muestras.

Conservación y transporte

- Las muestras deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio; de no ser posible, deben mantenerse durante 24 h en una temperatura de 4°C - 8 °C; si

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 4 DE 4
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

el procesamiento se demorará más de 24 h deben conservarse a -70 °C o -20 °C si no se dispone de esta temperatura.

- El transporte al laboratorio debe cumplir con las condiciones de temperatura en termos de conservación que mantengan de 4°C – 8 °C.
- En caso de requerir medios de conservación, utilizar los descritos por los kits correspondientes.

REGISTRO DE DATOS

La entrada de las muestras de exudado nasofaríngeo se inscribe en registros manuscritos y electrónicos.

REFERENCIAS

- Laboratory Biosafety Guidance Related to the Novel Coronavirus (2019-nCoV)-Interim Guidance. 2020. Available online: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)\(accessed](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)(accessed) on 8 June 2020)

Registro de entrada manuscrito de muestras de exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de SARS CoV 2

Fecha	Hora	Procedencia de la muestra	Código		Nro. De muestras
			Desde	Hasta	

Registro electrónico de entrada y salida (base de datos de Excel) de muestras de exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de SARS CoV 2

Código	Nombre y Apellidos	Edad	Sexo	Carnet de identidad	Dirección	Área de salud	Municipio	Provincia

Condición	País de procedencia	F. I. síntomas	F. toma de muestra	Tipo de muestra	Procedencia	Resultado	Ct	Fecha de resultado

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 5 DE 5
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

HISTORIAL DEL PROCEDIMIENTO

Se debe utilizar la última versión de este PNO, el cual coincidirá con la fecha más reciente de revisión.

	Nombres y apellidos	Cargo	Firma	Fecha	Cuño
Elaborado por:	Dra. María de L. Sánchez Alvarez	J' LBM del CPHEM			
	Dr. Edenis García Alvarez	Médico especialista		1/03/2020	
Revisado por:	Lic. Hilda D. Roque de Escobar Martín MSc.	Resp. Normalización			
Aprobado por:	Dr. Neil Reyes Miranda	Director			

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 6 DE 6
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Anexo 3

DEFINICIONES OPERATIVAS

Master mix o Mezcla maestra: es una mezcla que contiene precursores y enzimas que se utilizan como ingredientes en técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Biología Molecular.

Cebadores, primers o iniciadores: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN, acción realizada por la enzima Taq polimerasa.

Sondas de hidrólisis (TaqMan): son oligonucleótidos de unión específica al ADN diana marcados con un fluorocromo donador (reporter) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.

Carrier: ARN de pequeño tamaño que es componente de algunos kits de purificación de ARN, el cual permite mejorar la eficiencia de recuperación del ARN de la muestra.

Control interno o endógeno: es una secuencia de ADN o ADN complementario que es co-amplificado con el ADN diana y se usa principalmente para aumentar la confiabilidad de los ensayos.

Cycle threshold (Ct) o umbral de ciclos: es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas diana.

Siglas

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

LBM: Laboratorio de Biología Molecular

BSL II: Biosafety Laboratory class II

CSB: Cabina de Seguridad Biológica

EPP: Equipo de Protección Personal

ADN: Ácido desoxirribonucleótido

ARN: Ácido ribonucleico

BM: Biología Molecular

OPS: Organización Panamericana de la Salud

UV: Ultravioleta

Ct: Cycle threshold o umbral de ciclos

OBJETIVO

Describir el procedimiento de amplificación y detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de SARS CoV 2 mediante la RT-PCR en tiempo real de las muestras de pacientes sospechosos.

ALCANCE

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 7 DE 7
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Este procedimiento se aplicará en el LBM de Villa Clara.

RESPONSABILIDADES

- Es responsabilidad de la Dirección del laboratorio dar aseguramiento logístico de este proceso.
- Es responsabilidad de los especialistas, técnicos y licenciados que se ocupan de esta actividad, el estricto cumplimiento de este procedimiento.
- El jefe de laboratorio controlará y supervisará el cumplimiento de los requisitos generales de buenas prácticas en esta actividad.

FRECUENCIA

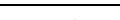
Según disponibilidad de reactivos de Master Mix y del número de muestras clínicas a procesar.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- Todos los procedimientos se efectúan en un laboratorio BSL II y se cumplirán las normas de bioseguridad establecidas para el mismo.
- Utilizar guantes de seguridad durante el desarrollo del ensayo que deberán ser desechados al terminar el protocolo.
- Utilizar bata sanitaria que debe ser cambiada para cada uno de los pasos
- Todos los pasos que conlleven manipulación de muestras biológicas se llevarán a cabo en un CSB Clase II
- Se utilizarán un juego de pipetas variables para cada procedimiento.
- Local cerrado.
- Climatización permanente.
- Presencia de agua corriente.
- Existencia de jabón o detergente y desinfectantes.

Equipos/instrumentos

- Extractor QIAcube
- Extractor QIAcube HT
- Laptop accesoria al QIAcube HT
- Impresora láser HP
- CSB
- Extractor Auto-Pure 96 A de Allsheng
- Refrigerador de 4°C– 8°C; Congeladores verticales de -20 °C y de -86 °C
- Lámparas de luz UV
- Vortex y centrífugas
- Equipo termociclador Rotor Gene Q
- Equipo termociclador SLAN-YGP

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 8 DE 8
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- Laptops accesorias a los termocicladores
- Work Station

Materiales

- Pipetas Eppendorf graduadas de (10, 20, 100 y 1000) µl
- Puntas con filtro estériles de (10, 20, 100 y 1000) µl
- Viales Eppendorf estériles de (0,1; 0,2 y 1,5) mL
- Placa de 96 pocillos (FastOpticalAppliedBiosystems)
- Gradilla refrigerada para placa de 96 pocillos y viales.
- Marcadores
- Gasa estéril
- Contenedor para puntas desechables
- Bolsas de polipropileno
- Cestos con bolsas de nylon identificadas como riesgo biológico
- Mesas de acero inoxidable
- Estantes de acero inoxidable
- EPP: Trajes de bioseguridad, batas, guantes de biología molecular, gorros.

Reactivos y soluciones

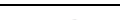
- Agua destilada ultra pura de grado molecular (libre de RNAsa y DNAsa)
- RNAasa
- Etanol 70% (ver PNO preparación de soluciones y desinfectantes)
- Hipoclorito al 0,1% para desinfección de las manos y al 0,5% para uso sobre superficies (ver PNO preparación de soluciones y desinfectantes)
- Kits para extracción automatizada de ARN viral (QIAamp viral RNA Mini kit)
- Kit de extracción CEA-NANO+RNA 3.0
- Reactivos de Master Mix liofilizados suministrados por la OPS (*In house*)
- Enzimas QuantiFast, Multiplex Ligh Cycler, SuperScript™ y AgPath-ID™ de Invitrogene

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La RT-PCR en tiempo real es una técnica de biología molecular en la cual los procesos de amplificación y detección viral se producen de manera simultánea en un mismo tubo cerrado, sin necesidad de algún procedimiento posterior. En estos, el producto de la reacción es detectado mediante el incremento de una señal fluorescente generada durante la propia reacción, la cual es proporcional a la cantidad del producto formado y se visualiza en una computadora.

La PCR en tiempo real presenta diferentes ventajas:

- Rapidez en la obtención del resultado, lo que la hace más eficiente y aumenta la capacidad diagnóstica del laboratorio.
- Utiliza sistemas cerrados, disminuyendo el riesgo de contaminación.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 9 DE 9
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- Además, permite realizar la cuantificación del ácido nucleico presente en la muestra y la identificación de mutaciones puntuales de importancia clínica o terapéutica.
- Por otra parte, las sondas marcadas con moléculas fluorogénicas de diferente longitud de onda para diferentes juegos de cebadores, posibilitan el desarrollo de los sistemas múltiples de detección.

El protocolo para la detección del virus SARS-CoV-2 emitido por el Centro para el Control de Enfermedades (por sus siglas en inglés, CDC), incluye 2 juegos de cebadores y sondas de hidrólisis (TaqMan) para la detección cualitativa del virus en muestras clínicas. Los cebadores y sondas del gen E están diseñados para la detección SARS-CoV y SARS-CoV-2. El ensayo está diseñado para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

Proceso de extracción de ácidos nucleicos

El proceso de extracción y purificación, previo a la fase de amplificación, permite obtener ácido nucleico de alta pureza que puede o no contener la diana molecular (target), libre de otros compuestos y de enzimas de restricción.**1-3**

Para realizar este paso se han empleado los instrumentos QIAcube, QIAcube HT de QIAGEN y Auto-Pure 96 de Allsheng.

El instrumento Qiacube se ha diseñado para aislar y purificar ácidos nucleicos de forma automatizada de alto rendimiento en formato de columnas giratorias de sílice. Los usuarios pueden, rápidamente y fácilmente, purificar ADN o ARN de casi cualquier tipo de muestra (incluyendo exudado nasofaríngeo).

Qiacube incluye una centrífuga, un agitador calentado, un sistema de pipeteo y una pinza robótica. Estos permiten que se automaticen completamente más de 80 kits de columna giratoria de QIAGEN.

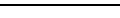
Qiacube HT permite la extracción y purificación automatizada de ácidos nucleicos de alto rendimiento en formato de 96 pocillos usando también la tecnología de membrana de sílice, pero por el método bomba al vacío.

Auto-Pure 96 A de Allsheng es un dispositivo automatizado que emplea el método de perlas magnéticas y presenta una fase manual previa.

OPERACIONES PRELIMINARES

- Selección del protocolo correspondiente según el equipo de extracción empleado
- Organización de la superficie de trabajo de la CSB

Rotular los viales con el código correspondiente, decantar las muestras en la CSB y diseñar el protocolo (Work Sheet) de trabajo de las muestras para su extracción.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 10 DE 10
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

PROCEDIMIENTO

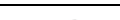
Guía de manejo práctico para la extracción de ARN por equipo automatizado QIAcube empleando el QIAamp viral RNA Mini kit de QIAGEN (preparación de insumos y reactivos):

- Rehidratar el carrier ARN con 310 µL de solución buffer AVE, mantener en congelación (-20°C)
- Calcular la solución buffer AVL (Buffer Lisis) y Carrier en un tubo cónico de 15 mL de acuerdo a la cantidad de muestras.
- Distribuir 560 µL de la solución de lisis a los tubos colectores, agregar 140 µL de la muestra problema y homogenizar por pipeteo (2 veces)
- Preparar los buffers de lavado AW1 y AW2 diluyendo con etanol (96-100%) según la cantidad indicada en los frascos
- Colocar en el adaptador las columnas y los tubos de elución enumerando (1-12), luego abrir las tapas de las columnas y encajar en la posición del adaptador
- Encender el equipo de extracción y acceder al programa del equipo (QIAcube) QIAamp Viral RNA
- Verificar que los frascos de soluciones de buffer, AVE, AW1, AW2 y etanol (96-100%), deben contener el volumen señalado y verificar que las puntas especiales (1000 µL) estén llenos en la porta puntas
- Ubicar las muestras en el orden establecido en la plataforma del equipo
- Ubicar los adaptadores con las columnas en el orden correlativo del rotor del equipo
- Al terminar el proceso retirar los adaptadores del equipo y las columnas que contiene la elución de ARN
- El ARN extraído se almacena en el refrigerador de 2 a 8°C hasta continuar con la prueba molecular de PCR. En caso de no utilizar ese mismo día, se conserva de -20 a -70°C para conservar la estabilidad del ARN.

Guía de manejo práctico del extractor QIAcube.

Para iniciar un protocolo:

1. Encienda el QIAcube.
 - Se escuchará un sonido y aparecerá la pantalla de inicio.
 - El instrumento automáticamente realizará pruebas de inicialización.
2. Seleccione la aplicación del menú principal presionando “Cleanup”, “DNA”, “Protein”, “RNA” o “Virus”.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 11 DE 11
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

3. Seleccione el nombre del kit presionando “▲” o “▼” para desplazarse en la lista hasta que el nombre del kit correcto se sombree. Oprima “Select”.
4. Seleccione el tipo de muestra (este paso puede no ser solicitado por todos los protocolos), presione “▲” o “▼” para seleccionar en la lista el tipo de muestra. Presione “Select”.
5. Dependiendo del protocolo, puede haber más opciones disponibles. Seleccione el protocolo presionando “▲” o “▼” y presione “Select”.
6. Para iniciar una corrida de protocolo presione “Start” y proceda al paso 9. Para introducir valores definidos por el usuario presione “Edit”.
7. Presione “▲” o “▼” para seleccionar el parámetro que desea editar, por ejemplo, “Elution volumen” y presione “Select”.
8. Cambie el volumen de elución presionando “+” o “-”. El valor que está programado se muestra en el botón “Default”. Presione “Save” para guardar los cambios. El parámetro que se haya modificado se mostrará en rojo. Presione “Back” para salir del modo de edición.
9. El botón “Edit” nos indicará que el protocolo ha sido modificado. Si desea que los reportes se guarden automáticamente en una memoria USB, introduzca la memoria en el puerto USB. Presione “Start” para iniciar la corrida del protocolo.

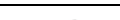
Para iniciar una corrida:

1. Abra la puerta del QIAcube.
2. Siga las instrucciones de la hoja del protocolo y las que se muestran en la pantalla táctil para colocar las muestras, reactivos y material de laboratorio.
Se le indicará que:
Vacíe el cajón de desechos.
Coloque el rack de puntas en el área de trabajo.
Llene las botellas de reactivo y coloque el rack de las botellas de reactivos en el área de trabajo. Asegúrese de quitar las tapas de las botellas antes de colocarlas.
Cargue los tubos de buffer que se requieren en el protocolo en las posiciones A, B o C.
Coloque los adaptadores de rotor cargados en las canastillas de la centrífuga.
Cargue el rack del agitador con muestras y colóquelo en el agitador. Asegúrese de usar el adaptador del agitador correcto, como se describe en la hoja de protocolo.
3. Cierre la puerta del QIAcube.

Al término de la corrida

Cuando la corrida del protocolo ha terminado, un mensaje será desplegado en la pantalla táctil confirmando que las muestras han sido procesadas. Siga las instrucciones en la pantalla táctil para la limpieza del área de trabajo.

1. Retire de la microcentrífuga los tubos que contengan los ácidos nucleicos purificados de los adaptadores del rotor.
2. Deseche los tubos de las muestras, adaptadores de rotor y reactivos de acuerdo a las normas locales de seguridad.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 12 DE 12
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

3. Cambie las tapas de las botellas de reactivos y ciérrelas fuertemente. Guarde las botellas de acuerdo a las instrucciones del manual del equipo.
4. vacíe el cajón de desechos.
5. Corra otro protocolo, o apague el QIAcube.

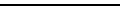
Guía de preparación de soluciones y reactivos para extracción por QIAcube HT.

Para inactivación de la muestra:

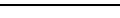
- Añadir 1556 µL de AVE al frasco de Carrier (ARN de pequeño tamaño que es componente de algunos kits de purificación, el cual permite mejorar la eficiencia de recuperación del ARN de la muestra) de tapa roja. Homogenizar.
- Unir en un frasco, 470 µL del Carrier previamente preparado, más 15 mL de reactivo de lisis ACL.
- Dispensar en cada pocillo de la placa de muestras del extractor 160 µL de este reactivo (Carrier, AVE y ACL) + 200 µL de muestra. Homogenizar.
- Preparar los buffers de lavado AW1 y AW2 diluyendo con etanol (96-100%) según la cantidad indicada en los frascos
- Colocar la placa de muestras y los comederos con los reactivos en cada posición correspondiente, según el número de determinaciones a procesar.
- Realizar la extracción de ácidos nucleicos según el protocolo del QIAcube HT.

Guía de manejo práctico del extractor QIAcube HT.

- Encender la laptop accesoria al equipo
- Encender el equipo (verificar sonido de arranque)
- Seleccionar el ícono QIAcube HT y abrir el Software (Esperar confirmación del equipo por movimiento del brazo)
- Seleccionar protocolo en **QProtocols** (QIAamp® 96 Virus QIAcube® HT V1). **Clic** en Open
- Seleccionar el **ícono de luz UV** en el Software y configurar el tiempo de acción durante 15 minutos. Asegurarse de que el **sello rojo de seguridad esté colocado**
- **Clic** en Open Wizard y seleccionar el número de muestras a trabajar. **Clic** en **Jump to end**. **Clic** en finish
- Se muestra en la ventana las cantidades correspondientes de cada reactivo según el número de muestras codificadas
- EPP correspondientes: guantes nuevos, etc.
- Preparación de los reactivos no reutilizables: **proteínasa K y ACL mix**

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 13 DE 13
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

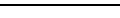
- Situar los recipientes de los reactivos de extracción según la imagen mostrada en el software (verificar que no exista superposición)
- Sellar las columnas que no vayan a ser utilizadas y las que ya se utilizaron en reacciones previas, en la placa de muestras
- Colocar la placa con las muestras previamente dispensadas en la CSB en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Sellar las columnas que no se vayan a utilizar y las que fueron utilizadas en reacciones previas, de la placa de membranas
- Colocar la placa de membranas y sus accesorios en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Verificar la posición adecuada de la placa de membranas mediante un toque hacia la izquierda y abajo
- Colocar la cantidad de puntas según el cálculo para el número de muestras a procesar (puede observarse en el ícono Generate Pre-run Report)
- Seleccionar en la imagen del Software en la región de las puntas la disponibilidad de las mismas:
- **Clicken:** Set selected tips to “Available” o “Unavailable”, cuando **NO** se vaya a utilizar la placa de puntas completa si no, las marcadas previamente
- **Click en:** Set all tips on current plates to “Available” o “Unavailable”, cuando **SÍ** se vaya a utilizar la placa de puntas completa
- **Colores a tener en cuenta:** **Azul** (puntas nuevas); **Rojo** (puntas utilizadas); **Blanco** (No hay puntas en dicha columna de la placa)
- Colocar la placa de elusión destapada en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Asegurarse de que el **sello rojo de seguridad** esté retirado
- Asegurarse de que el recipiente de desecho de las puntas esté colocado fuera del equipo
- Seleccionar ícono **Start** (triángulo verde) en el Software
- Completar verificación del procedimiento en **Chek list**
- **OK**
- Esperar culminación del proceso
- Guardar el proceso de extracción
- Taponear los viales de la placa de elusión que contiene el ácido nucleico extraído, guardarlo en refrigeración a 4°C – 8°C si no se va a utilizar inmediatamente; o trasladarlo a la sección de amplificación si la reacción de amplificación de realizará inmediatamente.
- Retirar todos los recipientes y accesorios del equipo
- Limpieza manual con gasas y agua destilada del equipo

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 14 DE 14
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- Limpieza automática: Seleccionar el **ícono Clean vaccum** (cubo). Añadir 20 ml de agua destilada en el (Waste Chamber) espacio donde se coloca la placa de membranas.
- Cerrar el equipo
- Revisar los requisitos que muestran en la ventana de diálogo. **Seleccionar casilla: Run UV cleaning operation before closing? ***Clic en NEXT.** Esperar sonido **Clic en Next nuevamente**
*** La configuración de la luz UV se puede realizar aparte mediante el ícono Light UV control (bombillo amarillo)
- Esperar culminación del proceso
- Cerrar el Software
- Apagar el equipo
- Apagar laptop
- El ícono **Bottle** se debe revisar al culminar cada proceso para que muestre el nivel de líquido de desecho que contiene la botella de vacío

Procedimiento para la extracción por Auto-Pure 96 A de Allsheng utilizando el kit CEA-NANO+RNA 3.0

- Dispensar los reactivos de extracción para Auto-Pure96 disponible en el kit CEA-NANO+RNA 3.0. en los bloques correspondientes: SLV-1- Solución de lavado 1 (500 µl), SLV-2- Solución de lavado 2 (500 µl), SLV-3- Solución de lavado 3 (500 µl), SE-RNA 3.0- Solución de elución RNA 3.0 (50 µl), SLU-RNA 3.0- Solución de Lisis-Unión RNA 3.0 (200µl) y NESP-A380- Solución de NESP-A380 (100µl).
- Dispensar en la CSB la cantidad de muestra en los bloques preparados con los reactivos de lisis y la perla para Auto-Pure96, correspondientes para el proceso de extracción: - Auto-Pure96: DNA y RNA: 200 µl
- Dispensar la SP-RNA 3.0- Solución de precipitación RNA 3.0 (400 µl) en el bloque de la muestra
- Preparación del equipo de extracción seleccionado según el protocolo correspondiente disponible en la sección y/o en formato digital en la computadora del LBM
- Conservación del ácido nucleico extraído en el refrigerador correspondiente a 4°C – 8 °C
- Limpieza del área de trabajo y de los equipos.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 15 DE 15
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Proceso de preparación de master mix

El protocolo para la detección del virus SARS-CoV-2 donado por la OPS incluye 4 juegos de cebadores y sondas de hidrólisis (TaqMan) para la detección cualitativa del virus en muestras clínicas. Los cebadores y sondas del gen E están diseñados para la detección SARS CoV y SARS-CoV-2.

Por otra parte, los iniciadores y sondas del gen RdRp permiten confirmar la infección por SARS-CoV-2 pues este constituye el gen que codifica para la enzima RdRp, específica del virus en replicación activa.

Estos dos ensayos incluyen: Tamizaje (gen E): Primers E-Sarbeco-F1 y E-Sarbeco-R2, Sonda E-Sarbeco-P1; Confirmación (gen RdRp): Primers RdRp-SARSr-F2 y RdRp-SARSr-R1, Sonda RdRp-SARSr-P2.

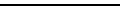
A los 20 µl de componentes in house para la reacción (buffers, agua de BM, primers, control endógeno, enzimas Taq polimerasa, enzima reversotranscriptasa y oligonucleótidos) se les adiciona al terminar este proceso, por cada reacción, 5 µl del material genético extraído.

OPERACIONES PRELIMINARES

- Confeccionar los protocolos de mezcla para el cálculo de los volúmenes empleados en Master Mix correspondiente.
- Utilizar los medios de protección personal o EPP específicos con los que cuenta la sección como sobrebata, gorro, guantes nuevos no reutilizables sin talco solo para uso en la sección Master Mix.
- Limpiar las superficies de trabajo, el Work Station, las pipetas y gradillas con solución ADN/ARN away o en su defecto alcohol al 90%; siempre con gasa estéril y no con algodón.
- Atemperar los reactivos con que dispone la Master Mix o las alícuotas a utilizar.
- Aplicar luz ultravioleta al Work Station antes de comenzar el trabajo y al finalizar.

Procedimiento para la preparación de la mezcla de ensayos RT-PCR de Invitrogene según Protocolo de Charité, Berlín, Alemania.

- **Preparación de primers y sondas liofilizadas:**
- Los iniciadores y sondas son, por lo general, fáciles de resuspender en una solución acuosa:
- Centrifugar brevemente los tubos antes de abrirlos para asegurar que el material liofilizado se encuentre en el fondo del tubo.
- Resuspender en tampón E (Tris 10 mM, EDTA 0.1 Mm, pH 8.0) o en agua de Biología Molecular libre de RNAasa/DNAasa para una concentración de stock de 100 µM.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 16 DE 16
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- El volumen de tampón TE o agua requerida para obtener un stock de 100 µM se determina usando la siguiente fórmula: $\text{volumen} = \frac{\text{cantidad de oligonucleótido}}{\text{concentración}}$.
- Alicuotar los iniciadores y sondas. El volumen de las alícuotas dependerá del uso de los mismos con el objetivo de minimizar los ciclos descongelación-congelación.
- Preparar alícuotas de trabajo a una concentración final de 10 µM (dilución 1/10 en tampón TE o agua del stock a 100 µM).
- Los iniciadores y sondas resuspendidos (tanto alícuotas de stock como de trabajo) se almacenan a -20°C y son estables a esa temperatura durante al menos 24 meses. Las sondas se almacenan en tubos ámbar (oscuros) o cubiertos con papel de aluminio para evitar exposición prolongada a la luz.
- **Preparación de Master Mix:**
 - Después de haber preparado la mezcla de reacción de acuerdo a la fórmula total correspondiente, se dispensan 20 µL de esta mezcla de reacción en cada vial. Los viales preparados con la mezcla de reacción y cubierta con papel de aluminio en la gradilla refrigerada se trasladan al laboratorio de amplificación, donde se colocan 5 µL de ácido nucleico en el pocillo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 µL. Seguidamente se colocará 5 µL de los controles positivo y negativo.
 - Trabajar siempre con pipetas graduadas limpias libres de DNA/RNAsas y utilizando puntas con filtro también libres de DNA/RNAsas propias de la sección.
 - Nunca transportar los viales con la mezcla para la reacción por fuera del laboratorio; deben situarse en la placa de cámara fría a través del transfer y trasladarlos hacia la sección de amplificación de ácidos nucleicos. No manipular ácido nucleico en esta sección.

Proceso de amplificación y detección

OPERACIONES PRELIMINARES

- Preparar la superficie de trabajo
- EPP: guantes nuevos
- Rotular los viales en correspondencia con los números y código de las muestras y controles

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 17 DE 17
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

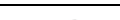
PROCEDIMIENTO

Equipo termociclador Rotor Gene Q:

- Añadir el ácido nucleico extraído de cada muestra y los controles al correspondiente vial con la mezcla de la reacción
- Preparar el equipo de amplificación: **Rotor-Gene Q: Encender laptop--- luego encender el Rotor Gene ---- por último, encender el Software.**
- Colocar el 36-Well Rotor de color rojo o el 72-Well Rotor de color azul (según el número de muestras a analizar) en el Rotor gene
- Configuración del protocolo diagnóstico que se desarrollará o selección de la plantilla del mismo si ya está configurado (ver más adelante Programación del termociclador)
- Codificación de las muestras en la corrida
- Interpretación de los resultados
- Retirar los viales de la reacción
- Cerrar Software --- Apagar el Rotor Gene --- Apagar laptop

Equipo termociclador SLAN-YGP:

- Encender el Equipo y después la Laptop.
- Abrir el Software (SLAN Real time PCR System 8.2.2)
- Abrir el botón Experiment Wizard.
- Se activa botón Setup y se completa con los siguientes datos:
- Experiment name: Se completa con el día y la hora si no se completa por defecto.
- Experiment Type: Qualitative Absolute
- Seleccione los bloques a procesar. Bloque A- Bloque B
- Se activa el botón Plate:
- Para seleccionar la placa completa (2 bloques) se para el cursor en el cuadro en blanco de la esquina superior izquierda.
- Si se van a seleccionar casillas independientes mantener presionado el botón control y marcar el número de columnas según el número de muestras.
- Para desmarcarse colocar el cursor en la posición A1.
- En esta ventana se pueden editar las muestras: Control positivo, control negativo y numerar cada una de las muestras.
- Hacia la izquierda están las columnas y hacia la derecha está la ventana de edición de muestras.
- La edición de las muestras también se puede realizar en la ventana que activa el botón Sample.
- Se inicia la corrida en el botón Run.
- Ante de presionar el botón Star, ir a la barra plegable que se encuentra en la esquina inferior derecha y seleccionar la opción Row, lo que activa los colores para cada muestra.
- Luego se presiona el botón Star.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 18 DE 18
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Para crear un protocolo nuevo:

- Activar Project / crear/ poner nombre del reactivo o determinación a utilizar.
- Seleccionar los canales
- Nombrar el gen o target a detectar en cada canal Ej. Gen E o Gen RdRp
- Ir a Program y programar el ciclaje. Guardar.

Programación del termociclador o ciclaje (según Protocolo de Charité, Berlín, Alemania): En este acápite se describen el ciclaje original de los 2 ensayos (de tamizaje y confirmación) suministrados por la OPS con el uso de enzimas de Invitrogene, y otras variaciones con el empleo de las enzimas QuantiFast y Multiplex Ligh Cycler.

- **Ciclaje con el uso de enzimas de Invitrogene:**

SuperScript™ One-Step qRT-PCR Kit (Ensayo de tamizaje)

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	30 min	1*
Hold	95°C	2 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 min	45
Hibridación***	58°C	30 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen E

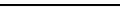
AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Ensayo de confirmación)

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	30 min	1*
Hold	95°C	10 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 min	45
Hibridación***	58°C	30 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen RdRp

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 19 DE 19
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

• **OPS con Enzima Multiplex Light Cycler:**

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	20 min	1*
Hold	95°C	5 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación***	60°C	30 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen E
Red (Cy5) ---C. Interno

• **OPS adaptado con Enzima QuantiFast:**

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	30 min	1*
Hold	95°C	2 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación***	58°C	30 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen E

• **Confirmatorio RdRp Polimerasa con Enzima Quantifast:**

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	20 min	1*
Hold	95°C	5 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación***	60°C	30 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen RdRp
Red (Cy5) ---C. Interno

• **RdRp Confirmatory test:**

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hold	50°C	30 min	1*
Hold	95°C	2 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación***	60°C	45 seg	

*Transcripción inversa

**Activación de la ADN polimerasa

*** Adquisición de canales: Green (FAM) --- Gen RdRp
Red (Cy5) ---C. Interno

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 20 DE 20
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Lectura de canales.

- Gen E y Gen RdRp: Canal Green (excitación 470 nm, detección 510 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente FAM permite detectar SARS-CoV-2.
- Gen del Control interno (Gen de la B-actina): Canal Red (excitación 610 nm, detección 670 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente Cy5 permite detectar ADN del Gen B-actina humano como control interno.

Informe de resultados.

- **Muestra positiva:** Valor de $Ct \leq 40$ y curva de amplificación con morfología sigmoidal característica, se reportará como SARS-CoV-2 (Gen E o Gen RdRp)
- **Muestras negativas:** Valor de $Ct > 40$ o no amplificación detectada (Gen E o Gen RdRp) y un Ct del Control interno menor o igual a 40 y con curva de amplificación sigmoidal característica.
- Aquellas muestras que tengan valor del Control interno mayor a 40 o no detectable se deberá volver a realizar el proceso de extracción y RT-PCR; si la muestra aun así no presenta curva de amplificación en ningún canal, esta deberá ser rechazada como muestra insuficiente y poner en observaciones: muestra no cuenta con la cantidad de células necesarias en la reacción de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, se recomienda una nueva toma de muestra.
- El analista registra los datos en el protocolo de corrida, anotando en el canal de lectura correspondiente los valores de Ct de los controles internos y de las muestras que resultaron confirmadas.
- Este registro es revisado por el profesional responsable de la sección. Se entrega al analista para el ingreso en el sistema informático.

REGISTRO DE DATOS

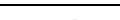
El proceso de extracción de las muestras de exudado nasofaríngeo se inscribe en registros Work Sheet manuscritos y electrónicos.

Se dispone de los protocolos de corridas donde se plasman los resultados.

La entrada de las muestras de exudado nasofaríngeo y la emisión de sus resultados se inscribe en registros electrónicos o bases de datos.

REFERENCIAS

- Protocolo de la OPS de Charite, Berlin. Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/25/3/eurosurv---25---3--5.pdf?expires=1580420806&id=id&accname=quest&checksum=D2E250BE3914A24D9381FC9538EFF11D>
- QIAcube® HT User Manual. June 2013

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 21 DE 21
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

- QIAamp® 96 Virus QIAcube® HT Handbook. February 2015
- Rotor-Gene® Q User Manual. Versión 2. February 2012

Work Sheet para extracción. QIAcube Modelo LBM 01.

Equipo:			
Fecha:			
Reactivo:			
Lote:			
Nro Corrida:			
	Código de la muestra		Código de la muestra
1		7	
2		8	
3		9	
4		10	
5		11	
6		12	

Work Sheet para extracción. QIAcube HT/Auto-Pure 96. Modelo LBM 02.

Equipo:					Fecha:							
Reactivo:					Lote:							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo de solución buffer AVL (Buffer lisis) y Carrier para extracción por QIAcube.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 22 DE 22
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

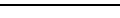
Nro. de muestras	Buffer AVL (ml)	Carrier ARN y AVE (µL)
1	0,56	5,6
2	1,12	11,2
3	1,68	16,8
4	2,24	22,4
5	2,80	28,0
6	3,36	33,6
7	3,92	39,2
8	4,48	44,8
9	5,04	50,4
10	5,60	56,0
11	6,16	61,6
12	6,72	67,2

Volumen de soluciones empleadas para la preparación de primers y sondas liofilizados donados por OPS (Protocolo de Charité, Berlín, Alemania)

Iniciador o sonda	Cantidad de oligonucleótido	Concentración de stock	Volumen de TE o agua
E-Sarbeco-F1	46,52 nmol	100 µM	465,2 µl
E-Sarbeco-R2	28,72 nmol	100 µM	287,2 µl
E-Sarbeco-P1	20,71 nmol	100 µM	207,1 µl
RdRp-SARSR-F2	47,77 nmol	100 µM	477,7 µl
RdRp-SARSR-R1	27,93 nmol	100 µM	279,3 µl
RdRp-SARSR-P2	20,69 nmol	100 µM	206,9 µl

Preparación de Master Mix según Protocolo de Charité, Berlín, Alemania.

Ensayo de tamizaje	
Componente	Volumen por reacción
Agua (libre de RNAasa/DNAasa)	4,5 µl
Tampón de reacción (2x)	12,5 µl
E-Sarbeco-F1 (10µM)	1µl
E-Sarbeco-R2 (10µM)	1µl
E-Sarbeco-P1 (10µM)	0,5 µl
enzima	0,5 µl
Total por reacción	20 µl

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 23 DE 23
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

Ensayo de confirmación	
Componente	Volumen por reacción
Agua (libre de RNAasa/DNAasa)	3,0 µl
Tampón de reacción (2x)	12,5 µl
RdRp-SARSr-F2 (10µM)	1,5 µl
RdRp-SARSr-R1 (10µM)	2 µl
RdRp-SARSr-P2 (10µM)	0,5 µl
enzima	0,5 µl
Total por reacción	20 µl

Protocolo de corrida para 72 muestras por Rotor Gene Q.

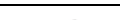
Nro Corrida:								
Fecha:								
No	Código	Green	Red	No	Código	Green	Red	
1				36				
2				37				
3				38				
4				39				
5				40				
6				41				
7				42				
8				43				
9				44				
10				45				
11				46				
12				47				
13				48				
14				50				
15				51				
16				52				
17				53				
18				54				
19				55				
20				56				
21				57				
22				58				
23				59				
24				60				

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 24 DE 24
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

25				61				
26				62				
27				63				
28				64				
29				65				
30				66				
31				67				
32				69				
33				70				
34				C. Positivo				
35				C. Negativo				

Protocolo de corrida para 96 muestras por Rotor Gene Q y SLAN-YGP.

Nro Corrida:							
Fecha:							
No	Código	Green	Red	No	Código	Green	Red
1				49			
2				50			
3				51			
4				52			
5				53			
6				54			
7				55			
8				56			
9				57			
10				58			
11				59			
12				60			
13				61			
14				62			
15				63			
16				64			
17				65			
18				66			
19				67			
20				68			
21				69			
22				70			

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 25 DE 25
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

23				71			
24				72			
25				73			
26				74			
27				75			
28				76			
29				77			
30				78			
31				79			
32				80			
33				81			
34				82			
35				83			
36				84			
37				85			
38				86			
39				87			
40				88			
41				89			
42				90			
43				91			
44				92			
45				93			
46				94			
47				C. Positivo			
48				C. Negativo			

Registro electrónico de entrada y salida (base de datos de Excel) de muestras de exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de SARS CoV 2.

Código	Nombre y Apellidos	Edad	Sexo	Carnet de identidad	Dirección	Área de salud	Municipio	Provincia

Condición	País de procedencia	F. I. síntomas	F. toma de muestra	Tipo de muestra	Procedencia	Resultado	Ct	Fecha de resultado

HISTORIAL DEL PROCEDIMIENTO

Se debe utilizar la última versión de este PNO, el cual coincidirá con la fecha más reciente de revisión.

	Procedimiento N.º 2	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 26 DE 26
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (SEGÚN PROTOCOLO DE CHARITÉ, BERLÍN, ALEMANIA)		

	Nombres y apellidos	Cargo	Firma	Fecha	Cuño
Elaborado por:	Dra. María de L. Sánchez Alvarez	J' LBM del CPHEM		1/03/2020	
	Dr Edenis Garcia Alvarez	Médico especialista			
Revisado por:	Lic. Hilda D. Roque de Escobar Martín MSc.	Resp. Normalización			
Aprobado por:	Dr. Neil Reyes Miranda	Director			

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 1 DE 1
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Anexo 4

DEFINICIONES OPERATIVAS

Master mix o Mezcla maestra: es una mezcla que contiene precursores y enzimas que se utilizan como ingredientes en técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Biología Molecular.

Cebadores, primers o iniciadores: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN, acción realizada por la enzima Taq polimerasa.

Sondas de hidrólisis (TaqMan): son oligonucleótidos de unión específica al ADN diana marcados con un fluorocromo donador (reporter) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.

Carrier: ARN de pequeño tamaño que es componente de algunos kits de purificación de ARN, el cual permite mejorar la eficiencia de recuperación del ARN de la muestra.

Control interno o endógeno: es una secuencia de ADN o ADN complementario que es co-amplificado con el ADN diana y se usa principalmente para aumentar la confiabilidad de los ensayos.

Cycle threshold (Ct) o umbral de ciclos: es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas diana.

Siglas

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

LBM: Laboratorio de Biología Molecular

BSL II: Biosafety Laboratory class II

CSB: Cabina de Seguridad Biológica

EPP: Equipo de Protección Personal

ADN: Ácido desoxirribonucleótido

ARN: Ácido ribonucleico

BM: Biología Molecular

UV: Ultravioleta

Ct: Cycle threshold o umbral de ciclos

OBJETIVO

Describir el procedimiento de amplificación y detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de SARS CoV 2 mediante la RT-PCR en tiempo real de las muestras de pacientes sospechosos.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 2 DE 2
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

ALCANCE

Este procedimiento se aplicará en el LBM de Villa Clara.

RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad de la Dirección del laboratorio dar aseguramiento logístico de este proceso.
2. Es responsabilidad de los especialistas, técnicos y licenciados que se ocupan de esta actividad, el estricto cumplimiento de este procedimiento.
3. El jefe de laboratorio controlará y supervisará el cumplimiento de los requisitos generales de buenas prácticas en esta actividad.

FRECUENCIA

Según disponibilidad de reactivos de Master Mix y del número de muestras clínicas a procesar.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- Todos los procedimientos se efectúan en un laboratorio BSL II y se cumplirán las normas de bioseguridad establecidas para el mismo.
- Utilizar guantes de seguridad durante el desarrollo del ensayo que deberán ser desechados al terminar el protocolo.
- Utilizar bata sanitaria que debe ser cambiada para cada uno de los pasos
- Todos los pasos que conlleven manipulación de muestras biológicas se llevarán a cabo en un CSB Clase II
- Se utilizarán un juego de pipetas variables para cada procedimiento.
- Local cerrado.
- Climatización permanente.
- Presencia de agua corriente.
- Existencia de jabón o detergente y desinfectantes.

Equipos/instrumentos

- Extractor QIAcube
- Extractor QIAcube HT
- Laptop accesoria al QIAcube HT
- Impresora láser HP
- CSB
- Extractor Auto-Pure 96 A de Allsheng
- Refrigerador de 4°C – 8°C; Congeladores verticales de -20 °C y de -86 °C
- Lámparas de luz UV
- Vortex y centrífugas
- Equipo termociclador Rotor Gene Q
- Equipo termociclador SLAN-YGP

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 3 DE 3
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Laptops accesorias a los termocicladores
- Work Station

Materiales

- Pipetas Eppendorf graduadas de (10, 20, 100 y 1000) µl
- Puntas con filtro estériles de (10, 20, 100 y 1000) µl
- Viales Eppendorf estériles de (0,1; 0,2 y 1,5) mL
- Placa de 96 pocillos (FastOpticalAppliedBiosystems)
- Gradilla refrigerada para placa de 96 pocillos y viales.
- Marcadores
- Gasa estéril
- Contenedor para puntas desechables
- Bolsas de polipropileno
- Cestos con bolsas de nylon identificadas como riesgo biológico
- Mesas de acero inoxidable
- Estantes de acero inoxidable
- EPP: Trajes de bioseguridad, batas, guantes de biología molecular, gorros.

Reactivos y soluciones

- Agua destilada ultra pura de grado molecular (libre de RNAsa y DNAsa)
- RNAsa
- Etanol 70% (ver PNO preparación de soluciones y desinfectantes)
- Hipoclorito al 0,1% para desinfección de las manos y al 0,5% para uso sobre superficies.
- Kits para extracción automatizada de ARN viral (QIAamp viral RNA Mini kit)
- Kit de extracción CEA-NANO+RNA 3.0
- Kit RIDA®GENE SARS-CoV-2
- Kit de Sentinel: STAT NAT COVID-19 MICRO

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La RT-PCR en tiempo real es una técnica de biología molecular en la cual los procesos de amplificación y detección viral se producen de manera simultánea en un mismo tubo cerrado, sin necesidad de algún procedimiento posterior. En estos, el producto de la reacción es detectado mediante el incremento de una señal fluorescente generada durante la propia reacción, la cual es proporcional a la cantidad del producto formado y se visualiza en una computadora.

La PCR en tiempo real presenta diferentes ventajas:

- Rapidez en la obtención del resultado, lo que la hace más eficiente y aumenta la capacidad diagnóstica del laboratorio.
- Utiliza sistemas cerrados, disminuyendo el riesgo de contaminación.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 4 DE 4
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Además, permite realizar la cuantificación del ácido nucleico presente en la muestra y la identificación de mutaciones puntuales de importancia clínica o terapéutica.
- Por otra parte, las sondas marcadas con moléculas fluorogénicas de diferente longitud de onda para diferentes juegos de cebadores, posibilitan el desarrollo de los sistemas múltiples de detección.

El ensayo **RIDA®GENE SARS-CoV-2** es una RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa del ARN del coronavirus (SARS-CoV-2) a partir de hisopos de orofaringe y nasofaringe de personas con síntomas de una infección respiratoria.

La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) va seguida de la PCR en un vial de reacción. En el proceso, el ARN aislado se transcribe en ADNc con la ayuda de una transcriptasa inversa. Luego, los fragmentos de genes específicos para SARS-CoV-2 (gen E) se amplifican mediante PCR en tiempo real. Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis que están marcadas en un extremo con un inhibidor y con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polimerasa separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados.

El ensayo **RIDA® GENE SARS-CoV-2** contiene un Internal Control RNA (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras o cualquier posible inhibición de la PCR.

El kit **STAT NAT SARS COV 2 MICRO** se basa en pruebas RT-PCR y Sentinel STAT-NAT (STabilized Amplification Technology-Nucleic Acid Testing). Consta de una mezcla de reacción liofilizada optimizada (288 reacciones en total) que se dirige simultáneamente a varias regiones de los genes RdRp, N y E específicos del SARS-CoV-2.

El ensayo está diseñado para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

Proceso de extracción de ácidos nucleicos

El proceso de extracción y purificación, previo a la fase de amplificación, permite obtener ácido nucleico de alta pureza que puede o no contener la diana molecular (target), libre de otros compuestos y de enzimas de restricción. **1-3**

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 5 DE 5
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Para realizar este paso se han empleado los instrumentos QIAcube, QIAcube HT de QIAGEN y Auto-Pure 96 A de Allsheng.

El instrumento Qiacube se ha diseñado para aislar y purificar ácidos nucleicos de forma automatizada de alto rendimiento en formato de columnas giratorias de sílice. Los usuarios pueden, rápidamente y fácilmente, purificar ADN o ARN de casi cualquier tipo de muestra (incluyendo exudado nasofaríngeo).

Qiacube incluye una centrífuga, un agitador calentado, un sistema de pipeteo y una pinza robótica. Estos permiten que se automaticen completamente más de 80 kits de columna giratoria de QIAGEN.

Qiacube HT permite la extracción y purificación automatizada de ácidos nucleicos de alto rendimiento en formato de 96 pocillos usando también la tecnología de membrana de sílice, pero por el método bomba al vacío.

Auto-Pure 96 A de Allsheng es un dispositivo automatizado que emplea el método de perlas magnéticas y presenta una fase manual previa.

OPERACIONES PRELIMINARES

- Selección del protocolo correspondiente según el equipo de extracción empleado
- Organización de la superficie de trabajo de la CSB
- Rotular los viales con el código correspondiente, decantar las muestras en la CSB y diseñar el protocolo (Work Sheet) de trabajo de las muestras para su extracción.

PROCEDIMIENTO

Guía de manejo práctico para la extracción de ARN por equipo automatizado QIAcube empleando el QIAamp viral RNA Mini kit de QIAGEN (preparación de insumos y reactivos):

- Rehidratar el carrier ARN con 310 µL de solución buffer AVE, mantener en congelación (-20°C)
- Calcular la solución buffer AVL (Buffer Lysis) y Carrier en un tubo cónico de 15 mL de acuerdo a la cantidad de muestras.
- Distribuir 560 µL de la solución de lisis a los tubos colectores, agregar 140 µL de la muestra problema y homogenizar por pipeteo (2 veces)
- Preparar los buffers de lavado AW1 y AW2 diluyendo con etanol (96-100%) según la cantidad indicada en los frascos
- Colocar en el adaptador las columnas y los tubos de elución enumerando (1-12), luego abrir las tapas de las columnas y encajar en la posición del adaptador
- Encender el equipo de extracción y acceder al programa del equipo (QIAcube) QIAamp Viral RNA

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 6 DE 6
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Verificar que los frascos de soluciones de buffer, AVE, AW1, AW2 y etanol (96-100%), deben contener el volumen señalado y verificar que las puntas especiales (1000 µL) estén llenos en la porta puntas
- Ubicar las muestras en el orden establecido en la plataforma del equipo
- Ubicar los adaptadores con las columnas en el orden correlativo del rotor del equipo
- Al terminar el proceso retirar los adaptadores del equipo y las columnas que contiene la elusión de ARN
- El ARN extraído se almacena en el refrigerador de 2 a 8°C hasta continuar con la prueba molecular de PCR. En caso de no utilizar ese mismo día, se conserva de -20 a -70°C para conservar la estabilidad del ARN.

Guía de manejo práctico del extractor QIAcube.

Para iniciar un protocolo:

1. Encienda el QIAcube.
 - Se escuchará un sonido y aparecerá la pantalla de inicio.
 - El instrumento automáticamente realizará pruebas de inicialización.
2. Seleccione la aplicación del menú principal presionando “Cleanup”, “DNA”, “Protein”, “RNA” o “Virus”.
3. Seleccione el nombre del kit presionando “▲” o “▼” para desplazarse en la lista hasta que el nombre del kit correcto se sombree. Oprima “Select”.
4. Seleccione el tipo de muestra (este paso puede no ser solicitado por todos los protocolos), presione “▲” o “▼” para seleccionar en la lista el tipo de muestra. Presione “Select”.
5. Dependiendo del protocolo, puede haber más opciones disponibles. Seleccione el protocolo presionando “▲” o “▼” y presione “Select”.
6. Para iniciar una corrida de protocolo presione “Start” y proceda al paso 9. Para introducir valores definidos por el usuario presione “Edit”.
7. Presione “▲” o “▼” para seleccionar el parámetro que desea editar, por ejemplo, “Elution volumen” y presione “Select”.
8. Cambie el volumen de elución presionando “+” o “-“. El valor que está programado se muestra en el botón “Default”. Presione “Save” para guardar los cambios. El parámetro que se haya modificado se mostrará en rojo. Presione “Back” para salir del modo de edición.
9. El botón “Edit” nos indicará que el protocolo ha sido modificado. Si desea que los reportes se guarden automáticamente en una memoria USB, introduzca la memoria en el puerto USB. Presione “Start” para iniciar la corrida del protocolo.

Para iniciar una corrida:

1. Abra la puerta del QIAcube.
 2. Siga las instrucciones de la hoja del protocolo y las que se muestran en la pantalla táctil para colocar las muestras, reactivos y material de laboratorio.
- Se le indicará que:

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 7 DE 7
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Vacíe el cajón de desechos.

Coloque el rack de puntas en el área de trabajo.

Llene las botellas de reactivo y coloque el rack de las botellas de reactivos en el área de trabajo. Asegúrese de quitar las tapas de las botellas antes de colocarlas.

Cargue los tubos de buffer que se requieren en el protocolo en las posiciones A, B o C.

Coloque los adaptadores de rotor cargados en las canastillas de la centrífuga.

Cargue el rack del agitador con muestras y colóquelo en el agitador. Asegúrese de usar el adaptador del agitador correcto, como se describe en la hoja de protocolo.

3. Cierre la puerta del QIAcube.

Al término de la corrida

Cuando la corrida del protocolo ha terminado, un mensaje será desplegado en la pantalla táctil confirmando que las muestras han sido procesadas. Siga las instrucciones en la pantalla táctil para la limpieza del área de trabajo.

1. Retire de la microcentrífuga los tubos que contengan los ácidos nucleicos purificados de los adaptadores del rotor.
2. Deseche los tubos de las muestras, adaptadores de rotor y reactivos de acuerdo a las normas locales de seguridad.
3. Cambie las tapas de las botellas de reactivos y ciérrelas fuertemente. Guarde las botellas de acuerdo a las instrucciones del manual del equipo.
4. vacíe el cajón de desechos.
5. Corra otro protocolo, o apague el QIAcube.

Guía de preparación de soluciones y reactivos para extracción por QIAcube HT.

Para inactivación de la muestra:

- Añadir 1556 µL de AVE al frasco de Carrier (ARN de pequeño tamaño que es componente de algunos kits de purificación, el cual permite mejorar la eficiencia de recuperación del ARN de la muestra) de tapa roja. Homogenizar.
- Unir en un frasco, 470 µL del Carrier previamente preparado, más 15 mL de reactivo de lisis ACL.
- Dispensar en cada pocillo de la placa de muestras del extractor 160 µL de este reactivo (Carrier, AVE y ACL) + 200 µL de muestra. Homogenizar.
- Preparar los buffers de lavado AW1 y AW2 diluyendo con etanol (96-100%) según la cantidad indicada en los frascos
- Colocar la placa de muestras y los comederos con los reactivos en cada posición correspondiente, según el número de determinaciones a procesar.

Realizar la extracción de ácidos nucleicos según el protocolo del QIAcube HT.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 8 DE 8
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Guía de manejo práctico del extractor QIAcube HT.

- Encender la laptop accesoria al equipo
- Encender el equipo (verificar sonido de arranque)
- Seleccionar el ícono QIAcube HT y abrir el Software (Esperar confirmación del equipo por movimiento del brazo)
- Seleccionar protocolo en **QProtocols** (QIAamp® 96 Virus QIAcube® HT V1). **Clic** en Open
- Seleccionar el **ícono de luz UV** en el Software y configurar el tiempo de acción durante 15 minutos. Asegurarse de que el **sello rojo de seguridad esté colocado**
- **Clic** en Open Wizard y seleccionar el número de muestras a trabajar. **Clic** en **Jump to end**. **Clic** en finish
- Se muestra en la ventana las cantidades correspondientes de cada reactivo según el número de muestras codificadas
- EPP correspondientes: guantes nuevos, etc.
- Preparación de los reactivos no reutilizables: **proteínasa K y ACL mix**
- Situar los recipientes de los reactivos de extracción según la imagen mostrada en el software (verificar que no exista superposición)
- Sellar las columnas que no vayan a ser utilizadas y las que ya se utilizaron en reacciones previas, en la placa de muestras
- Colocar la placa con las muestras previamente dispensadas en la CSB en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Sellar las columnas que no se vayan a utilizar y las que fueron utilizadas en reacciones previas, de la placa de membranas
- Colocar la placa de membranas y sus accesorios en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Verificar la posición adecuada de la placa de membranas mediante un toque hacia la izquierda y abajo.
- Colocar la cantidad de puntas según el cálculo para el número de muestras a procesar (puede observarse en el ícono Generate Pre-run Report)
- Seleccionar en la imagen del Software en la región de las puntas la disponibilidad de las mismas:
- **Clic en:** Set selected tips to “Available” o “Unavailable”, cuando **NO** se vaya a utilizar la placa de puntas completa si no, las marcadas previamente
- **Clic en:** Set all tips on current plates to “Available” o “Unavailable”, cuando **SÍ** se vaya a utilizar la placa de puntas completa
- **Colores a tener en cuenta:** **Azul** (puntas nuevas); **Rojo** (puntas utilizadas); **Blanco** (No hay puntas en dicha columna de la placa)

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 9 DE 9
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Colocar la placa de elusión destapada en el lugar correspondiente según la imagen del Software
- Asegurarse de que el **sello rojo de seguridad** esté retirado
- Asegurarse de que el recipiente de desecho de las puntas esté colocado fuera del equipo
- Seleccionar ícono **Start** (triángulo verde) en el Software
- Completar verificación del procedimiento en **Chek list**
- **OK**
- Esperar culminación del proceso
- Guardar el proceso de extracción
- Taponear los viales de la placa de elusión que contiene el ácido nucleico extraído, guardarlo en refrigeración a 4°C – 8°C si no se va a utilizar inmediatamente; o trasladarlo a la sección de amplificación si la reacción de amplificación de realizará inmediatamente.
- Retirar todos los recipientes y accesorios del equipo
- Limpieza manual con gasas y agua destilada del equipo
- Limpieza automática: Seleccionar el **ícono Clean vaccum** (cubo). Añadir 20 ml de agua destilada en el (Waste Chamber) espacio donde se coloca la placa de membranas.
- Cerrar el equipo
- Revisar los requisitos que muestran en la ventana de diálogo. **Seleccionar casilla: Run UV cleaning operation before closing? ***Clic en NEXT.** Esperar sonido **Clic en Next nuevamente**

*** La configuración de la luz UV se puede realizar aparte mediante el ícono Ligth UV control (bombillo amarillo)

- Esperar culminación del proceso
- Cerrar el Software
- Apagar el equipo
- Apagar laptop
- El ícono **Bottle se debe revisar al culminar cada proceso para que muestre el nivel de líquido de desecho que contiene la botella de vacío**

Procedimiento para la extracción por Auto-Pure 96 A de Allsheng utilizando el kit CEA-NANO+RNA 3.0

- Dispensar los reactivos de extracción para Auto-Pure96 disponible en el kit CEA-NANO+RNA 3.0. en los bloques correspondientes: SLV-1- Solución de lavado 1 (500 µl), SLV-2- Solución de lavado 2 (500 µl), SLV-3- Solución de lavado 3 (500 µl)

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 10 DE 10
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

µl), SE-RNA 3.0- Solución de elución RNA 3.0 (50 µl), SLU-RNA 3.0- Solución de Lisis-Unión RNA 3.0 (200µl) y NESP-A380- Solución de NESP-A380 (100µl).

- Dispensar en la CSB la cantidad de muestra en los bloques preparados con los reactivos de lisis y la perla para Auto-Pure96, correspondientes para el proceso de extracción: - Auto-Pure96: DNA y RNA: 200 µl
- Dispensar la SP-RNA 3.0- Solución de precipitación RNA 3.0 (400 µl) en el bloque de la muestra
- Preparación del equipo de extracción seleccionado según el protocolo correspondiente disponible en la sección y/o en formato digital en la computadora del LBM
- Conservación del ácido nucleico extraído en el refrigerador correspondiente a 4°C – 8 °C
- Limpieza del área de trabajo y de los equipos.

Proceso de preparación de master mix

En este acápite se describe la preparación de la mezcla para las reacciones de RT-PCR con el empleo de los kits:

- RIDA®GENE SARS-CoV-2
- STAT NAT SARS COV 2 MICRO

Tener en cuenta en esta etapa que a los 15-20 µl de componentes de mezcla para la reacción (buffers, agua de BM, primers, control endógeno, enzimas Taq polimerasa, enzima reversotranscriptasa y oligonucleótidos) se les adiciona por cada reacción, 5-10 µl del material genético extraído.

OPERACIONES PRELIMINARES

- Confeccionar los protocolos de mezcla para el cálculo de los volúmenes empleados en Master Mix correspondiente.
- Utilizar los medios de protección personal o EPP específicos con los que cuenta la sección como sobrebata, gorro, guantes nuevos no reutilizables sin talco solo para uso en la sección Master Mix.
- Limpiar las superficies de trabajo, el Work Station, las pipetas y gradillas con solución ADN/ARN away o en su defecto alcohol al 90%; siempre con gasa estéril y no con algodón.
- Atemperar los reactivos con que dispone la Master Mix o las alícuotas a utilizar.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 11 DE 11
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Aplicar luz ultravioleta al Work Station antes de comenzar el trabajo y al finalizar.

PROCEDIMIENTO

- Disponer las gradillas con el número de viales de 0,2 ml o 0,1 ml correspondientes al número de muestras a procesar, dentro del Work Station.
- Reconstituir los reactivos liofilizados con buffers de reconstitución en caso de utilizar dichos kits (**STAT NAT SARS COV 2 MICRO de Sentinel**).
- Reconstituir los controles también.
- Preparación de la mezcla de la reacción de PCR según el protocolo del kit diagnóstico que se vaya a desarrollar para el número de muestras a analizar y para los controles de la reacción. Para ello dispensar los reactivos o componentes de la Master Mix en cada vial de reacción de PCR de mayor a menor volumen; siempre con pipetas graduadas limpias libres de DNA/RNAsas y utilizar puntas con filtro también libres de DNA/RNAsas; según la fórmula correspondiente que aparece en el insert del kit, hasta completar volumen de (15-20) µl por muestra.
- Nunca manipular ácido nucleico en esta sección
- Nunca transportar los viales con la mezcla para la reacción por fuera del laboratorio; deben situarse en la placa de cámara fría a través del transfer y trasladarlos hacia la sección de amplificación de ácidos nucleicos.

PROCESO DE AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

OPERACIONES PRELIMINARES

- Preparar la superficie de trabajo
- EPP: guantes nuevos
- Rotular los viales en correspondencia con los números y código de las muestras y controles

PROCEDIMIENTO

Equipo termociclador Rotor Gene Q:

- Añadir el ácido nucleico extraído de cada muestra y los controles al correspondiente vial con la mezcla de la reacción
- Preparar el equipo de amplificación: **Rotor-Gene Q: Encender laptop--- luego encender el Rotor Gene ---- por último, encender el Software.**
- Colocar el 36-Well Rotor de color rojo o el 72-Well Rotor de color azul (según el número de muestras a analizar) en el Rotor gene
- Configuración del protocolo diagnóstico que se desarrollará o selección de la plantilla del mismo si ya está configurado (ver más adelante Programación del termociclador)
- Codificación de las muestras en la corrida
- Interpretación de los resultados

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 12 DE 12
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- Retirar los viales de la reacción
- Cerrar Software --- Apagar el Rotor Gene --- Apagar laptop

Equipo termociclador SLAN-YGP:

- Encender el Equipo y después la Laptop.
- Abrir el Software (SLAN Real time PCR System 8.2.2)
- Abrir el botón Experiment Wizard.
- Se activa botón Setup y se completa con los siguientes datos:
 - Experiment name: Se completa con el día y la hora si no se completa por defecto.
 - Experiment Type: Qualitative Absolute
 - Seleccione los bloques a procesar. Bloque A- Bloque B
- Se activa el botón Plate:
 - Para seleccionar la placa completa (2 bloques) se para el cursor en el cuadro en blanco de la esquina superior izquierda.
 - Si se van a seleccionar casillas independientes mantener presionado el botón control y marcar el número de columnas según el número de muestras.
 - Para desmarcarse colocar el cursor en la posición A1.
 - En esta ventana se pueden editar las muestras: Control positivo, control negativo y numerar cada una de las muestras.
 - Hacia la izquierda están las columnas y hacia la derecha está la ventana de edición de muestras.
- La edición de las muestras también se puede realizar en la ventana que activa el botón Sample.
- Se inicia la corrida en el botón Run.
- Ante de presionar el botón Star, ir a la barra plegable que se encuentra en la esquina inferior derecha y seleccionar la opción Row, lo que activa los colores para cada muestra.
 - Luego se presiona el botón Star.

Para crear un protocolo nuevo:

- Activar Project / crear/ poner nombre del reactivo o determinación a utilizar.
- Seleccionar los canales
- Nombrar el gen o target a detectar en cada canal Ej. Gen E o Gen RdRp
- Ir a Program y programar el ciclaje. Guardar.

Programación del termociclador o ciclaje, lectura de canales e informe de resultados del ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 13 DE 13
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Pasos	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Hold	58°C	10 min	1*
Hold	95°C	1 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación***	60°C	30 seg	45

* Transcripción inversa

**activación de la ADN polimerasa

***adquisición de canales: Green (FAM) ---- Gen E

Yellow (JOE) ---- C. Interno

Lectura de canal.

- Gen E: Canal Green (excitación 470 nm, detección 510 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente FAM permite detectar SARS-CoV-2.
- Gen del Control interno: Canal Yellow (excitación 540 nm, detección 580 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente JOE permite detectar ADN humano (control interno).

Informe de resultados.

- **Muestra positiva:** Valor de $Ct \leq 35$ y curva de amplificación con morfología sigmoidal característica, se reportará como SARS-CoV-2 (Gen E).
- **Muestras negativas:** Valor de $Ct > 35$ o no amplificación detectada (Gen E) y un Ct del Control interno menor o igual a 35 y con curva de amplificación sigmoidal característica.
- Aquellas muestras que tengan valor del Control interno mayor a 35 o no detectable se deberá volver a realizar el proceso de extracción y RT-PCR; si la muestra aun así no presenta curva de amplificación en ningún canal, esta deberá ser rechazada como muestra insuficiente y poner en observaciones: muestra no cuenta con la cantidad de células necesarias en la reacción de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, se recomienda una nueva toma de muestra.
- El analista registra los datos en el protocolo de corrida, anotando en el canal de lectura correspondiente los valores de Ct de los controles internos y de las muestras que resultaron confirmadas.
- Este registro es revisado por el profesional responsable de la sección. Se entrega al analista para el ingreso en el sistema informático.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 14 DE 14
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Programación del termociclador o ciclaje, lectura de canales e informe de resultados del ensayo STAT NAT SARS-COV-2 MICRO de Sentinel.

Pasos	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Hold	50°C	10 min	1*
Hold	95°C	2 min	1**
Desnaturalización	95°C	15 seg	10
Hibridación	58°C	30 seg	
Desnaturalización	95°C	15 seg	35
Hibridación***	58°C	30 seg	

* Transcripción inversa

**activación de la ADN polimerasa

***adquisición de canales: Green (FAM) ---- N

Yellow (HEX/VIC) ----Gen RdRp

Orange (Texas) ----Gen E

Red (Cy5) ----C. Interno

Lectura de canal.

- Gen N: Canal Green (excitación 470 nm, detección 510 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente FAM permite detectar SARS-CoV-2.
- Gen RdRp: Canal Yellow (excitación 533 nm, detección 580 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente HEX/VIC permite detectar el gen RdRp que codifica para la RdRp.
- Gen E: Canal Orange (excitación 585 nm, detección 610 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente TEXAS permite detectar el gen E que codifica para la proteína E de la envoltura viral.
- Gen del Control interno: Canal Red (excitación 610 nm, detección 670 nm): dado que la sonda es marcada con el fluorescente Cy5 permite detectar ADN humano (control interno)

Informe de resultados.

- **Muestra positiva:** Valor de $Ct \leq 33$ y curva de amplificación con morfología sigmoidal característica, se reportará como SARS-CoV-2 (Gen N, RdRp o E).
- **Muestras negativas:** Valor de $Ct > 33$ o no amplificación detectada (Gen N, RdRp o E) y un Ct del Control interno menor o igual a 30 y con curva de amplificación sigmoidal característica.
- Aquellas muestras que tengan valor del Control interno mayor a 30 o no detectable se deberá volver a realizar el proceso de extracción y RT-PCR; si la muestra aun así no presenta curva de amplificación en ningún canal, esta
- deberá ser rechazada como muestra insuficiente y poner en observaciones: muestra no cuenta con la cantidad de células necesarias en la reacción de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, se recomienda una nueva toma de muestra.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 15 DE 15
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

- El analista registra los datos en el protocolo de corrida, anotando en el canal de lectura correspondiente los valores de Ct de los controles internos y de las muestras que resultaron confirmadas.
- Este registro es revisado por el profesional responsable de la sección. Se entrega al analista para el ingreso en el sistema informático.

REGISTRO DE DATOS

El proceso de extracción de las muestras de exudado nasofaríngeo se inscribe en registros Work Sheet manuscritos y electrónicos.

Se dispone de los protocolos de corridas donde se plasman los resultados.

La entrada de las muestras de exudado nasofaríngeo y la emisión de sus resultados se inscribe en registros electrónicos o bases de datos.

REFERENCIAS

- Laboratory Biosafety Guidance Related to the Novel Coronavirus (2019-nCoV)- Interim Guidance. 2020. Available online: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)\(accessed](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)(accessed) on 8 June 2020)
- Protocolos de los kits de Master Mix proporcionados por las diferentes casas comerciales (Sentinell, RIDA, etc).
- QIAcube® HT User Manual. June 2013
- QIAamp® 96 Virus QIAcube® HT Handbook. February 2015
- Rotor-Gene® Q User Manual. Versión 2. February 2012

Work Sheet para extracción. QIAcube Modelo LBM 01.

Equipo:			
Fecha:			
Reactivo:			
Lote:			
Nro Corrida:			
	Código de la muestra		Código de la muestra
1		7	
2		8	
3		9	
4		10	
5		11	
6		12	

Work Sheet para extracción. QIAcube HT/Auto-Pure 96. Modelo LBM 02.

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN: 1 ^{ERA} JULIO 2020
		PÁGINA 16 DE 16
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Equipo:					Fecha:							
Reactivo:					Lote:							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo de solución buffer AVL (Buffer lisis) y Carrier para extracción por QIAcube.

Nro. de muestras	Buffer AVL (ml)	Carrier ARN y AVE (µL)
1	0,56	5,6
2	1,12	11,2
3	1,68	16,8
4	2,24	22,4
5	2,80	28,0
6	3,36	33,6
7	3,92	39,2
8	4,48	44,8
9	5,04	50,4
10	5,60	56,0
11	6,16	61,6
12	6,72	67,2

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 17 DE 17
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Registro de protocolo de preparación de mezcla para el cálculo de los volúmenes empleados en Master Mix (RIDA GENE SARS CoV 2)

SARS CoV 2	RIDA GENE SARS CoV 2		
Fecha:	Corrida Nro:		
Master-Mix Componentes	Volumen por reacción	# Muestras	Unidades
		X	
Reaction Mix	19,3	19,3*X	µl
Taq- Polymerase	0,7	0,7*X	µl
Internal Control	1	X	µl
TOTAL	21	21*X	µl

CÁLCULO	
Muestras	
C. Positivo	1
NTC	1
C Interno	1
M Extra	1
TOTAL	X

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN:1 ^{ERA} JULIO2020
		PÁGINA 18 DE 18
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Registro de protocolo de preparación de mezcla para el cálculo de los volúmenes empleados en Master Mix (STAT-NAT SARS-COV-2 MICRO)

SARS CoV 2	STAT-NAT SARS-COV-2 MICRO		
Fecha:	Corrida Nro:		
Master Mix Componentes	#		
	Volumen	Muestras	Unidades
	por reacción		
		X	
Stat-Nat Master mix*	15	15*X	µl
TOTAL	15	15*X	µl

CÁLCULO

Muestras

C. Positivo 1

NTC 1

M Extra 1

TOTAL X

Protocolo de corrida para 72 muestras por Rotor Gene Q.

Nro Corrida:											
Fecha:											
No	Código	Green	Yellow	Orange	Red	No	Código	Green	Yellow	Orange	Red
1						36					
2						37					
3						38					
4						39					
5						40					
6						41					
7						42					
8						43					
9						44					
10						45					
11						46					
12						47					
13						48					
14						50					
15						51					
16						52					

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN: 1 ^{ERA} JULIO 2020
		PÁGINA 19 DE 19
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

17						53					
18						54					
19						55					
20						56					
21						57					
22						58					
23						59					
24						60					
25						61					
26						62					
27						63					
28						64					
29						65					
30						66					
31						67					
32						69					
33						70					
34						C. Positivo					
35						C. Negativo					

Protocolo de corrida para 96 muestras por Rotor Gene Q y SLAN-YGP.

Nro Corrida:											
Fecha:											
No	Código	Green	Yellow	Orange	Red	No	Código	Green	Yellow	Orange	Red
1						49					
2						50					
3						51					
4						52					
5						53					
6						54					
7						55					
8						56					
9						57					
10						58					
11						59					
12						60					
13						61					
14						62					
15						63					
16						64					



Procedimiento N.º 3

CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01

EDICIÓN: 1^{ERA} JULIO 2020

PÁGINA 20 DE 20

DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)

17						65					
18						66					
19						67					
20						68					
21						69					
22						70					
23						71					
24						72					
25						73					
26						74					
27						75					
28						76					
29						77					
30						78					
31						79					
32						80					
33						81					
34						82					
35						83					
36						84					
37						85					
38						86					
39						87					
40						88					
41						89					
42						90					
43						91					
44						92					
45						93					
46						94					
47						C. Positivo					
48						C. Negativo					

	Procedimiento N.º 3	CÓDIGO: PNO-LBM 01- 01
		EDICIÓN: 1 ^{ERA} JULIO 2020
		PÁGINA 21 DE 21
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 (UTILIZANDO KITS COMERCIALES DE RIDA GENE Y SENTINEL)		

Registro electrónico de entrada y salida (base de datos de Excel) de muestras de exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de SARS CoV 2.

Código	Nombre y Apellidos	Edad	Sexo	Carnet de identidad	Dirección	Área de salud	Municipio	Provincia

Condición	País de procedencia	F. I. síntomas	F. toma de muestra	Tipo de muestra	Procedencia	Resultado	Ct	Fecha de resultado

HISTORIAL DEL PROCEDIMIENTO

Se debe utilizar la última versión de este PNO, el cual coincidirá con la fecha más reciente de revisión.

	Nombres y apellidos	Cargo	Firma	Fecha	Cuño
Elaborado por:	María de Lourdes Sánchez Alvarez	J LBM del CPHEM			
	Dr. Edenis García Alvarez	Médico especialista			
Revisado por:	Lic. Hilda D. Roque de Escobar Martín MSc.	Resp. Normalización		1/03/2022	
Aprobado por:	Dr. Neil Reyes Miranda	Director			

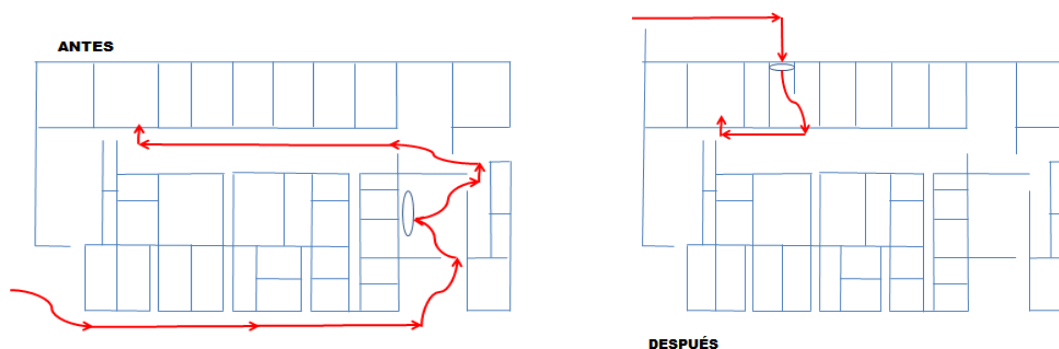
Anexo 5 Diagrama de recorrido en la recepción de las muestras clínicas para el diagnóstico de SARS-CoV-2

El diagrama de recorrido, llamado también de hilo o de espagueti, es una forma gráfica y sencilla de expresar las modificaciones resultantes de una reorganización de la secuencia que debe recorrer una muestra en un laboratorio.

Para ello es necesario un esquema o croquis del área del laboratorio con la disposición del equipamiento en cada sección.

Si el resultado es un recorrido más racional y libre de riesgos potenciales de contaminación, rotura, confusión o pérdida de la misma, se traza la secuencia en la situación anterior y se compara con la propuesta o situación actual, se recomienda que la comparación se efectúe como aval al resultado de una reorganización en un espacio físico dado.

Diagrama de hilo y espaguetis:



Anexo 6. Modelo de envío de muestras clínicas para el control de calidad del diagnóstico de SARS-CoV-2

[illegible]

Anexo 7. Modelo de recogida de datos sobre casos confirmados en el LBM-VC.

Código. _____ **Fecha confirmado:** ____/____/____

Datos Generales

Edad. _____ **Sexo.** _____

Presencia de síntomas.

Sí____ No____

Cuáles.

Fiebre____ Tos____ Rinorrea____ Odinofagia____ Malestar general____ Cefalea____
Disnea____ Anorexia____ Náuseas____ Vómitos____ Pérdida del gusto y el olfato____
Diarreas____

Comorbilidades.

Sí____ No____

Cuáles.

Asma bronquial____ Hipertensión arterial____ Diabetes mellitus____ Cardiopatía____
Insuficiencia cardíaca____ Obesidad____ Enfermedad pulmonar obstructiva
crónica____ Alcoholismo____ Tabaquismo____ Neoplasia____ Insuficiencia renal
crónica____

Clasificación clínica.

Leve____ Moderado____ Grave____ Crítico____

Fallecidos.

Sí____ No____

Municipio. _____

Plataforma de extracción.

QIAcube de 12____

QIAcube HT____

Auto Pure 96 A____

Plataforma de amplificación.

Rotor Gene Q____

SLAN YGP____

Anexo 8. Modelo de recogida de datos sobre muestras secuenciadas en LNR-IVR-IPK.

Código. _____ **Fecha:** ____/____/____

Clasificación clínica.

Leve____ Moderado____ Grave____ Crítico____

Fallecidos.

Sí____ No____

Valor de Ciclo umbral. _____

Variante genética.

- Variante D614G_____
- Variante británica, Alpha, B.1.1.7_____
- Variante sudafricana, Beta, B.1.351_____
- Variante india Delta, B.1.627_____
- Variante botsuana Ómicron B.1.1.529 y subvariantes (BA.2, BA.5, BQ.1, XBB.1, XBB.1.15, XBB.1.16, JN1)_____
- Otras variantes_____

Mutaciones con efectos biológicos potenciales.

D614G____ N501Y____ P681H____ E484K____ L452R____ T478K____
K417N____ N440K____.

Anexo 9. Secuencias genómicas de SARS-CoV-2 de Villa Clara disponibles GISAID.

EPI_ISL_19507725, EPI_ISL_19266839, EPI_ISL_18989904, EPI_ISL_18759956, EPI_ISL_18759952, EPI_ISL_18759951, EPI_ISL_18759950, EPI_ISL_18759949, EPI_ISL_18759941, EPI_ISL_18759940, EPI_ISL_18759938, EPI_ISL_18759937, EPI_ISL_18759926, EPI_ISL_18759899, EPI_ISL_18759898, EPI_ISL_18759897, EPI_ISL_18759896, EPI_ISL_18759889, EPI_ISL_18759888, EPI_ISL_18759887, EPI_ISL_18759885, EPI_ISL_18759884, EPI_ISL_16705716, EPI_ISL_16705715, EPI_ISL_16705714, EPI_ISL_16705680, EPI_ISL_14926007, EPI_ISL_14926006, EPI_ISL_14926005, EPI_ISL_14925957, EPI_ISL_14925956, EPI_ISL_14925955, EPI_ISL_14925954, EPI_ISL_14925870, EPI_ISL_13145681, EPI_ISL_13145655, EPI_ISL_13145654, EPI_ISL_13145653, EPI_ISL_13145652, EPI_ISL_13145630, EPI_ISL_13145612, EPI_ISL_13145611, EPI_ISL_13145610, EPI_ISL_13145609, EPI_ISL_13145608, EPI_ISL_13145607, EPI_ISL_13145606, EPI_ISL_13145605, EPI_ISL_13145604, EPI_ISL_13145603, EPI_ISL_13145229, EPI_ISL_13145217, EPI_ISL_13145124, EPI_ISL_13145123, EPI_ISL_13145122, EPI_ISL_13145121, EPI_ISL_13145120, EPI_ISL_13145119, EPI_ISL_9034551, EPI_ISL_7883668, EPI_ISL_4396816, EPI_ISL_4396797, EPI_ISL_4396796, EPI_ISL_4396785, EPI_ISL_4396794, EPI_ISL_4396793, EPI_ISL_4296211, EPI_ISL_4296210, EPI_ISL_4296209, EPI_ISL_4296208, EPI_ISL_4296207, EPI_ISL_4296206, EPI_ISL_4250386, EPI_ISL_4259385, EPI_ISL_4259384, EPI_ISL_4259383, EPI_ISL_4259382, EPI_ISL_4259381, EPI_ISL_4259380, EPI_ISL_4259379, EPI_ISL_1965249, EPI_ISL_1965245, EPI_ISL_1965244, EPI_ISL_1965243, EPI_ISL_1965242, EPI_ISL_1965241, EPI_ISL_1893469, EPI_ISL_1893366, EPI_ISL_402124.

EPI_ISL_19507725, EPI_ISL_19266839, EPI_ISL_18989904, EPI_ISL_18759956, EPI_ISL_18759952, EPI_ISL_18759951, EPI_ISL_18759950, EPI_ISL_18759949, EPI_ISL_18759941, EPI_ISL_18759940, EPI_ISL_18759938, EPI_ISL_18759937, EPI_ISL_18759926, EPI_ISL_18759899, EPI_ISL_18759898, EPI_ISL_18759897, EPI_ISL_18759896, EPI_ISL_18759889, EPI_ISL_18759888, EPI_ISL_18759887, EPI_ISL_18759885, EPI_ISL_18759884, EPI_ISL_16705716, EPI_ISL_16705715, EPI_ISL_16705714, EPI_ISL_16705680, EPI_ISL_14926007, EPI_ISL_14926006, EPI_ISL_14926005, EPI_ISL_14925957, EPI_ISL_14925956, EPI_ISL_14925955, EPI_ISL_14925954, EPI_ISL_14925870, EPI_ISL_13145681, EPI_ISL_13145655, EPI_ISL_13145654, EPI_ISL_13145653, EPI_ISL_13145652, EPI_ISL_13145630, EPI_ISL_13145612, EPI_ISL_13145611, EPI_ISL_13145610, EPI_ISL_13145609, EPI_ISL_13145608,

EPI_ISL_13145607, EPI_ISL_13145606, EPI_ISL_13145605, EPI_ISL_13145604, EPI_ISL_13145603, EPI_ISL_13145229, EPI_ISL_13145217, EPI_ISL_13145124, EPI_ISL_13145123, EPI_ISL_13145122, EPI_ISL_13145121, EPI_ISL_13145120, EPI_ISL_13145119, EPI_ISL_9034551, EPI_ISL_7883668, EPI_ISL_4396816, EPI_ISL_4396797, EPI_ISL_4396796, EPI_ISL_4396785, EPI_ISL_4396794, EPI_ISL_4396793, EPI_ISL_4296211, EPI_ISL_4296210, EPI_ISL_4296209, EPI_ISL_4296208, EPI_ISL_4296207, EPI_ISL_4296206, EPI_ISL_4250386, EPI_ISL_4259385, EPI_ISL_4259384, EPI_ISL_4259383, EPI_ISL_4259382, EPI_ISL_4259381, EPI_ISL_4259380, EPI_ISL_4259379, EPI_ISL_1965249, EPI_ISL_1965245, EPI_ISL_1965244, EPI_ISL_1965243, EPI_ISL_1965242, EPI_ISL_1965241, EPI_ISL_1893469, EPI_ISL_1893366, EPI_ISL_402124.

Anexo 10. Análisis de conglomerados bietápicos en dos fases

	N	% de combinado	% del total
Clúster 1	30	28,3%	28,3%
2	49	46,2%	46,2%
3	27	25,5%	25,5%
Combinado	106	100,0%	100,0%
Total	106		100,0%

D614G

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster 1		3	100,0%	27	26,2%
2		0	0,0%	49	47,6%
3		0	0,0%	27	26,2%
Combinado		3	100,0%	103	100,0%

N501Y

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster 1		20	55,6%	10	14,3%
2		0	0,0%	49	70,0%
3		16	44,4%	11	15,7%
Combinado		36	100,0%	70	100,0%

P681H

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	29	69,0%	1	1,6%
	2	2	4,8%	47	73,4%
	3	11	26,2%	16	25,0%
	Combinado	42	100,0%	64	100,0%

E484K

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	23	23,2%	7	100,0%
	2	49	49,5%	0	0,0%
	3	27	27,3%	0	0,0%
	Combinado	99	100,0%	7	100,0%

L452R

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	29	37,2%	1	3,6%
	2	49	62,8%	0	0,0%
	3	0	0,0%	27	96,4%
	Combinado	78	100,0%	28	100,0%

T478K

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	29	78,4%	1	1,4%
	2	8	21,6%	41	59,4%
	3	0	0,0%	27	39,1%
	Combinado	37	100,0%	69	100,0%

K471N

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	23	23,2%	7	100,0%
	2	49	49,5%	0	0,0%
	3	27	27,3%	0	0,0%
	Combinado	99	100,0%	7	100,0%

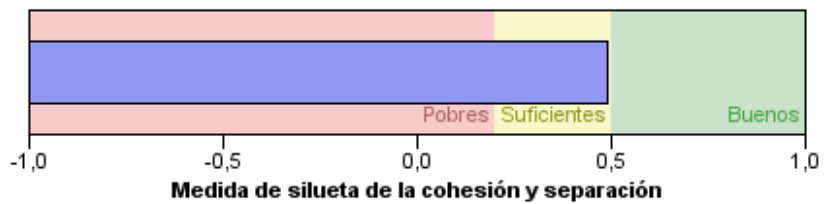
N440K

		0		1	
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Clúster	1	30	42,9%	0	0,0%
	2	20	28,6%	29	80,6%
	3	20	28,6%	7	19,4%
	Combinado	70	100,0%	36	100,0%

Resumen del modelo

Algoritmo	Dos fases
Entradas	11
Agrupaciones	3

Calidad de clústeres



Anexo 11. Aval del comité de ética de la institución



CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE EPIDEMIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA DE VILLA CLARA

Ministerio de Salud Pública

COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN DE CEI-CPHEMVC 01-22

Diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 en el enfrentamiento a la pandemia en
Villa Clara. Marzo 2020–mayo 2023

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dra. M.Sc. María de Lourdes Sánchez Álvarez

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto por los integrantes del Comité de Ética de la institución siguiendo las guías internacionales emitimos el siguiente

DICTAMEN

El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.

MsC. Hilda Roque de Escobar Martín
Presidente

MsC. Hugo Colado González
Miembro

MsC. Silvia Mildesteing Veldés
Vicepresidente

MsC. Yakelin Luna Carvajal
Miembro

MsC. Mireya Cepero Montalván
Secretaria

MsC. Maidelys Mendoza Acosta
Miembro

Anexo 12 Tablas y figuras

Plataformas utilizadas en la extracción de ácidos nucleicos de los casos confirmados por años

Plataforma de extracción	Años								Total	
	2020		2021		2022		2023			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
QIA cube	24	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	24	0,04
Auto Pure-32	40	7,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	40	0,07
QIA cube HT	294	53,26	1222	2,36	236	3,04	23	20,00	1775	2,95
Auto Pure-96	194	35,14	50488	97,64	7528	96,96	92	80,00	58302	96,94
Total	552	100	51710	100	7764	100	115	100	60141	100

Fuente: Registro de casos confirmados.

Plataformas utilizadas en la amplificación de los ácidos nucleicos de los casos confirmados 2020-2023

Plataformas de amplificación	Años								Total	
	2020		2021		2022		2023			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Rotor Gene Q	354	64,13	47712	92,27	7153	92,13	36	31,30	55255	91,88
QIAGEN	198	35,87	3998	7,73	611	7,87	79	68,70	4886	8,12
SLAN-YGP										
Total	552	100	51710	100	7764	100	115	100	60141	100

Fuente: Registro de casos confirmados.

Edad y sexo de casos confirmados de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara

Variables	Categorías	Número (N=60141)	%
Edad	<19 años	11367	18,90
	≥19 a 60 años	36803	61,19
	>60 años	11971	19,90
Sexo	Masculino	28299	47,05
	Femenino	31842	52,95

*Porcentaje calculado con relación a N

Síntomas descritos en casos confirmados de COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara

Síntomas	Número (N=60141)	%
Fiebre	31643	52,61
Tos	28493	47,38
Rinorrea	20166	33,53
Pérdida del gusto	8680	14,43
Malestar general	8413	13,99
Odinofagia	7859	13,07
Anorexia	7794	12,96
Pérdida de olfato	7610	12,65
Disnea	6085	10,12
Cefalea	5493	9,13
Nauseas	4570	7,60
Vómitos	986	1,64
Diarreas	853	1,42

*Porcentaje calculado con relación a N

Fuente: Registro de casos confirmados.

Comorbilidades en casos confirmados de la COVID-19 en el LBM-CPHEM de Villa Clara

Comorbilidades	Número (N=60141)	%
Hipertensión arterial	1484	2,47
Diabetes Mellitus	1414	2,35
Asma Bronquial	299	0,50
Cardiopatía isquémica	170	0,28
EPOC	52	0,09
Obesidad	50	0,08
Neoplasia	31	0,05
Insuficiencia cardiaca	23	0,04
Gestación	21	0,03
IRC	18	0,03
Tabaquismo	10	0,02
Alcoholismo	9	0,01

*Porcentaje calculado con relación a N

Fuente: Registro de casos confirmados.