



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA DIAGNOSTICO
DE VIRUS RESPIRATORIOS: RT-PCR EN TIEMPO REAL VS SISTEMA POCT DEL
HOSPITAL TEODORO MALDONADO CARBO DE GUAYAQUIL**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniero(a) Biotecnólogo(a)

AUTORES: MARIA AUXILIADORA ALCIVAR CASTILLO
ZEUS JAIR PACHECO ISSA

TUTOR: ING. MARIA ALEJANDRA DE LA CRUZ MORA, MSc.

Guayaquil-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, María Auxiliadora Alcivar Castillo con documento de identificación N° 0953787520 y Zeus Jair Pacheco Issa con documento de identificación N° 0952944551; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 22 de agosto del año 2023

Atentamente,



María Auxiliadora Alcívar Castillo
CI.0953787520



Zeus Jair Pacheco Issa
CI.0952944551

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, María Auxiliadora Alcivar Castillo con documento de identificación No. 0953787520 y Zeus Jair Pacheco Issa con documento de identificación No. 0952944551 expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Proyecto de Investigación: ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA DIAGNOSTICO DE VIRUS RESPIRATORIOS: RT PCR EN TIEMPO REAL VS SISTEMA POCT DEL HOSPITAL TEODORO MALDONADO CARBO DE GUAYAQUIL, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero (a) Biotecnólogo (a) en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 22 de agosto del año 2023

Atentamente,



María Auxiliadora Alcívar Castillo

CI.0953787520



Zeus Jair Pacheco Issa

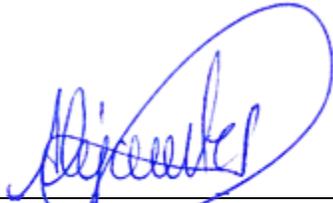
CI.0952944551

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, María Alejandra de la Cruz Mora con documento de identificación N° 1003233689, docente de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Guayaquil declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA DIAGNOSTICO DE VIRUS RESPIRATORIOS: RT PCR EN TIEMPO REAL VS SISTEMA POCT DEL HOSPITAL TEODORO MALDONADO CARBO DE GUAYAQUIL, realizado por María Auxiliadora Alcivar Castillo con documento de identificación N° 0953787520 y por Zeus Jair Pacheco Issa con documentode identificación N° 0952944551 , obteniendo como resultado final el trabajo detitulación bajo la opción Proyecto de Investigación-Institución Externa que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 22 de agosto del año 2023

Atentamente,



María Alejandra De La Cruz Mora
C I. 1003233689

Memorando Nro. IESS-HTMC-CGI-2023-0115-FDQ
Guayaquil, 28 de Abril de 2023

PARA: ZEUS JAIR PACHECO ISSA
ESTUDIANTE DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

MARIA AUXILIADORA ALCÍVAR CASTILLO
ESTUDIANTE DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

De mi consideración:

Por medio de la presente, informo a usted que ha sido resuelto factible su solicitud para que pueda realizar su trabajo de Tesis “**ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE VIRUS RESPIRATORIOS: RT-PCR EN TIEMPO REAL VS SISTEMA POCT DEL HOSPITAL TEODORO MALDONADO CARBO DE GUAYAQUIL**” una vez que por medio del memorando Nro. **IESS-HTMC-JUTGM-2023-0493-M** de fecha 27 de Abril del 2023, firmado por la Espc. Laura Lugo Nazareno – Jefe Unidad de Genética y Molecular, se remite el informe favorable a la misma.

Por lo antes expuesto reitero que puede realizar su trabajo de Tesis siguiendo las normas y reglamentos del hospital Teodoro Maldonado Carbo.

Atentamente,



ESP. JAVIER HUBERTO
CARRILLO UBIDIA

ESPC. JAVIER CARRILLO UBIDIA
COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN,
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES – TEODORO MALDONADO CARBO

Referencias:

- Solicitud

mm

Dedicatoria y agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades del Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su Institución. De forma especial a la Dr. Laura Lugo jefe de la Unidad Técnica de Genética y Molecular por el acceso a materiales, equipos y reactivos para la realización del estudio dentro de su área.

De igual manera agradecimientos a las autoridades y personal académico y administrativo de la Universidad Politécnica Salesiana de Guayaquil Campus María Auxiliadora en especial al Ing. José Luis Ballesteros Lara, PhD Director de la carrera de Biotecnología, e Ing. Jaime Alberto Naranjo Moran, MSc quienes siempre impulsaron a crecer cada día como profesional, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, tolerancia, apoyo académico y amistad.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento, a la Ing. María Alejandra de la Cruz Mora, MSc tutora de mi proyecto y principal colaboradora a la Lic. Brenda Patricia López Ulloa, MSc Cotutora, un agradecimiento especial a la Blga. Eunice Eleonora Ordoñez Enireb, MSc Tutora Externa quienes, durante todo este proceso, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración se logró el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a mis padres, abuelos y hermanos por todo su apoyo en todos los ámbitos que se necesitó para llevar a cabo este trabajo de investigación; a todos los que son y fueron docentes de la carrera de Biotecnología por brindar su aporte a nuestra formación profesional y académica; a todos los laboratoristas y doctores del Hospital que estuvieron con nosotros dándonos su apoyo para concluir este trabajo y expandiendo nuestro conocimiento de una manera tan enriquecedora.

Zeus Pacheco Issa

A mis padres, por su inquebrantable apoyo y amor, por enseñarme a enfrentar desafíos con determinación. Sin ustedes, este logro no habría sido posible; Agradezco cada sacrificio y cada consejo. Siempre en deuda con su infinita paciencia y fe en mí. A todo el equipo de laboratoristas del Hospital por su invaluable apoyo técnico, paciencia y destrezas compartidas, que han sido esenciales en cada paso de este proceso investigativo que se reflejan en cada página de esta tesis.

Maria Auxiliadora Alcivar

Resumen

En la costa ecuatoriana, los virus respiratorios provocan alrededor de 20.000 casos al año, si bien los Rhinovirus son los más prevalentes, también hay notables incidencias de otros patógenos, como la Influenza A y B, virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2. A nivel mundial, estos son una de las principales causas de enfermedades del sistema respiratorio; para proteger la salud pública y prevenir impactos negativos en la comunidad, es crucial comprender cómo se propagan estos virus, así como las medidas preventivas y su modo de transmisión.

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la RT-qPCR y el sistema POCT, han transformado la medicina y la investigación, brindando precisión y rapidez en la detección de patógenos y mutaciones genéticas, ambos métodos fundamentados en la PCR, permiten una identificación y gestión eficaz de casos virales en contextos clínicos y epidemiológicos. Entre abril y junio de 2023, en el Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo, se analizaron muestras nasofaríngeas de 60 pacientes, buscando la presencia de agentes infecciosos como la Influenza A y B, Virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2.

De los 60 pacientes analizados, los resultados para Influenza B y SARS-CoV-2 coincidieron en ambas pruebas, con un 13,33% y 1,67% de positividad, respectivamente para Influenza A, la RT-PCR reportó un 10% de positividad, mientras que el sistema POCT indicó un 16,67%, en relación con el VRS, la RT-PCR reveló un 20% de casos positivos, y el sistema POCT un 21,67%. La RT-PCR alcanzó una especificidad del 100%, y el sistema POCT del 85,7%. Dentro de nuestro estudio, la comparación de especificidad entre las pruebas fue esencial para determinar con precisión a aquellos individuos sanos, una elevada especificidad garantiza que los resultados negativos sean fiables y representen verdaderamente la no presencia de la enfermedad evaluada.

Palabras claves

Especificidad; sistema POCT; panel respiratorio; patógeno; reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract

On the Ecuadorian coast, respiratory viruses are around 20,000 cases per year, Rhinoviruses are the most prevalent, there are also notable incidences of other pathogens, such as SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B and Syncytial Virus. Globally, these are one of the main causes of respiratory system diseases; to protect public health and prevent negative impacts on the community, it is crucial to understand viruses dispersion, as well as preventive measures and transmission mode.

Molecular diagnostic techniques, such as RT-qPCR and the POCT system, have transformed medicine and research, providing accuracy and speed in the detection of pathogens and genetic mutations, both PCR-based methods that enable effective identification and management of viral cases in clinical and epidemiological settings. Between April and June 2023, at the Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo, nasopharyngeal samples from 60 patients were analyzed for the presence of infectious agents, Influenza A and B, Respiratory Syncytial Virus and SARS-COV-2.

Of the 60 patients analyzed, the results for SARS-CoV-2 and Influenza B coincided in both tests, with 13.33% and 1.67% positivity, respectively. For Influenza A, RT-PCR reported 10% positivity, while the POCT system indicated 16.67%; for RSV, RT-PCR revealed 20% of positive cases, and the POCT system 21.67%. RT-PCR achieved a specificity of 100%, and the POCT system 85.7%. Within our study, the comparison of specificity between tests was essential to accurately determine healthy individuals; high specificity ensures that negative results are reliable and truly represent the non-presence of the disease being evaluated.

Key words

Specificity; POCT system; respiratory panel; pathogen; polymerase chain reaction.

ÍNDICE

Capítulo 1 Conceptualización	14
1.1 Introducción	14
1.2 Planteamiento del problema	15
1.3 Justificación y delimitación.....	16
1.4 Objetivos	17
1.4.1 General.....	17
1.4.2 Específicos	17
1.5 Hipótesis o Supuestos.....	17
Capítulo 2 Fundamentación Teórica.....	18
2.1 Enfermedades Respiratorias.....	18
2.1.1 Epidemiología.....	20
2.1.2 Patogenia.....	21
2.1.3 SARS-CoV-2	22
2.1.4 Influenza	24
2.1.5 Virus Respiratorio Sincitial.....	26
2.2 Técnicas de diagnóstico molecular	27
2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	28
2.2.2 PCR en tiempo real	29
2.2.3 Equipo de extracción automatizado de ácidos nucleicos	30
2.2.4 RT-qPCR.....	32
2.3 Sistema Automatizado POCT	33
2.3.1 Generalidades del cartucho	34
2.3.2 Aplicaciones en el área de diagnóstico molecular	35
2.3.3 Interpretación de los resultados	36
2.3.4 Microorganismos detectados	39
Capítulo 3 Materiales y métodos	40
3.1 Población muestral	40
3.2 Recepción y Transporte de muestra	40
3.3 Manejo de la prueba POCT	41
3.4 Manejo de la prueba RT-qPCR	44

3.5	Selección y registro de datos	48
3.6	Variables de investigación	48
3.7	Tratamiento de datos	50
3.8	Parámetros para determinar especificidad.....	50
3.9	Análisis estadístico.....	51
Capítulo 4	Resultados y discusión	52
4.1	Análisis de datos.....	52
4.2	Resultados obtenidos por prueba.....	53
4.3	Análisis univariado evaluación detallada de las muestras individuales recopiladas por prueba.....	60
4.4	Análisis comparativo de los resultados de las pruebas PCR y POCT.....	63
4.5	Especificidad de las pruebas	64
5.	Conclusiones y recomendaciones	68
6.	Bibliografía	70
7.	Apéndice/Anexos.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Virión de Coronavirus SARS-CoV-2.....	23
Figura 2 Tipos de virus de influenza (A y B).	24
Figura 3 Virión de Influenza A.....	25
Figura 4 Virión Influenza B.....	26
Figura 5 Virión Virus Sincitial Respiratorio.....	26
Figura 6 Etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa. Proceso en el cual la cadena de ADN pasa por distintas etapas de la PCR. Desnaturalización, alineamiento y elongación.	28
Figura 7 Equipo de Extracción de material genético Maelstrom 9610.....	30
Figura 8 Sistema automatizado POCT, BioFireFilm Array Torch.....	33
Figura 9 Esquema ilustrativo sobre las partes del cartucho del Equipo.	34
Figura 10 Preparación, hidratación del cartucho y carga de la muestra.	35
Figura 11 Resultados obtenidos para el virus de Influenza A, sus variantes y la interpretación correspondiente.	37
Figura 12 Dianas génicas para las pruebas de SARS-Cov-2 en el sistema POCT.	37
Figura 13 Informe de la prueba BioFire RP2.1plus.....	38
Figura 14 Diagrama de procesamiento del sistema POCT.....	43
Figura 15 Kit de detección SARS-CoV-2 para la RT-qPCR.....	44
Figura 16 Distribución de la Placa de 96 pocillos, hileras de 6 pocillos y sus variantes.....	46
Figura 17 Placa de 96 pocillos para PCR HardShell.	48
Figura 18 Diagrama de barras de resultados porcentuales de ambas pruebas.	57
Figura 19 Diagrama de barras de resultados porcentuales del Sistema POCT.....	57
Figura 20 Diagrama de barras de resultados porcentuales de RT-qPCR.....	58
Figura 21 Diagrama de pastel de resultados de detección porcentuales del Sistema POCT.	59
Figura 22 Diagrama de pastel de resultados de detección porcentuales de RT-qPCR.	59
Figura 23 Distribución de edades de individuos por intervalos.....	61
Figura 24 Proporción de casos positivos para cada virus en cada prueba.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Enfermedades infecciosas y sus características.	18
Tabla 2 Descripción del Equipo Maelstrom 9610.	31
Tabla 3 Almacenamiento de la muestra e indicaciones para su procesamiento.	43
Tabla 4 Descripción de materiales del equipo Maelstrom 9160.....	45
Tabla 5 Variables de la matriz de recopilación de datos.	49
Tabla 6 Variables sometidas a estudio.....	49
Tabla 7 Matriz de recolección de datos para el estudio.	50
Tabla 8 Especificidad, variables que maneja y su fórmula.....	51
Tabla 9 Resultados cualitativos de pruebas sometidas a estudio.....	52
Tabla 10 Frecuencia donde se detectó cada virus en la prueba de RT-qPCR.....	53
Tabla 11 Porcentaje de casos en los que se detectó cada virus en la prueba RT-qPCR.	54
Tabla 12 Frecuencia de casos donde se detectó cada virus en el sistema POCT.....	54
Tabla 13 Porcentajes de casos en los que se detectó cada virus en el sistema POCT.	55
Tabla 14 Porcentajes de resultados del Sistema POCT y RT-qPCR.	55
Tabla 15 Distribución de detectados por sexo.	60
Tabla 16 Distribución de Edades por prueba.....	62
Tabla 17 Especificidad RT-qPCR.....	65
Tabla 18 Especificidad sistema POCT.	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Recepción y manejo de muestras de hisopados nasofaríngeos.	77
Anexo 2 Sistema POCT equipo para diagnóstico molecular.	78
Anexo 3 Procesamiento del Sistema POCT.	79
Anexo 4 Lectura y análisis del cartucho del Sistema POCT.	80
Anexo 5 Pre-PCR, materiales y equipos de extracción de ARN purificado.	81
Anexo 6 RT-qPCR, materiales y equipos para detección de amplicones.	84
Anexo 7 Configuración predeterminada para el equipo de PCR.	86
Anexo 8 Cálculo de la especificidad para cada prueba.	87

Capítulo 1 Conceptualización

1.1 Introducción

Las enfermedades respiratorias pueden ser causadas por factores ambientales, como la contaminación del aire, infecciones virales o bacterianas, las más comunes incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, la neumonía y la tuberculosis; estas patologías son causadas por agentes virales, estos microorganismos son causantes de la gripe entre los cuales se encuentran el virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus, rinovirus y coronavirus, que causan inflamación en los pulmones lo que puede hacer que estos se llenen de líquido esto dificulta la respiración reduciendo la cantidad de oxígeno que llega al cuerpo, por otro lado en algunos casos graves, es necesaria la hospitalización para recibir el tratamiento más adecuado, ya que los virus respiratorios son una de las principales causas de afecciones respiratorias en todo el mundo, comprender el modo de infección de estos virus, sus técnicas de prevención y su propagación es fundamental para mantener la salud pública y prevenir complicaciones graves en la población (OPS, 2021).

A partir de la pandemia por SARS CoV-2 los virus respiratorios se han convertido en uno de los temas de investigación más importantes, siendo necesario potencializar los métodos de diagnóstico, según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades respiratorias son una de las principales causas de muerte a nivel mundial, y se estima que en 2019 murieron alrededor de 3,9 millones de personas. (OMS, 2019). En el 2022, Ecuador presenta un alto número de casos de infección respiratoria grave (IRS) causada por el virus de la influenza, SARS CoV-2 y VRS, las condiciones climáticas durante el comienzo del periodo de lluvias a finales del 2022 ayudaron al incremento en la tasa de infección (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2022).

El virus respiratorio sincitial (VRS) es la principal causa de infecciones en las vías respiratorias bajas (LRTI) en niños menores de un año, en Estados Unidos, cada año se registran entre 132,000 y 172,000 hospitalizaciones en niños menores de 5 años debido a esta infección, y la cifra está en ascenso, la mayoría de estas hospitalizaciones ocurren en niños que superan los seis meses de edad; a nivel global, esta enfermedad es preocupante se estima que el VRS provoca aproximadamente 34 millones de casos graves de afección pulmonar en niños, llevando a unos 3,4 millones de

hospitalizaciones anuales (Ballmann, 2021). La incidencia de influenza se ha mantenido baja; recientemente, la incidencia de influenza ha disminuido, con una mayor prevalencia de la influenza A sobre la B. Mientras que la actividad del virus sincitial respiratorio (VSR) se mantiene baja, los casos de SARS-CoV-2 han crecido, situándose en un nivel moderado. Además, ha surgido un aumento sutil en los diagnósticos de enfermedad tipo influenza (ETI) e infección respiratoria aguda grave (IRAG), siendo la mayoría vinculados al SARS-CoV-2 y en proporciones menores a la influenza (OPS, 2023).

Según la Organización Panamericana de la Salud, (2019) estas enfermedades ocasionaron 534,242 de decesos de ambos sexos, 267,516 (50%) de decesos en hombres y 266,725 (50%) de decesos en mujeres, estos virus pueden causar síntomas tenues y enfermedades de alto riesgo, llegando a ser difíciles de detectar, anteriormente, los métodos de diagnóstico se basaban en la detección de antígenos virales en muestras respiratorias, como la prueba rápida de antígenos o la prueba de inmunofluorescencia, por lo cual estas técnicas tenían una sensibilidad limitada y no podían distinguir entre diferentes tipos de virus. En base a lo anteriormente descrito, es fundamental realizar un diagnóstico oportuno y preciso para el tratamiento eficaz que permita atender apropiadamente al paciente y a la vez reducir la transmisión de la enfermedad de esta forma, se han diseñado diversos métodos de diagnóstico en laboratorio, los cuales van desde técnicas serológicas que pueden demorar semanas para obtener un resultado, hasta técnicas moleculares que tardan horas, es así como se resalta los beneficios de los avances biotecnológicos en el desarrollo de diferentes tipos de pruebas moleculares para detección del agente etiológico del COVID-19 y otros virus respiratorios sinérgicos (Farfán, 2015).

1.2 Planteamiento del problema

En los laboratorios hospitalarios de Guayaquil existe una alta demanda de pruebas precisas para la detección de virus respiratorios, útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades virales que afectan al sistema respiratorio; esto ha cambiado nuestra comprensión de la etiología y la clínica de las enfermedades respiratorias, por lo que es necesario disponer de alternativas fijas, efectivas y precisas que detecten los principales virus respiratorios sometidos a estudio, con enfoque en pacientes del Hospital de especialidades Teodoro Maldonado Carbo, en donde, existe

preocupación acerca de que el tratamiento asignado a los pacientes tenga una eficacia mínima, en donde la susceptibilidad del virus a un determinado medicamento puede variar, y es importante tener en cuenta factores como enfermedades adyacentes, la condición del paciente por ejemplo, si está programado para cirugía o se encuentra en (UCI) Unidad de Cuidados Intensivos además de inminente posibilidad de diversos efectos secundarios (Arandia-Guzmán & Antezana-Llaveta, 2020).

En los últimos años el desarrollo progresivo de métodos para identificar enfermedades respiratorias basados en amplificación de material genético los cuales son cada vez más comunes en los ensayos clínicos; el resultado se observa rápidamente para permitir que el paciente reciba el tratamiento biológico correcto y evitar tratamientos a largo plazo con fármacos que pueden ser inadecuados, la detección rápida del virus mediante tecnologías biotecnológicas como la RT-qPCR (PCR en tiempo real por retrotranscripción) y el sistema de pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia (Point Of Care Testing, POCT) es crucial en estos casos, por lo que estas tecnologías permiten una detección rápida y precisa del virus, lo que se convierte en un factor decisivo para brindar el tratamiento adecuado lo antes posible (Marimón, 2017).

1.3 Justificación y delimitación

En la costa del Ecuador existe una incidencia de virus respiratorios que causan aproximadamente 20.000 casos al año siendo los Rhinovirus los de mayor prevalencia, junto con otros virus como la Influenza A y B, virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2, entre los grupos demográficos más susceptibles al presentar complicaciones respiratorias están adultos mayores, niños y personas con un sistema inmune debilitado por una mala alimentación, cambios frecuentes de temperatura, exposición prolongada a contaminación o sufrir de afecciones que deterioren al sistema inmune, tal como la anemia (Miranda, et al., 2021).

La finalidad de esta investigación es comparar la especificidad de las metodologías RT-qPCR y POCT, las cuales permiten la detección molecular de los virus que serán sometidos a estudio mencionados anteriormente, en pacientes hospitalarios, en donde se evaluarán diversos parámetros como sexo y edad, la muestra y los resultados generados tanto positivos y negativos para la identificación de patógenos respiratorios, lo que conducirá al desarrollo de herramientas terapéuticas preventivas para evitar la propagación del virus y los patógenos vecinos con el fin de reducir o prevenir la gravedad de la enfermedad adquirida.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Comparar la especificidad de los resultados obtenidos de la técnica RT-qPCR con el sistema POCT para el diagnóstico molecular de virus que ocasionan problemas respiratorios en pacientes atendidos en el Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo.

1.4.2 Específicos

- Procesar las muestras de hisopados nasofaríngeos que se reciben en el Laboratorio de Genética y Molecular utilizando la Técnica RT-qPCR y Sistema POCT.
- Diseñar y recopilar en una matriz de datos los resultados positivos y negativos de cada prueba sometida a estudio.
- Analizar estadísticamente los resultados de los virus detectados de las pruebas RT-qPCR y Sistema POCT, mediante la comparación de los datos consolidados.

1.5 Hipótesis o Supuestos

- La RT-qPCR en tiempo real tiene mayor especificidad para la identificación de los virus asociados a las enfermedades respiratorias a comparación del sistema POCT.

Capítulo 2 Fundamentación Teórica

2.1 Enfermedades Respiratorias

Las enfermedades respiratorias abarcan una serie de patologías que impactan el sistema respiratorio, compuesto por los pulmones, las vías aéreas y otros órganos esenciales para la respiración, estas infecciones pueden variar desde condiciones leves y autolimitadas hasta enfermedades crónicas con el potencial de ser mortal, en donde la prevención y el tratamiento adecuados de las enfermedades respiratorias juegan un papel crucial en la disminución de la carga de enfermedad y en la mejora de la salud pública, es primordial la implementación de diversas estrategias, entre las cuales se destacan la vacunación contra la gripe y la neumonía, las cuales son medidas efectivas para prevenir las enfermedades respiratorias originadas por virus y bacterias, por lo que la promoción de entornos saludables y la reducción de la exposición a contaminantes del aire y otros agentes irritantes también desempeñan un papel central en esta lucha por mantener una población más sana (OPS, 2021).

Las enfermedades respiratorias se pueden clasificar de diferentes formas, dependiendo del cuadro clínico, como se detalla en la tabla 1:

Tabla 1 Enfermedades infecciosas y sus características.

<i>Enfermedades infecciosas:</i>	<i>Características:</i>
<i>Infecciones virales</i>	El resfriado común, la gripe, el SARS-CoV-2 (que ocasiona la COVID-19), entre otros.
<i>Infecciones bacterianas</i>	La neumonía bacteriana, la tuberculosis, la <i>Bordetella pertussis</i> (tos-ferina), la legionelosis, entre otras.
<i>Infecciones fúngicas</i>	Como aspergilosis, la histoplasmosis, la coccidioidomicosis, entre otras.

Fuente: (Merchán, Vera, & Villafuerte, 2021)

De acuerdo con la fisiología de la enfermedad se clasifican en:

Enfermedades de obstrucción respiratoria:

- Asma: Trastorno crónico que conduce a la inflamación y el estrechamiento de las vías aéreas, manifestándose en episodios de sibilancias, problemas respiratorios y una sensación de tensión en el pecho.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): Se trata de una enfermedad progresiva que implica una restricción en la circulación del aire en los pulmones, comúnmente asociada con el hábito de fumar o el contacto con irritantes ambientales (Merchán, Vera, & Villafuerte, 2021).

Enfermedades intersticiales:

- Fibrosis pulmonar idiopática: Enfermedad crónica y progresiva que involucra una cicatrización y engrosamiento del tejido pulmonar, dificultando la respiración.
- Neumonitis por hipersensibilidad: Inflamación pulmonar causada por la exposición repetida a ciertos alérgenos o sustancias irritantes (Johkoh, et al., 2001).

Las infecciones respiratorias a menudo afectan el tracto respiratorio superior, que es susceptible a la infección, entre los signos y síntomas más comunes están los resfriados, faringitis, amigdalitis, asma y otros, aunque los virus tienen barreras contra estas infecciones, son capaces de sobrevivir porque tienen mecanismos que les permiten evitar nuestro sistema inmunológico (Alarcón, Muñoz, Pascual, Pintos, & Ramos, 2018).

La enfermedad respiratoria aguda es una condición caracterizada por diversas infecciones del sistema respiratorio, las cuales pueden ser provocadas por una amplia gama de microorganismos, tanto virus como bacterias, esta problemática representa un importante desafío para la salud pública a nivel global, entre las causas destacadas de esta enfermedad se encuentra la infección del Virus Sincitial Respiratorio (VSR), que afecta principalmente a niños menores de dos años (Bernal & Castellanos, 2015).

En los niños, las infecciones respiratorias (RV) a menudo causan insuficiencia respiratoria aguda sin embargo varios estudios recientes han demostrado que las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a estas enfermedades se incrementan en adultos y ancianos que no están inmunocomprometidos ni padecen cardiopatías; las enfermedades respiratorias muestran variaciones sustanciales en su epidemiología y patogenia, de acuerdo con la enfermedad en cuestión, cada condición respiratoria específica presenta sus propias características en términos de propagación, factores de riesgo y mecanismos patogénicos (OPS, 2020).

2.1.1 Epidemiología

Según Gregg en (2008) en el libro “Field Epidemiology” se presentan aspectos generales sobre la epidemiología de las enfermedades respiratorias:

- **Transmisión:** Muchas enfermedades respiratorias se transmiten entre individuos a través de gotas respiratorias, aerosoles, contacto directo o indirecto con secreciones respiratorias infectadas, algunas enfermedades respiratorias, como el resfriado común y la gripe, tienen una alta transmisibilidad y pueden propagarse rápidamente en poblaciones susceptibles.
- **Agentes infecciosos:** Las enfermedades respiratorias pueden ser causadas por diversos agentes infecciosos, como virus, bacterias, hongos o parásitos, estos agentes pueden invadir las vías aéreas superiores o inferiores y desencadenar una respuesta inflamatoria en el organismo.
- **Estacionalidad:** Como la gripe, muestran un patrón estacional con picos de casos durante ciertas épocas del año, como el invierno.
- **Respuesta inmunológica:** El sistema inmunológico desempeña un papel crucial en la defensa contra las infecciones respiratorias, sin embargo, en algunas enfermedades, como el asma y las enfermedades autoinmunes del pulmón, puede haber una respuesta inmunológica anormal o excesiva que contribuye a la inflamación y el daño pulmonar.
- **Factores ambientales:** La exposición a agentes como la contaminación del aire, los alérgenos, los irritantes químicos o el humo del tabaco, puede desencadenar o agravar enfermedades respiratorias, estos factores pueden dañar las vías respiratorias, aumentar la inflamación y afectar la función pulmonar.

2.1.2 Patogenia

La patogenia es un concepto crucial en medicina y biología, se refiere al complejo proceso mediante el cual se desarrolla una enfermedad en el organismo el cual comienza en el momento en que una persona entra en contacto con un agente patógeno, como un virus o bacteria, la patogenia es una pieza fundamental para entender como las enfermedades respiratorias se manifiestan y progresan (Esposito, Gleeny, Iheozor, & Philippa, 2017).

El libro "The early response to a novel coronavirus in the Middle East", escrito por Mounts en (2017), proporciona una valiosa perspectiva sobre los aspectos generales de la patogenia en el contexto específico de las enfermedades respiratorias mencionadas a continuación:

- **Vías de entrada:** Los agentes infecciosos pueden ingresar al sistema respiratorio a través de diferentes vías, esto puede incluir la inhalación de partículas o aerosoles contaminados presentes en el aire, la aspiración de secreciones infectadas desde el tracto respiratorio superior hacia los pulmones, o el contacto directo con las mucosas respiratorias.
- **Colonización y replicación:** Una vez que los agentes infecciosos ingresan al sistema respiratorio, pueden colonizar las células de las vías respiratorias y comenzar a replicarse, esto puede causar daño celular y una respuesta inflamatoria localizada.
- **Respuesta inmunológica:** El sistema inmunológico del huésped responde a la infección respiratoria con una variedad de mecanismos de defensa, esto puede incluir la respuesta inflamatoria local, la movilización de células inmunitarias, como neutrófilos y macrófagos, y la producción de anticuerpos y células inmunitarias específicas para combatir la infección.
- **Daño tisular y síntomas:** La replicación viral, la respuesta inflamatoria y otros mecanismos patogénicos pueden causar daño tisular en el sistema respiratorio.

Los virus que causan enfermedades respiratorias más comunes son los coronavirus, los rinovirus, el virus sincitial respiratorio (VSR), el virus de la influenza, los virus de la parainfluenza y los adenovirus entre otros, estos microorganismos infectan las células de la nariz, la garganta y los pulmones, y pueden provocar síntomas como fiebre, tos, dolor de garganta, congestión nasal, dificultad para respirar y neumonía, algunas de estas infecciones pueden ser graves y causar la muerte, en personas con enfermedades crónicas o inmunodeprimidas (Aspa & Naranjo, 2010).

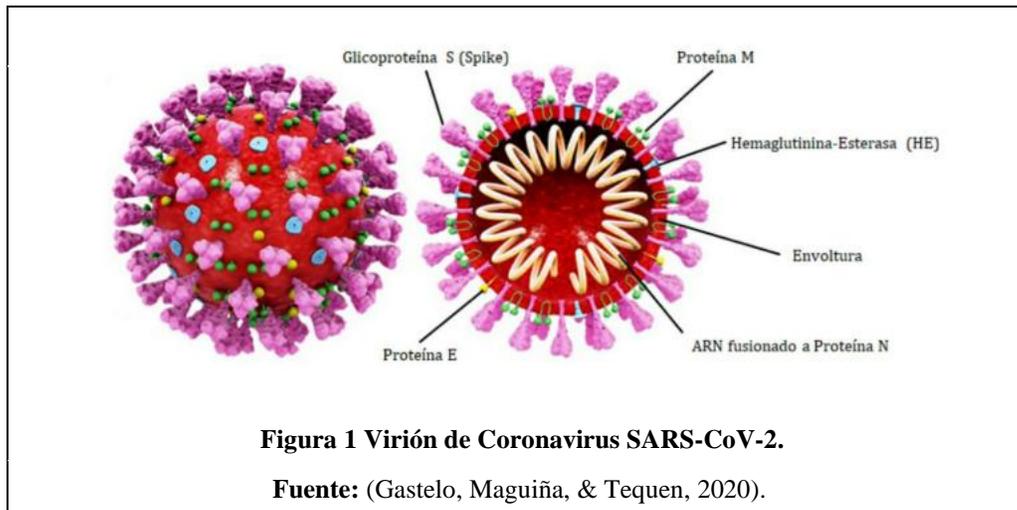
La prevención y el diagnóstico precoz de las enfermedades respiratorias virales son fundamentales para evitar complicaciones y reducir la transmisión, actualmente existen diferentes métodos de diagnóstico, como las pruebas moleculares, las pruebas serológicas y las pruebas rápidas, que pueden detectar la presencia o los anticuerpos de los virus en las muestras respiratorias o sanguíneas, en la mayoría de los casos, el cuerpo finalmente logra eliminar el agente patógeno, aunque esto puede llevar tiempo y puede requerir tratamiento médico, en otros casos, el agente patógeno puede permanecer en el cuerpo durante mucho tiempo, causando una infección crónica (Bartlett J. , 2008).

Las pruebas de detección de virus, como las pruebas de PCR y de antígenos, detectan un virus en el cuerpo antes de que la persona muestre síntomas, por ello la investigación sobre nuevos métodos de diagnóstico es fundamental para mejorar la sensibilidad, especificidad, precisión y rapidez de las pruebas, así como para reducir los costos y facilitar el acceso a la población, en donde detectar una enfermedad respiratoria viral en una etapa temprana brinde herramientas para un tratamiento eficaz y rápido con la finalidad de prevenir la propagación a la población, dentro de las enfermedades respiratorias causadas por virus las más importantes tenemos COVID-19, Influenza y virus respiratorio sincitial (Moreno & Agudelo, 2010).

2.1.3 SARS-CoV-2

A finales de Diciembre de 2019, se detectaron casos de neumonía de origen desconocido en Wuhan, China, que rápidamente se propagaron por todo el mundo, esta situación se convirtió en un importante problema de salud global, debido a la alta transmisibilidad del virus causante, el aumento en la transmisión de la infección por COVID-19 a través del contacto cercano entre individuos infectados ha impulsado la implementación de nuevas políticas gubernamentales destinadas a mitigar los efectos de esta enfermedad, en donde el COVID-19, originado por el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), representa una amenaza infecciosa de gran magnitud (OMS, 2020).

Para comprender el genoma del virus, como se observa en la figura 1, es esencial adentrarse en las particularidades del propio SARS-CoV-2, identificando las proteínas que deben ser detectadas y aquellas presentes en el virus, este conocimiento permitirá discernir las partes del genoma viral que son relevantes y susceptibles de ser identificadas (Wu & McGoogan, 2020).

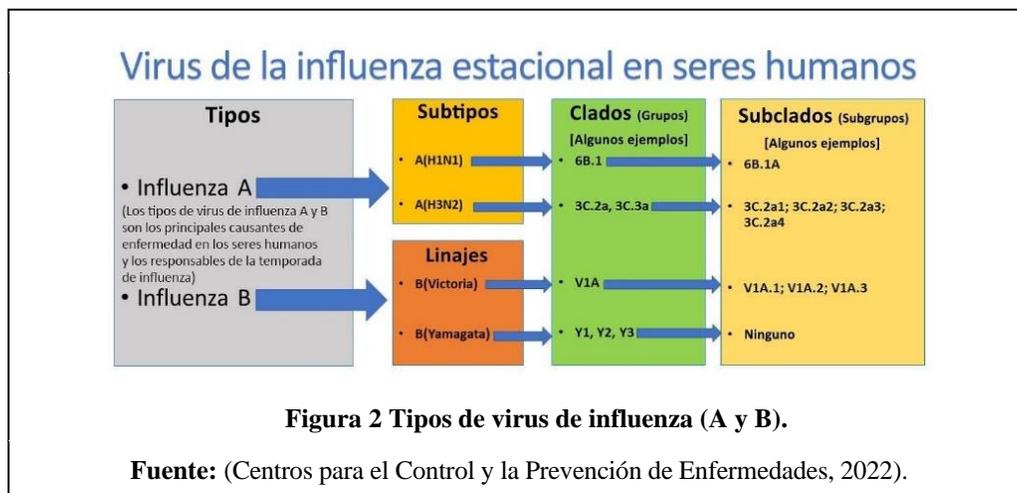


La epidemia causada por el virus SARS-CoV-2 ha destacado el relevante papel del sistema *renina-angiotensina-aldosterona* (RAAS) en el desarrollo de la infección viral, este sistema tanto en el ámbito pulmonar como en el sistémico, desempeña una función significativa considerando que el virus utiliza la enzima convertidora de angiotensina 2 como receptor, por otro lado, el *metapneumovirus* humano, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* y al género *metapneumovirus*, es un microorganismo de tipo viral de ARN que puede provocar diversas enfermedades respiratorias, especialmente en niños, para su diagnóstico, se recurre a técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa o el cultivo celular (Esler & Esler, 2022).

En pacientes bajo sospecha de infección por COVID-19, el enfoque inicial del tratamiento dependerá del estadio en que se encuentre la enfermedad, comienza con la administración de oxígeno suplementario y la restricción de líquidos, junto con el uso de antimicrobianos de manera empírica debido a la posibilidad de coinfección bacteriana, en ciertos casos el uso de corticosteroides no se recomienda para evitar efectos secundarios (Gorbalenya, et al., 2019).

2.1.4 Influenza

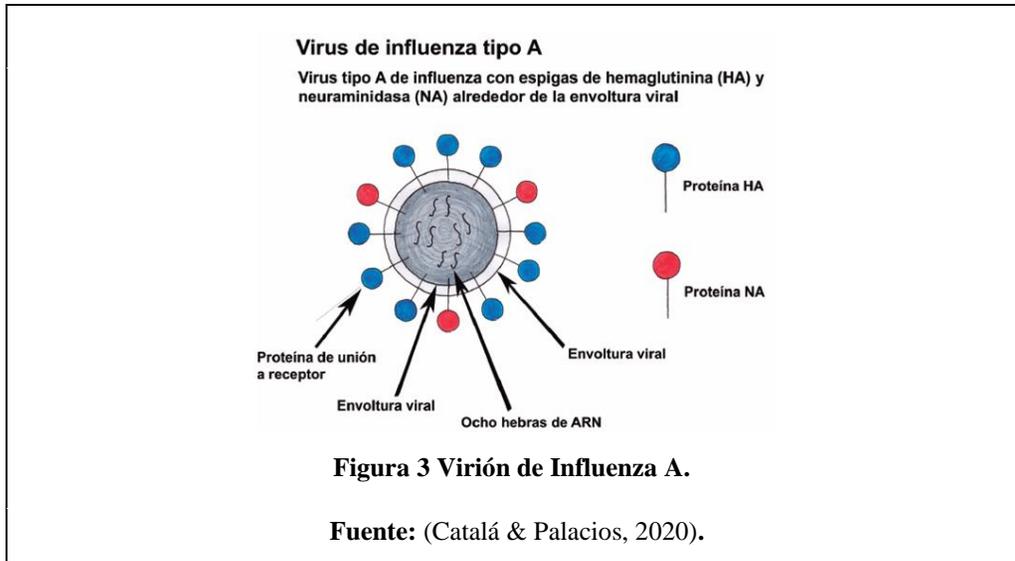
La influenza es una enfermedad respiratoria con altos niveles de contagio ocasionada por el virus de influenza que infecta la nariz, la garganta y los pulmones, este virus puede causar enfermedades de intensidad moderada a graves y, a veces, la muerte, existen varios tipos de virus de la influenza, incluyendo la influenza A, B, C y D como se observa en la figura 2, los virus de la influenza A y B son los que más comúnmente causan enfermedades en humanos, estos tienen una capacidad significativa para mutar y cambiar su composición genética lo que da lugar a diferentes cepas del virus que circulan cada temporada, lo que puede dificultar la eficacia de la inmunidad adquirida en temporadas anteriores (Sui, et al., 2019).



2.1.4.1 Influenza A

Influenza A también conocido como *Influenzavirus A* o *Alphainfluenzavirus* es un tipo de agente viral perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, cuando ocurre la mutación antigénica, causa influenza episódica en humanos y ocurre durante un período de 10 a 15 años (Salomon & Webster, 2009). La influenza A es una de las dos principales grupos de virus de la gripe que a los seres humanos afecta, y se subdivide en diferentes subtipos y cepas que pueden causar diferentes brotes de gripe, la influenza A es contagiosa y puede tener efectos peligrosos en la salud en casos más graves, y se transmite de persona a persona a través del contacto con partículas respiratorias infectadas o superficies contaminadas a continuación se mencionan diversos síntomas que incluyen: fiebre, tos, dolor de cabeza, dolor de garganta, fatiga y dolores musculares, el tratamiento

antiviral está disponible para la influenza A, y la prevención a través de la vacunación es una forma importante de protegerse contra el virus (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2022), como se observa en la figura 3.

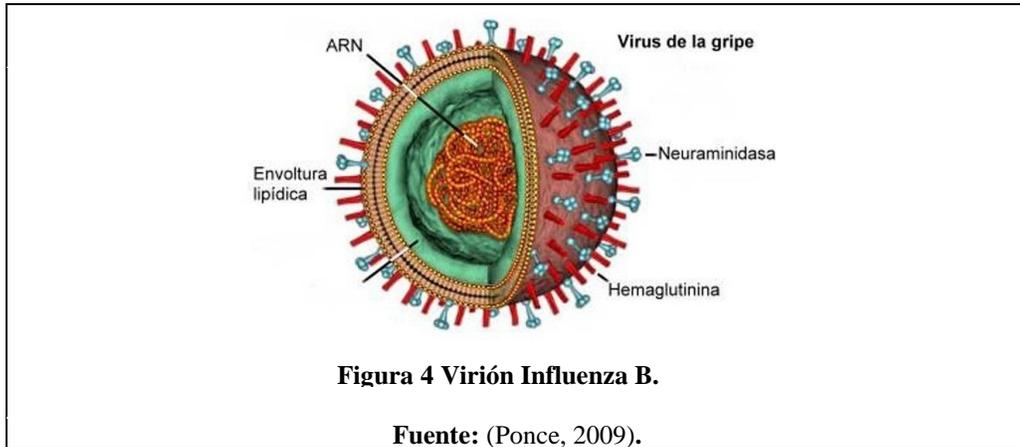


2.1.4.2 Influenza B

La Influenza B forma parte del género de virus de la familia *Orthomyxoviridae* acompañado por diferencias antigénicas menores, este virus se suma al panorama del virus de la influenza A, durante la temporada de gripe, es importante mencionar que durante la pandemia de COVID-19, posiblemente, el linaje B/Yamagata haya experimentado un declive en su incidencia (Kuiken T, 2021).

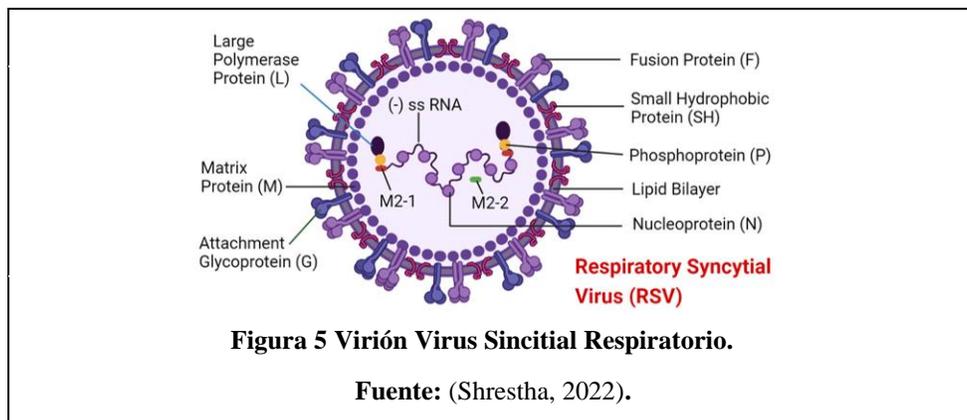
Influenza B constituye uno de los tipos de virus de la gripe que afectan a los seres humanos, siendo el responsable detrás de la gripe estacional, diferente de los virus de influenza A como se observa en la figura 4, los virus de la influenza B no se subdividen en subtipos, sino que se agrupan en dos linajes conocidos como B/Victoria y B/Yamagata, si bien la influenza B puede ser altamente contagiosa y, en casos más severos, conlleva riesgos para la salud, generalmente desencadena síntomas de gripe de menor intensidad en comparación con la influenza A, es más prevalente entre los niños, aunque actualmente no existe una cura permanente para el virus de la influenza, se encuentran disponibles tratamientos antivirales, así mismo, se han desarrollado vacunas contra la

influenza estacional, particularmente dirigidas a aquellos en mayor riesgo de contraer la infección (Kilbourne, 2006).



2.1.5 Virus Respiratorio Sincitial

El Virus Respiratorio Sincitial (VRS) adquiere su nombre debido a su inclinación a formar conglomerados de células de gran tamaño conocidos como sincitios cuando se cultivan en tejidos, este virus que pertenece a la familia de los *paramixovirus* y al género *neumovirus*, fue identificado por Morris, Blount y Savage en 1955, es la causa más común infección de las vías respiratorias bajas (RIIT) causa brotes estacionarios alrededor del mundo en la parte norte del hemisferio, suele ocurrir de noviembre a abril, en la parte sur del hemisferio, en las regiones tropicales y semitropicales y normalmente se presentan en la temporada de lluvias, estas son infecciones que afectan la parte baja del sistema respiratorio, principalmente los bronquios y los pulmones (Sullender, 2000), como se observa en la figura 5.



2.2 Técnicas de diagnóstico molecular

La historia de las técnicas de diagnóstico molecular se remonta a la década de 1960, cuando los científicos comenzaron a comprender mejor la estructura de los cromosomas de la herencia, en la década de 1970, se desarrolló la técnica de Southern blot, que permitió la detección de secuencias específicas de ADN en una sola muestra, las técnicas de diagnóstico molecular son un conjunto de herramientas que permiten analizar el material genético de tipo Ácido desoxirribonucleico (ADN) o Ácido ribonucleico (ARN) según la prueba lo necesite con el objetivo de encontrar mutaciones, identificar microorganismos, diagnosticar enfermedades genéticas luego, en la década de 1980, se desarrolló la técnica de Northern blot, que permitió la detección de secuencias de ARN, en la década de 1990, se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que fue un hito en el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular (Angarita, Díaz , & Torres, 2017).

La PCR amplifica en pequeñas cantidades de material genético, lo que facilitaba el proceso de detección y diagnóstico para esta herramienta existen múltiples aplicaciones entre las cuales se encuentran la capacidad de realizar investigaciones sobre la expresión genética, la secuenciación directa de secuencias amplificadas, la detección de mutaciones, el diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas, y su uso en la ciencia forense, por ejemplo, para la identificación de restos biológicos y pruebas para criminalística (Rocha, et al., 2017).

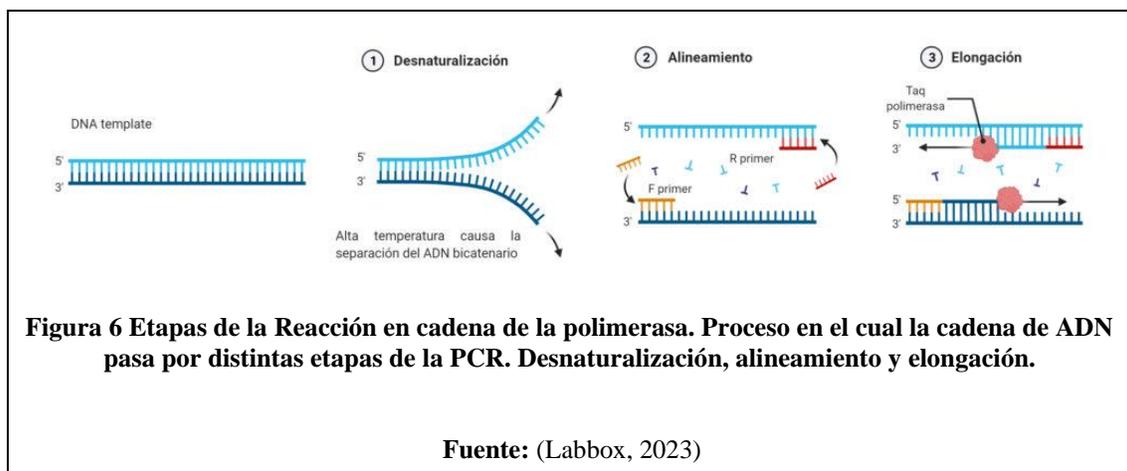
Las técnicas de diagnóstico molecular son cruciales en la actualidad, ofrecen una precisión excepcional para identificar patógenos y enfermedades, estas pruebas permiten una detección temprana, crucial para el manejo y control de infecciones, además, guían la selección de tratamientos adecuados, ayudan a monitorear la respuesta al tratamiento y desempeñan un papel clave en la investigación epidemiológica, su importancia se ha acentuado en situaciones de brotes y pandemias, como el COVID-19, al permitir rastrear y contener la propagación de enfermedades de manera efectiva (Farfán, 2015).

2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica esencial que se emplea tanto en la detección de patógenos en el ámbito clínico como en la medicina forense, particularmente para identificar ADN en escenas del crimen, además, es útil para el genotipado, entre otras aplicaciones; debido a su fundamento sencillo y claro, la PCR se considera un método fiable y preciso para alcanzar diagnósticos acertados (Tamay de Dios & Velasquillo, 2013).

Las pruebas PCR tienen la capacidad de identificar enfermedades incluso cuando la cantidad de patógenos en el individuo es mínima, estas pruebas pueden reconocer los indicios de una enfermedad en sus etapas iniciales y determinar el agente patógeno específico, algunas pruebas no logran detectar las señales tempranas de la enfermedad debido a la insuficiente presencia de virus, bacterias u otros patógenos en la muestra, otra razón podría ser que el cuerpo del individuo aún no ha generado una respuesta de anticuerpos detectable (Garibyan & Avashia, 2013).

La técnica de PCR permite usar ADN o ARN de cualquier microorganismo como material genético, a partir de una mínima cantidad de muestra, se replica varias veces en un proceso llamado amplificación, si hay patógenos presentes en la muestra, esta amplificación facilita su detección, y sigue los pasos según la figura 6, incluso una sola molécula de ADN o ARN puede ser suficiente para lograr su identificación mediante esta técnica de amplificación (Tamay de Dios & Velasquillo, 2013).



2.2.2 PCR en tiempo real

Esta técnica es necesaria para detectar y cuantificar rápidamente la cantidad de ácido nucleico amplificado en la muestra siendo utilizado en la ciencia y la investigación médica, la PCR en tiempo real la cual es utilizada para la detección de virus y otros agentes patógenos en muestras clínicas, a medida que se produce la amplificación durante los ciclos de la PCR, se acumula la señal de fluorescencia en proporción al de ADN amplificado presente en cada ciclo lo cual permite medir y cuantificar la porción inicial de ADN objetivo presente en la muestra original para la detección de la fluorescencia se realiza en tiempo real a medida que la reacción de amplificación se realiza en el termociclador que está especialmente diseñado para detección de estas señales (Rojas, et al., 2000).

En la PCR convencional, se amplifica el ADN objetivo durante una serie de ciclos de amplificación y luego se realiza una electroforesis en gel para visualizar los productos amplificados; a través de la qPCR permite la detección de los productos de amplificación durante la reacción, sin necesidad de procesos posteriores como la electroforesis, en la PCR en tiempo real se utiliza una sonda de ADN específica, llamada sonda de sondaje, que está diseñada para unirse de forma específica a la secuencia diana del ADN durante la amplificación es decir esta sonda contiene un marcador fluorescente en un extremo y un quencher en el otro extremo de esta forma el marcador fluorescente emite fluorescencia cuando se separa del quencher debido a la actividad de la ADN polimerasa durante la amplificación (Agindotan, 2020). El instrumento mide la intensidad de fluorescencia en cada ciclo y genera una curva de amplificación, que representa la cantidad de ADN diana presente en la muestra en función del número de ciclos, el artículo científico de Barrera y otros (2016), proporciona información sobre como que detalla el uso de la PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de virus y destaca cómo es ampliamente utilizada en la investigación científica debido a su sensibilidad, especificidad y precisión a continuación se presentan de forma detallada:

- Sensibilidad y especificidad: La PCR en tiempo real es extremadamente sensible y específica, siendo capaz de detectar y cuantificar incluso mínimas cantidades de material genético de esta forma es útil para detectar infecciones virales, incluyendo el COVID-19, donde el patógeno puede estar presente en bajas cantidades.

- Detección en tiempo real: Durante la PCR en tiempo real, un marcador fluorescente se une al ADN a medida que se amplifica de hecho este marcador emite una señal que puede ser detectada y medida en tiempo real, lo que permite seguir el proceso de amplificación.
- Cuantificación: La PCR convencional no cuantifica, en relación con la PCR en tiempo real puede determinar la cantidad de ácidos nucleicos presente en la muestra original.

Durante brotes de enfermedades respiratorias, es fundamental poder analizar rápidamente un gran número de muestras para identificar y controlar la propagación del patógeno, los equipos automatizados pueden procesar un alto volumen de muestras en poco tiempo, lo que facilita una respuesta rápida y efectiva ante un brote (Barrera, et al., 2016).

2.2.3 Equipo de extracción automatizado de ácidos nucleicos

Es fundamental en biología molecular por lo que proporcionan de una manera eficiente aislar ADN y ARN de muestras biológicas para su posterior análisis, algunas de las características que posee el equipo son alta precisión, reproducibilidad, capacidad para procesar múltiples muestras al mismo tiempo, como se muestra en la tabla 2, lo cual garantiza una mayor uniformidad y consistencia en los resultados, lo que contribuye a una mayor precisión y reproducibilidad de los análisis, por lo que es vital para obtener resultados confiables y precisos en el diagnóstico de enfermedades respiratorias (Cuadra, Guadrón, Cruz, & Vásquez, 2021), se presenta el equipo en la figura 7.



Figura 7 Equipo de Extracción de material genético Maelstrom 9610.

Fuente: (TANBead®, 2022)

Tabla 2 Descripción del Equipo Maelstrom 9610.

	<p>Automatización completa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extracción y purificación simultánea de muestras de ADN y ARN. • Optimización automatizada de una serie de pasos manuales extensos y complejos. • Control de temperatura con módulos autónomos para garantizar un proceso de purificación estable. 	
	<p>Tecnología patentada de agitación en forma de torbellino</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de procesamiento de hasta 1.600µl. • Las puntas rotativas mezclan las perlas magnéticas alcanzando velocidades de hasta 3.000 rpm. • Eficaz prevención de contaminación cruzada a través de aerosoles. 	
	<p>Uso sencillo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Interfaz de usuario amigable con navegación intuitiva a través de los menús. • Posibilidad de personalizar parámetros con exactitud según las necesidades del experimento. 	
	<p>Maximización del tiempo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gran capacidad: se pueden manejar hasta 96 muestras de forma simultánea. • Agitación de alta eficiencia con velocidades ajustables, lo que se traduce en una significativa reducción del tiempo de procesamiento. 	

Fuente: (TANBead®, 2022)

2.2.4 RT-qPCR

Esta técnica se utiliza comúnmente para la detección y cuantificación de ARN, incluido el ARN viral que se encuentra en el SARS-CoV-2 y la influenza, la RT-qPCR, o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real, es una técnica de laboratorio que implica convertir el ARN en ADN complementario utilizando la enzima transcriptasa inversa, y luego logra amplificar el ADN utilizando PCR, este es un método sensible y específico que permite la detección de cantidades muy pequeñas de ARN en una muestra, lo que lo convierte en una herramienta valiosa en diagnósticos y en la investigación, por consiguiente algunos de los resultados de búsqueda proporcionan más información sobre esta técnica y sus usos, es importante conocer que la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) es una técnica que combina la transcripción inversa y la PCR convencional en la cual se utiliza una enzima llamada transcriptasa inversa para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), el cual luego puede ser amplificado mediante PCR (Moss, 2022).

El ARN es menos estable que el ADN y puede ser susceptible a la degradación en presencia de ribonucleasas, además el ARN a menudo está presente en cantidades más bajas en comparación con el ADN en una muestra biológica, por lo tanto, para cuantificar y amplificar el ARN, es necesario convertirlo en ADNc mediante la transcripción inversa, normalmente en la RT-PCR, se utiliza una mezcla de ARN y oligonucleótidos específicos llamados cebadores (primers) que se unen a secuencias específicas del ARN mensajero (ARNm) diana, en donde la enzima transcriptasa inversa genera una cadena complementaria de ADNc utilizando el ARN como molde y uno de los cebadores como iniciador, para este punto una vez que se logró sintetizar el ADNc, se lleva a cabo una PCR de punto final utilizando cebadores específicos para amplificar el fragmento de ADNc de interés (Beneduce, 2023).

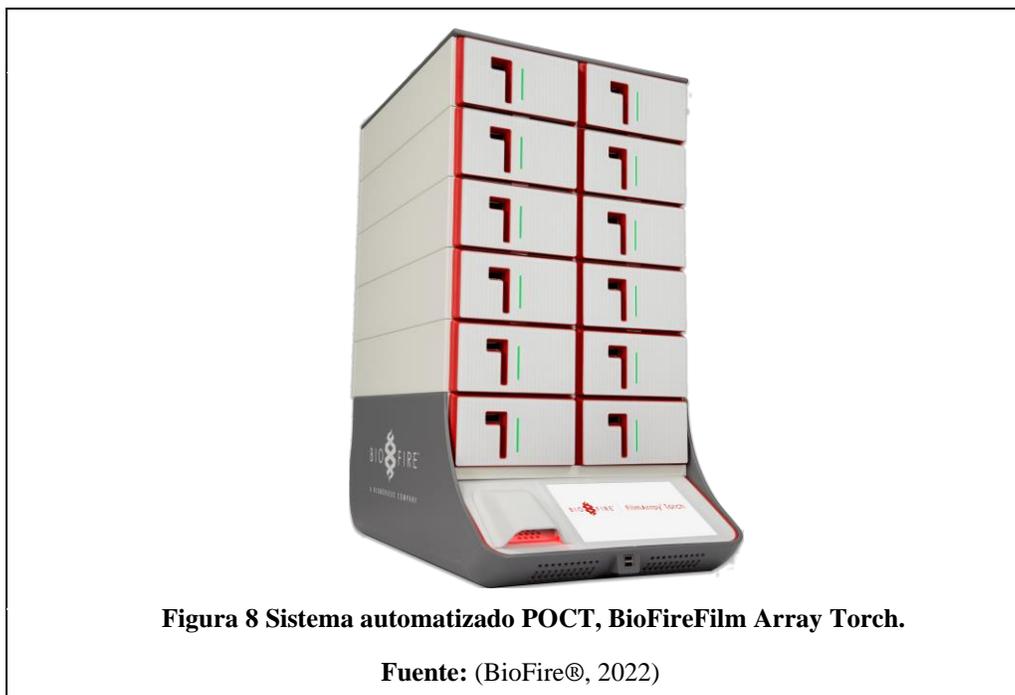
Los productos de amplificación se pueden detectar y cuantificar utilizando métodos como la fluorescencia en tiempo real o la electroforesis en gel, en cuanto a la cuantificación del ARN antes de la RT-PCR, los espectrofotómetros convencionales pueden requerir grandes volúmenes de muestra, lo que puede ser problemático cuando se dispone de una cantidad limitada de ARN de

esta manera en estos casos, se utilizan métodos más sensibles y específicos, como la espectrofotometría UV o la fluorometría, que requieren volúmenes de muestra más pequeños y permiten una mayor precisión en la cuantificación del ARN (Bartlett & Stirling, 2003).

2.3 Sistema Automatizado POCT

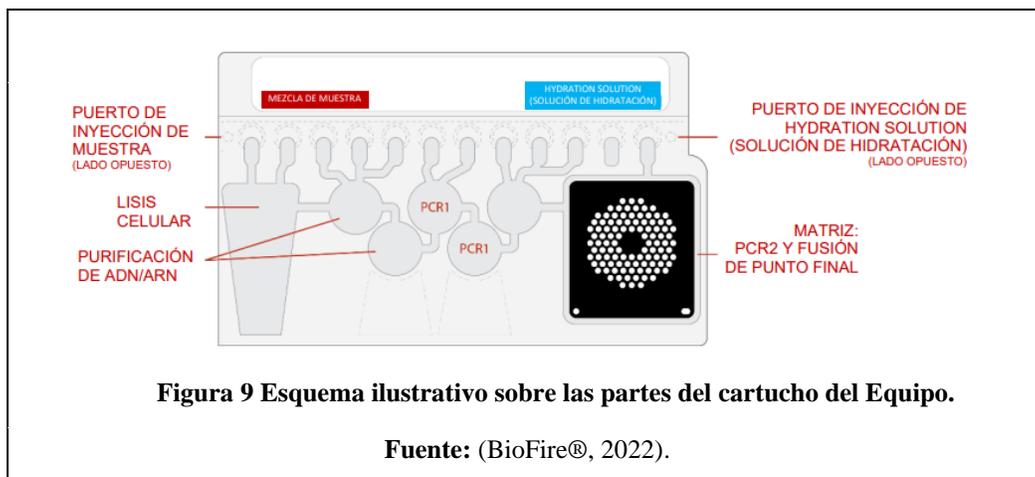
El sistema POCT se refiere a Pruebas de Laboratorio en el lugar de Asistencia (Point Of Care Tasting) que son pruebas de diagnóstico médico que se realizan en el punto de atención al paciente, en lugar de ser enviadas a un laboratorio central, lo que permite obtener resultados más rápidos se utilizan en hospitales, clínicas y otros entornos de atención médica para la detección y diagnóstico de enfermedades, algunos ejemplos son carga viral, glucosa, y paneles gastrointestinales, entre otros (CLSI., 2023), se presenta el equipo en la figura 8.

La necesidad de aplicación por su manera rápida de detección de niveles anormales o deficientes de algún marcador o patógeno que genere de manera agresiva o variada efectos negativos al paciente, siendo los lugares idóneos según (2017), en áreas como Urgencias, UCI pediátrica y UCI neonatos; por requerir de manera inmediata o urgentes resultados con equipos de manejo cómodo y eficiente.



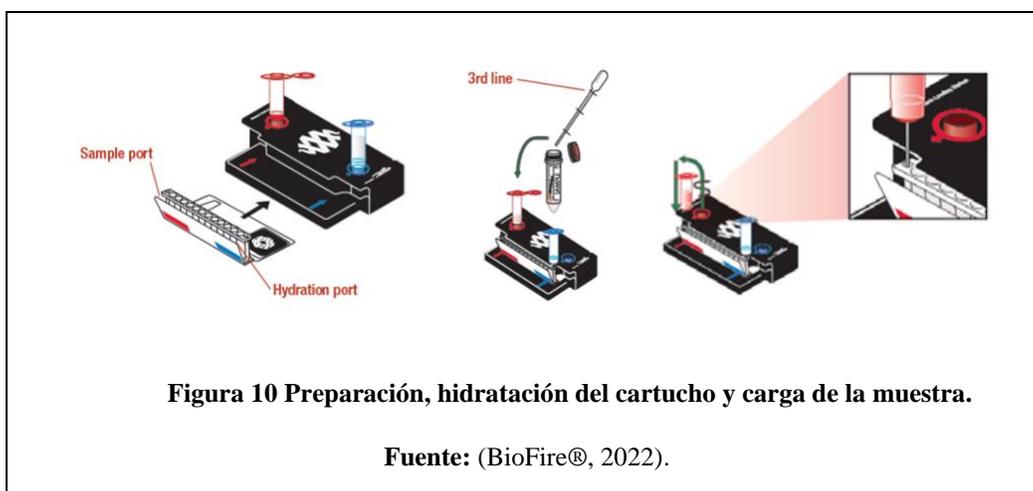
2.3.1 Generalidades del cartucho

El manual presentando por BioFire® (2022), presenta generalidades sobre el cartucho del equipo el cual realiza la lisis de la muestra por agitación (batido de microesferas) además de la lisis química mediada por la solución tampón extrae y purifica todos los ácidos nucleicos de la muestra utilizando la tecnología de microesferas magnéticas, realiza la PCR multiplex anidada mediante la transcripción inversa, seguida de una reacción de PCR multiplex en la primera etapa, a continuación realiza múltiples reacciones simultáneas de PCR como segunda etapa en el array para amplificar secuencia dentro de los productos de la primera reacción de PCR, mediante la curva de fusión del punto final para detectar amplicones específicos de la diana y analiza los datos para generar un resultado para cada analito, el equipo FilmArrayTorch® también conocido como BioFire® tiene como base una PCR multiplex anidada, el kit contiene los siguientes materiales: Cartucho BioFire RP2.1 plus, Vial de inyección de hidratación, Buffer de muestra, Vial de inyección de muestra y pipeta Pasteur, las muestras son tomadas mediante la técnica de Hisopados nasofaríngeos y recolectadas en un vial de transporte, para iniciar el proceso de preparar e hidratar el cartucho y cargar la muestra varía dependiendo del dispositivo específico de POCT y el tipo de prueba que se esté realizando, en este caso para detección de virus respiratorios, algunos sistemas de POCT requieren que el cartucho de prueba, como se ve reflejado en la figura 9, se hidrate antes del uso, lo cual puede implicar la adición de una solución de hidratación al cartucho, las indicaciones se detallan en la figura 10.



Controles externos:

Los controles externos deben ser utilizados de acuerdo con los procedimientos del laboratorio y los estándares establecidos por las organizaciones de acreditación relevantes, se pueden emplear medios de transporte o solución salina como control negativo externo, también es viable emplear materiales de control externo comerciales de otros fabricantes, siempre y cuando se sigan las instrucciones proporcionadas por los fabricantes y se cumplan los requisitos de la organización de acreditación correspondiente.



Controles del proceso:

La prueba RNA Process Control (Control del procesamiento de ARN) utiliza el transcripto de ARN derivado de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* como su objetivo, la levadura está presente en el cartucho como producto liofilizado y se rehidrata al cargar la muestra, la prueba PCR2 Control (Control PCR2) identifica un ADN específico que se encuentra en estado liofilizado en los pocillos de la matriz, junto con sus cebadores correspondientes. Si el resultado es positivo, indica que la PCR2 fue realizada correctamente (Basu & Krishnamurthy, 2010).

2.3.2 Aplicaciones en el área de diagnóstico molecular

El sistema POCT es una herramienta en el área de diagnóstico molecular si bien es cierto que el POCT puede abordar muchas áreas, incluidas la química clínica, la hematología y la inmunología,

en el contexto del diagnóstico molecular, estas pruebas se utilizan para identificar secuencias específicas de ADN o ARN que pueden indicar la presencia de un patógeno o una condición genética específica (Gualerzi, 2020).

Según el manual TANBead®, (2022) a continuación se mencionan varias aplicaciones:

- **Detección de enfermedades infecciosas:** Las pruebas POCT se utilizan ampliamente para la detección de enfermedades infecciosas, como enfermedades respiratorias (influenza, SARS-CoV-2) lo que permiten una rápida identificación de los agentes infecciosos, lo que facilita un tratamiento temprano y la adopción de medidas de control y prevención.
- **Diagnóstico prenatal:** Se emplean en el diagnóstico prenatal para detectar anomalías genéticas en el feto, como el síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Down (trisomía 21) y el síndrome de Edwards (trisomía 18).
- **Monitoreo de enfermedades crónicas:** Las pruebas POCT son útiles en el monitoreo de enfermedades crónicas entre las cuales se encuentra la diabetes y las enfermedades cardiovasculares permiten la medición rápida de biomarcadores clave, como los niveles de glucosa en sangre y los lípidos sanguíneos.
- **Detección de enfermedades genéticas:** También se utilizan para la detección de enfermedades genéticas hereditarias, como la fibrosis quística lo que permite una identificación rápida de las mutaciones genéticas relevantes.
- **Control de enfermedades transmisibles:** Desempeñan un papel importante en el control de enfermedades transmisibles, como la detección de hepatitis B y C en donantes de sangre, la detección de tuberculosis y la detección de infecciones en brotes epidemiológicos.

2.3.3 Interpretación de los resultados

Según el manual BioFire (2022), después de identificar las curvas de fusión, el software analiza las tres réplicas de cada prueba para llegar a un resultado, para que una prueba sea considerada positiva, al menos dos de las tres curvas de fusión asociadas deben mostrar un resultado positivo, y la temperatura de fusión (T_f) de al menos dos de las tres curvas positivas debe ser similar, con una diferencia de no más de 1 °C.

Resultado	Prueba	Pruebas FluA-pan (n = 2)	FluA-H1-2	FluA-H1-2009	FluA-H3	Acción
Virus Influenza A Not Detected (No detectado)		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ninguna
Virus Influenza A A/H1		≥ 1 positivo	Positivo	Negativo	Negativo	
Virus Influenza A A/H3		≥ 1 positivo	Negativo	Negativo	Positivo	
Virus Influenza A A/H1-2009		≥ 1 positivo	Cualquier resultado	Positivo	Negativo	
Virus Influenza A A/H1 Virus Influenza A A/H3		≥ 1 positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Las infecciones múltiples son posibles, aunque poco frecuentes ^a , repetir la prueba UNA VEZ para confirmar el resultado ^b
Virus Influenza A A/H1-2009 Virus Influenza A A/H3		≥ 1 positivo	Cualquier resultado	Positivo	Positivo	
Virus Influenza A (no se detecta ningún subtipo)		2 positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Repetir la prueba (ver más abajo)
Virus Influenza A Equivocal (Dudoso)		1 positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Repetir una vez (consulte la sección Result Summary [Resumen de resultados] a continuación para obtener más instrucciones).
Virus Influenza A A/H1 Equivocal (Dudoso)		Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	
Virus Influenza A A/H3 Equivocal (Dudoso)		Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	
Virus Influenza A A/H1-2009 Equivocal (Dudoso)		Negativo	Cualquier resultado	Positivo	Negativo	

Figura 11 Resultados obtenidos para el virus de Influenza A, sus variantes y la interpretación correspondiente.

Fuente: (BioFire®, 2022)

Cada una de las pruebas individuales se interpreta de manera independiente, tal como se detalló anteriormente, el resultado notificado para el virus de Influenza A se basa en la combinación de los resultados de las cinco pruebas, un resultado Erróneo (Dudoso) para el virus Influenza A (o subtipo) puede ocurrir cuando la concentración del virus en la muestra es baja y no es detectada por una o más pruebas requeridas (Nair, 2021). Según se indica en la figura 11:

Nombre de la prueba	Diana génica
SARSCoV2-1	Gen de la proteína Spike (S)
SARSCoV2-2	Gen de la proteína de membrana (M)

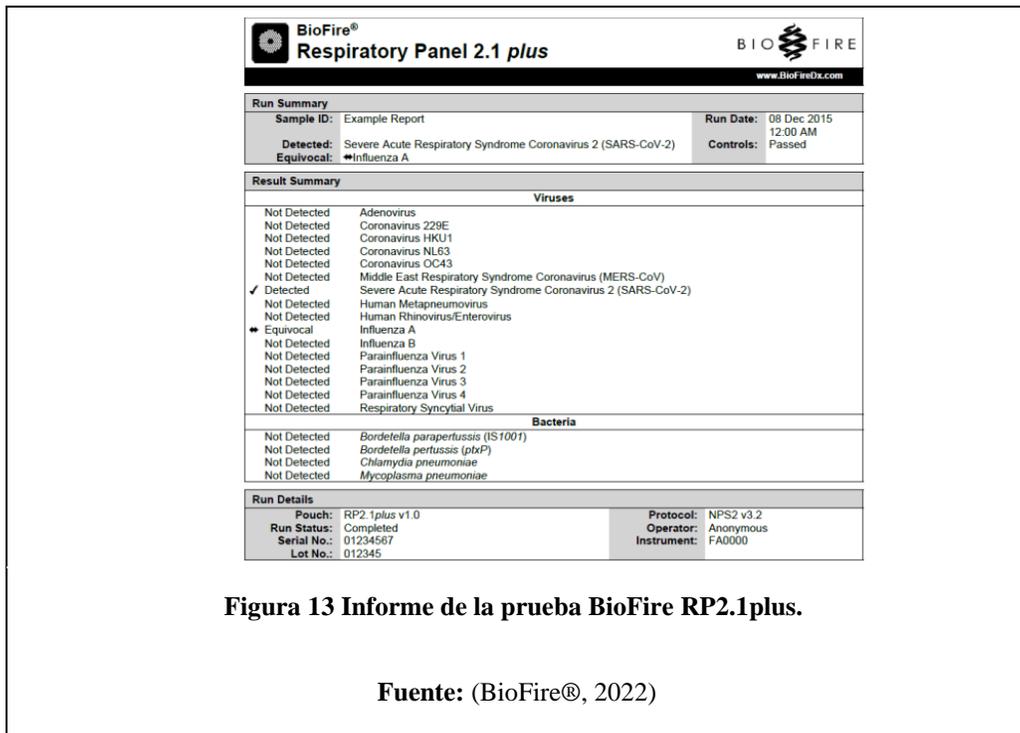
Figura 12 Dianas génicas para las pruebas de SARS-Cov-2 en el sistema POCT.

Fuente: (BioFire®, 2022)

El cartucho BioFire RP2.1plus posee dos análisis para identificar el patógeno de SARS-CoV-2 en donde cada análisis se centra en un objetivo específico, como se muestra en la tabla, el sistema evalúa cada análisis por separado y si uno o ambos dan positivo, se indicará en el reporte que el Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) está "Presente", sin embargo, si las dos pruebas son negativas, el reporte señalará que no se ha "Detectado" el mencionado virus (Wang, 2022), como se observa en la figura 12.

Informe de la prueba BioFire RP2.1plus:

De acuerdo con el manual TANBead® (2022), en la sección denominada "Run Summary" o "Resumen de la prueba" del informe, se muestra información como la identificación de la muestra (Sample ID), la fecha y hora en que se realizó el análisis, los resultados de los controles y un resumen general de los hallazgos de la prueba. Si algún organismo es identificado como "Detectado", aparecerá en su espacio designado dentro del resumen. En la figura 13 se observa el informe de la prueba:



2.3.4 Microorganismos detectados

Los coronavirus (CoV) son agentes patógenos del sistema respiratorio que se descubrieron en la década de 1960, hasta ahora, se han asociado siete variantes con afecciones en humanos de estos, cuatro tipos (coronavirus 229E, OC43, HKU1, NL63) son comunes en la población humana y constituyen aproximadamente el 15% de los resfriados habituales (Peiris JS, 2021).

La influenza A y B son virus con ARN y forman parte de la familia *Orthomyxoviridae* en las epidemias anuales de gripe, del 5% al 20% de las personas experimentan infecciones respiratorias altas, destacándose por el inicio súbito de fiebre, el tipo dominante de virus influenza puede variar con regularidad debido a pequeñas y grandes alteraciones antigénicas que suceden en estos virus (Hilleman, 2020).

El virus respiratorio sincitial (RSV) es un tipo de virus ARN que pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y está estrechamente relacionado con los *metapneumovirus* y los virus *parainfluenza*, el RSV se divide en dos subtipos principales (A y B), los cuales varían en su prevalencia de manera anual (Domachowske, 2021).

Capítulo 3 Materiales y métodos

Conforme a los objetivos de esta investigación, a continuación, se detalla la metodología que se empleó para alcanzarlos, se describe el tamaño de muestra en la que se realizó el estudio, los materiales y métodos utilizados para el procesamiento de las pruebas de hisopado nasofaríngeo, el diseño de la matriz de datos para registrar los casos que se estudió y finalmente la manera en que se empleó el análisis de los datos para lograr realizar la comparación de resultados.

3.1 Población muestral

La presente investigación es de tipo exploratoria-comparativa, en la que se tomó las muestras de hisopado nasofaríngeo y recolectadas en un vial de transporte, en 60 pacientes atendidos en el Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo, entre las fechas abril a junio del presente año 2023, para detectar los casos de los virus de: Influenza A y B, virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2.

3.2 Recepción y Transporte de muestra

Obtención de muestras nasofaríngeas:

En el Hospital de Especialidades Teodoro Maldonado Carbo, en la unidad técnica de Genética y Molecular las muestras son tomadas por un profesional de salud que extrae el hisopo de su envoltura e inclina un poco la cabeza del individuo hacia atrás para facilitar el acceso a las fosas nasales, por precaución, en caso de que el paciente tosa o estornude, el profesional de salud debe posicionarse ligeramente a un lado del paciente al tomar la muestra (Morales Angulo, y otros, 2020).

Recepción de muestras para hisopados nasofaríngeos:

En el proceso de manejo de muestras para pruebas de diagnóstico molecular, se siguieron rigurosamente a través de medidas de bioseguridad, lo cual incluye un lavado meticuloso de manos

y la utilización de guantes para prevenir cualquier contaminación, las muestras deben estar correctamente rotuladas, son recibidas y registradas con cuidado, una vez en el laboratorio, se procede a su ingreso en la matriz de recolección de datos, seguido por un minucioso proceso de ordenamiento para preparar las corridas de cada prueba de diagnóstico molecular, finalmente estas precauciones garantizan la integridad de las muestras y la precisión de los resultados obtenidos en este importante proceso de diagnóstico (García Lechuz, Sánchez Romero, González López, & Orta Mira, 2017), como se visualiza en el anexo 1.

Transporte de muestras:

El procedimiento de manejo de muestras se llevó a cabo con extrema precaución, las muestras son sometidas a un enfriamiento controlado mediante un empaque triple, comenzando por un contenedor primario con tapón de rosca, seguido de un contenedor secundario hermético que lleva una etiqueta de riesgo biológico, y finalmente un contenedor terciario que puede ser una caja de espuma o una hielera con una bolsa para congelar, e indispensable que las muestras lleguen al laboratorio en las próximas 24 horas para su procesamiento subsiguiente, por otro lado durante el transporte, las muestras se mantienen a temperatura ambiente por un máximo de cuatro horas (15-25 °C), y en caso de requerir refrigeración, pueden ser guardadas a temperaturas de 2 a 8 °C durante un período máximo de tres días, también los envases deben tener etiquetas de bioseguridad, si la muestra no se transfiere dentro del tiempo especificado, congelar a -70 °C (SCMI, 2020).

3.3 Manejo de la prueba POCT

El manual BioFire® (2022) ofrece información detallada sobre el proceso, el cual dura 1 hora debido a la preparación del cartucho y la calibración del equipo, inicialmente, se preparó el cartucho para hidratarlo y se procedió a preparar la mezcla, resaltando que el volumen es de 300 µL antes de cargar dicha mezcla, tras finalizar la qPCR, el instrumento efectuó un análisis de alta resolución de las curvas de fusión del ADN de los productos de la PCR, registrando el cambio en la señal de fluorescencia generada en cada pocillo, este análisis se basó en una torunda nasofaríngea al ser una prueba de RT-qPCR multiplex, tiene la habilidad de identificar

simultáneamente los ácidos nucleicos de 23 virus y bacterias distintos relacionados con infecciones respiratorias.

Materiales suministrados:

El manual BioFire® (2022), proporciona información sobre cada kit el cual suministra los reactivos necesarios para examinar 30 muestras y viene con distintos componentes esenciales, entre estos se incluyen cartuchos individuales de BioFire RP2.1plus, ampollas monouso con Sample Buffer, viales precargados color azul para inyección de hidratación para el uso en el equipo como se visualiza en el anexo 2, viales color rojo de uso único para inyección de muestra de y finalmente pipetas de transferencia selladas individualmente, el siguiente kit también incorpora una solución de lejía al 10% o un desinfectante equivalente, todos estos componentes fueron vitales para la realización y análisis de muestras de manera exacta y eficiente, asegurando resultados diagnósticos de confianza. Como se observa en el anexo 3.

Almacenamiento, manipulación y estabilidad de los reactivos:

Los materiales no se expusieron cerca de fuentes de calor o frío, así como de la luz solar directa para preservar su integridad, durante la realización de carga se trató de manejar temperaturas superiores a 40°C (104°F) antes de realizar las pruebas, ya que esto puede afectar su funcionamiento, por otro lado se conservó el cartucho en su envase hasta que la muestra esté lista para el análisis y una vez abierto, se realizó la carga lo antes posible preferiblemente en unos 30 minutos como máximo, para mantener la calidad de los componentes, se guardó el kit, tampones y cartuchos de reactivos en un lugar con temperatura ambiente entre 15°C y 25°C.

Requisitos de la muestra:

El manual BioFire (2022), presenta los requisitos para la recogida, preparación y manipulación de la muestra en la siguiente tabla 3:

Tabla 3 Almacenamiento de la muestra e indicaciones para su procesamiento.

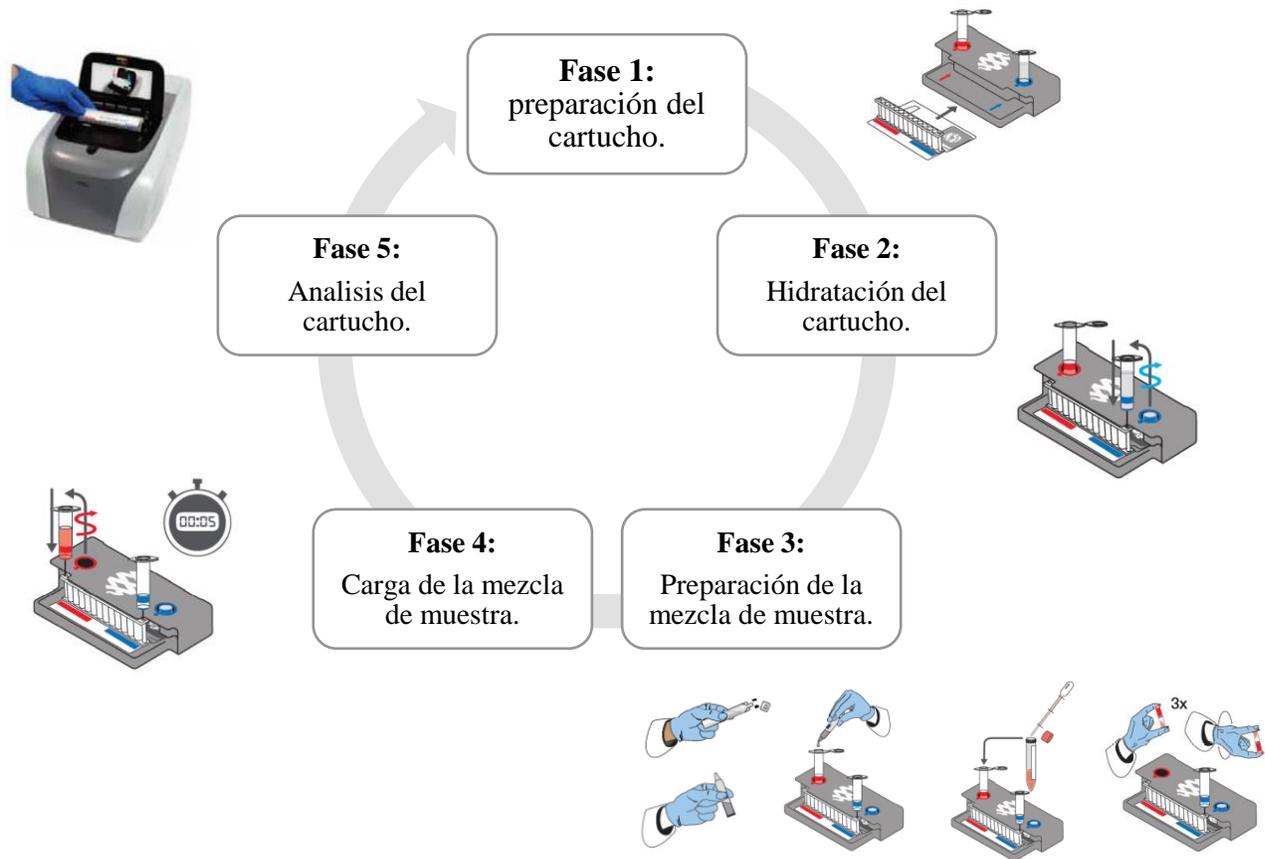
<i>Tipo de muestra</i>	La torunda nasofaríngea (NPS) fue recolectada siguiendo el procedimiento habitual explicado antes, para colocar rápidamente en un tubo que contiene un máximo de 3 mL de medio o solución salina normal.
<i>Volumen de la muestra mínimo</i>	0,3 mL (300 µL)

Fuente: Los autores, 2023.

Procedimiento:

Según el manual BioFire (2022), es importante usar guantes limpios y otros equipos de protección individual (EPI) al manipular los cartuchos y las muestras, como se detalla en la figura 14.

Figura 14 Diagrama de procesamiento del sistema POCT.



Fuente: Los autores, 2023.

Luego del tiempo parametrizado se observó los resultados del procesamiento de la prueba POCT como se visualiza en el anexo 4.

3.4 Manejo de la prueba RT-qPCR

Materiales y reactivos de la PCR:

Para esta técnica se utilizan algunas materiales y reactivos comunes utilizados en la extracción de material genético como lo son el ARN o ADN, como se observa en el anexo 5 y a continuación, se detalla su uso en el proceso:

Durante el proceso de extracción y purificación de ácidos nucleicos, se usó un buffer de elución con componentes como α -D-manopiranosido y α -D-glucopiranosido para liberar ácidos nucleicos, para proteger el material genético de degradaciones, se añadió proteinasa K y un buffer de lisis enriquecido para romper membranas celulares y optimizar la extracción de ARN de alta calidad. Tras esto, un buffer de lavado eliminó contaminantes y perlas magnéticas micrométricas se emplearon para facilitar la extracción y asegurar la pureza del material genético (Rodríguez González, y otros, 2023). Finalmente, los primers específicos para los genes E, RdRP y N del virus fueron empleados para facilitar la amplificación precisa de estas regiones durante la PCR, y para garantizar y validar la precisión de la reacción de PCR, se incluyeron controles internos, positivos y negativos, también se compuso un Máster Mix para la PCR, como se ve en la figura 15, que contenía todos los reactivos esenciales, incluida la transcriptasa inversa y los dNTPs, permitiendo la ejecución adecuada de la reacción.



Figura 15 Kit de detección SARS-CoV-2 para la RT-qPCR.

Fuente: (Bionovabolivia, 2023)

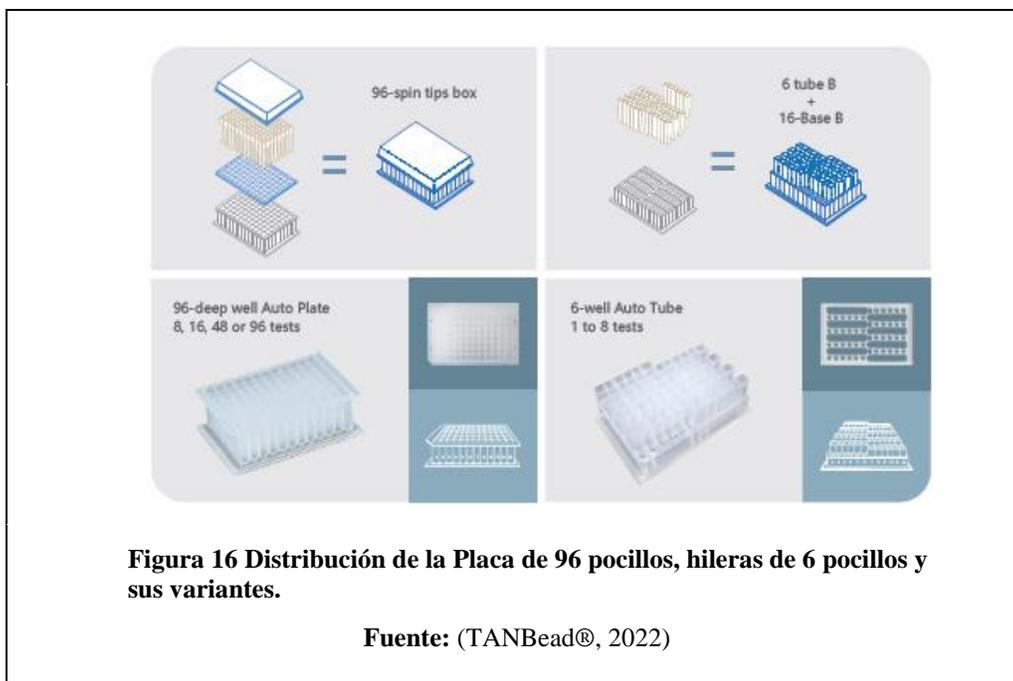
Materiales exclusivos del equipo

En la tabla 4 y figura 16 se describe los materiales que utiliza el equipo de extracción:

Tabla 4 Descripción de materiales del equipo Maelstrom 9160.

<i>Nombre</i>	<i>Formato</i>	<i>Descripción</i>	<i>Figura</i>
Placa de 96 pocillos profundos. Diseño único de enganche	Placa de Pocillos	Volumen de procesamiento 50 µl-1600 µl Ampliamente utilizado para diagnóstico molecular.	
Caja de 96 puntas de pipeta. Diseño único de enganche	Placa de pocillos	96 piezas de tamaño mediano (forma de bolígrafo) puntas en una caja	
Hileras de pocillos de 6 posiciones	Hileras de pocillos	Paquete especial para un grupo grande o pequeño de pruebas Residuos mínimos de consumibles. Sin pérdida de reactivo.	
Hileras de pocillos de 16 posiciones	Hileras de pasillos	Incorporan para un pequeño número de pruebas.	
Puntas	Placa de pocillos Hileras de pocillos	Un diseño único al máximo eficiencia de mezcla.	

Fuente: (TANBead®, 2022)



Software de manejo del equipo:

Se conectó el equipo directamente al computador usando un cable USB y se ingresó con credenciales de supervisor, se ejecutó en el PC el software del equipo Maelstrom 9160 Master, iniciando el programa “TANBead Maelstrom 9160 Master”, una vez abierto, se hizo clic en “Program Editing” para acceder, en donde se eligió un espacio vacío y se pulsó “Edit” para crear un nuevo documento. Posteriormente, se hizo clic en cargar un nuevo archivo de programa.

Se seleccionó un archivo nuevo para su importación y luego se presionó "abrir", para después de cargar el documento, y luego se pulsó "next", acto seguido, se hizo clic en "import to" para llevar a cabo la ejecución de lo que se había importado, surgió una ventana en la que se confirmó la opción de guardar datos de diálogo, finalmente el programa quedó listo para su uso.

Extracción de ácidos nucleicos:

Se siguieron las indicaciones de TANBead (2022) se preparó los Auto Tube (placas de reacción) insertándolos adecuadamente en la base, a continuación, se tomó con la micropipeta 300 μL de suspensión de suero o PBS y 10 μL de Proteinasa K en los pocillos, posteriormente se utilizó la

micropipeta para trasladar el ácido nucleico ya purificado desde los pocillos de la columna a una nueva placa de reacción para seguir con la RT-qPCR, los Auto Tubes y las tiras utilizadas se depositaron en el contenedor destinado al reciclaje de residuos.

La técnica empleada se fundamentó en el manual de Seegene (2020), para lo cual se realizó el siguiente procedimiento, para el equipo Maelstrom 9610 se utilizó la técnica de perlas magnéticas para extraer el ARN viral, una vez completada esta extracción, se preparó la RT-qPCR usando un termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad), en una placa de reacción, se colocaron la muestra, controles, el máster mix y los cebadores, para la detección de fluorescencia, se empleó los fluoróforos FAM, HEX, CalRed y Quasar 670, que identificaron secuencias específicas para coronavirus y sus variantes en los genes S, N y RdRP, así como para VSR, Flu A y Flu B, todo el procedimiento tomó un lapso de tres horas.

Preparación PCR:

Una vez obtenidos los ácidos nucleicos, se preparó una nueva placa de reacción, se prepararon los controles internos, los cebadores y la máster mix, en cada pocillo, se añadieron 10µL de muestra, 10µL de cebadores y 10µL de máster mix, finalmente se insertó la placa de reacción en el termociclador y se dejó por 1 hora.

En el procesamiento y preparación de la PCR, se emplearon microplacas de PCR Hard-Shell (Bio-Rad), como se observa en la figura 17, estas placas contaban con un diseño patentado de dos componentes, fueron diseñadas para prevenir deformaciones, asegurando un posicionamiento preciso en la automatización, además las letras y números negros en los márgenes de la placa facilitaron su identificación, durante todo el proceso se comprobó que estas placas eran compatibles con técnicas de sellado por calor, presión y adhesivo lo cual facilitó su uso. El equipo posee en su configuración programada los siguientes parámetros como lo son temperatura, tiempo y número de ciclos como se puede observar en el anexo 8.



Luego de cumplir los parámetros estandarizados, el termociclador detectará señales de fluorescencia producidas por los amplicones generados como se observa en el anexo 7

3.5 Selección y registro de datos

Se realizó la recolección de datos de 60 pacientes de manera aleatoria para la especificidad y el análisis estadístico; que cumplieron con criterios de inclusión, donde se detectó al menos uno de los 4 microorganismos (Influenza A y B, Virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2), se sometieron a ambas pruebas RT-qPCR y Sistema POCT para la detección de los virus, las pruebas fueron procesadas el mismo día.

3.6 Variables de investigación

Para el almacenamiento de datos se determinó tales como la edad al momento de la toma de la muestra, el sexo, u otras variables que se consideren importantes de correlacionar al momento de analizar los casos de virus detectados. Para lo cual, se enlistó un grupo de variables que se muestran en la tabla 5, que se consideraron las más relevantes para diseñar una matriz en la que se levanten los datos de los pacientes. De las variables 7 a la 14, corresponden al dato binario positivo/negativo que se registró de cada individuo según el resultado de cada prueba.

La matriz utilizada contó con 60 registros, 17 variables que se distribuyen en: 3 de codificación del paciente y su diagnóstico, 1 variable cuantitativa, 2 de fecha, 9 variables cualitativas y 2 de texto.

Tabla 5 Variables de la matriz de recopilación de datos.

<i>N°</i>	<i>Nombre de variable</i>
1	Codificación paciente
2	Historia clínica
3	Fecha de recepción de muestra
4	Fecha de procesamiento
5	Sexo
6	Edad (días, meses u año)
7	SARS-CoV-2 (PCR)
8	Influenza A (PCR)
9	Influenza B (PCR)
10	Virus Sincitial Respiratorio (PCR)
11	SARS-CoV-2 (POCT)
12	Influenza A (POCT)
13	Influenza B (POCT)
14	Virus Sincitial Respiratorio (POCT)
15	Observaciones
16	Código CIE
17	Sintomatología asociada con el paciente, evolución, diagnósticos.

Fuente: Los autores, 2023

Variables:

En la tabla 6 se recopila los datos relevantes para la investigación de manera resumida:

Tabla 6 Variables sometidas a estudio.

<i>Variables dependientes</i>	Resultados positivos y negativos de qPCR y POCT
<i>Variables independientes</i>	Sexo, edad, RT-qPCR, Sistema POCT, virus
<i>Variables intervinientes</i>	Tiempo, tipo de muestra
<i>Numero de Muestra</i>	60

Fuente: Los autores, 2023

A continuación, se muestra en la tabla 7 un ejemplo de la matriz diseñada para la recopilación de datos:

Matriz de recolección:

Tabla 7 Matriz de recolección de datos para el estudio.

<i>Identificación*</i>	<i>Historia Clínica*</i>	<i>Fecha*</i>	<i>Sexo*</i>	<i>Edad*</i>
A2	1992653	3/4/2023	M	5 años 9 meses 11 días
A3	2023857	4/4/2023	M	8 años 7 meses 3 días
A5	1477097	4/4/2023	F	33 años 8 meses 25 días
A6	2024041	4/4/2023	F	8 meses 11 días
A46	1631502	29/5/2023	M	9 años 9 meses 21 días
A51	787596	31/5/2023	F	46 años 6 meses 22 días

**Valores reales. Algunos datos propuestos para el estudio.*

Fuente: Los autores, 2023

En la tabla 8 se presentan los datos más destacados de la matriz de recolección dentro de la misma también se encuentran los cuatro virus sometidos a estudio con el marcaje de cuales fueron detectados para cada tipo de prueba, además de la sintomatología asociada con el paciente, evolución, diagnósticos, código CIE y observaciones.

3.7 Tratamiento de datos

Los datos fueron digitados y convertidos en un nuevo formato según el análisis correspondiente, de las variables que registran los virus detectados en cada prueba molecular, se asignó su respuesta de “positivo o negativo” por “uno” (1) o “cero” (0) con el objetivo de poseer datos que fueron analizados en Microsoft Excel.

3.8 Parámetros para determinar especificidad

Se describe como especificidad a la capacidad que tiene una prueba para diferenciar aquellos que tienen una enfermedad, y se define como la cantidad de individuos que tienen negativo a la prueba y que no poseen la enfermedad, entre la cantidad de personas que no poseen la enfermedad, o sea, están sanos (Donis, 2012), como se observa en la tabla 8

Una prueba con alta especificidad minimizará el número de falsos positivos, es decir, personas que no tienen la enfermedad pero que la prueba indica erróneamente que sí la tienen por ello la necesidad de determinar su capacidad para diagnósticas de manera correcta. Además del uso de una tabla tetracórica o de contingencia ampliamente utilizada en el área de salud para relacionar dos o más variables de naturaleza cualitativa (Álvarez & Pérez, 2009).

Tabla 8 Especificidad, variables que maneja y su fórmula.

<i>Descripción</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Referencia</i>
Especificidad: donde “d” es el individuo no tiene la enfermedad y el test es negativo y “b” dice que el paciente tiene la enfermedad, pero el resultado del test es negativo.	$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D}$ $\text{Especificidad} = \frac{D}{\text{sanos}}$	(Pértegas & Pita, 2003) (Bravo & Cruz, 2015)

Fuente: Los autores, 2023.

Según Bravo y Cruz en el (2015) en su estudio sobre la exactitud diagnóstica describen los parámetros utilizados en la medición de especificidad siendo estos los siguientes:

Verdadero negativo: el individuo no tiene la enfermedad y el test es negativo.

Falso negativo: el individuo tiene la enfermedad, pero el resultado del test es negativo.

Sanos: la suma entre los verdaderos negativos y falsos negativos pacientes sin la enfermedad (sanos).

3.9 Análisis estadístico

Existen diversos métodos estadísticos para analizar datos según su naturaleza y objetivo. A continuación, se describen de las técnicas que fueron utilizadas en esta investigación. El uso de tablas de frecuencias, diagrama de barras y uso de proporciones entre positivos y negativos para cada prueba y por virus, además de variables como sexo y edad que graficadas mediante las técnicas antes mencionadas permitieron complementar de manera gráfica y determinar las relaciones entre estos datos con respecto a la especificidad.

Capítulo 4 Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los datos, las estadísticas básicas de los individuos a los que se les aplicó las pruebas, y posteriormente se analizó los resultados consolidados de las pruebas PCR y POCT.

4.1 Análisis de datos

Los resultados de las pruebas fueron agrupados de acuerdo con la cantidad de positivos y negativos por prueba y por virus; destacando las proporciones detectadas por virus además de la especificidad determinada para su análisis y contrastando diferencias que tengan relevancia, las cantidades detalladas en la tabla 9 representan los resultados de las muestras nasofaríngeas tomadas.

En un estudio reciente realizado por Nguyen (2022), se buscó evaluar la habilidad de la técnica RT-PCR para identificar el SARS-CoV-2 en pacientes utilizando dos tipos de muestras: un hisopado nasofaríngeo y un lavado bronco alveolar, la meta principal era discernir la concordancia entre los resultados derivados de ambos métodos de muestreo, los resultados demostraron que el hisopado nasofaríngeo es un método confiable y eficiente para detectar SARS-CoV-2, enfatizando la importancia de las muestras nasofaríngeas, ya que los virus relacionados con los coronavirus suelen estar presentes en altas cantidades en las mucosas externas, lo que facilita su detección. Por tal razón, en nuestro estudio, optamos por utilizar hisopados nasofaríngeos, esta metodología no sólo es eficaz en términos de detección, sino que también es menos invasiva y más fácil de realizar en comparación con otros métodos como el lavado bronco alveolar, además, su alta confiabilidad garantiza la precisión en la detección del virus, lo que es fundamental para la implementación de medidas preventivas y terapéuticas.

Tabla 9 Resultados cualitativos de pruebas sometidas a estudio.

<i>Virus/Prueba</i>	<i>RT-qPCR</i>		<i>POCT</i>	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
<i>SARS-CoV-2</i>	8	52	8	52
<i>Influenza A</i>	6	54	10	50
<i>Influenza B</i>	1	59	1	59
<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	12	48	13	47

Fuente: Los autores, 2023.

Las pruebas analizadas dieron los siguientes resultados:

- Para el virus SARS-CoV-2 en ambos ensayos fueron iguales con 8 positivos detectados - 52 negativos.
- Para el virus Influenza B en ambos ensayos tuvieron el mismo resultado, 1 positivo detectado - 59 negativos.
- Para el virus Influenza A en el ensayo de RT-qPCR se obtuvo 6 positivos detectados - 54 negativos, para el ensayo de Sistema POCT se obtuvo 10 positivos detectados - 50 negativos.
- Para Virus Sincitial Respiratorio en el ensayo de RT-qPCR se obtuvo 12 positivos detectados - 48 negativos y para el ensayo de Sistema POCT se obtuvo 13 positivos detectados - 47 negativos.

4.2 Resultados obtenidos por prueba

Resultados por RT- qPCR.

Los resultados positivos obtenidos de la prueba se detallan a continuación:

Tabla 10 Frecuencia donde se detectó cada virus en la prueba de RT-qPCR.

<i>Resultado de la prueba</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>	<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	<i>SARS-CoV-2</i>
<i>Positivo</i>	6	1	12	8
<i>Negativo</i>	54	59	48	52
<i>Total de muestras</i>	60	60	60	60

Fuente: Los autores, 2023.

Tabla 11 Porcentaje de casos en los que se detectó cada virus en la prueba RT-qPCR.

<i>Resultado de la prueba</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>	<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	<i>SARS-CoV-2</i>
<i>Positivo</i>	10%	2%	20%	13%
<i>Negativo</i>	90%	98%	80%	87%
<i>Total de muestras</i>	100%	100%	100%	100%

Fuente: Los autores, 2023.

En las Tablas 10 y 11, los resultados por columnas representan los totales en porcentajes de casos en los que se detectó el virus, obteniendo al menos 1 caso detectado en las personas sometidas a estudio.

- VRS (Virus Respiratorio Sincitial): Casos positivos detectados 20% de los individuos.
- SARS-CoV-2: Casos positivos detectados 13% de los individuos.
- Influenza A: Casos positivos detectados 10% de los individuos.
- Influenza B: Casos positivos detectados 2% de los individuos (1 caso de 60 personas).

Resultados por POCT.

Los resultados obtenidos de la prueba se detallan a continuación:

Tabla 12 Frecuencia de casos donde se detectó cada virus en el sistema POCT.

<i>Resultado de la prueba</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>	<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	<i>SARS-CoV-2</i>
<i>Positivo</i>	10	1	13	8
<i>Negativo</i>	50	59	47	52
<i>Total de muestras</i>	60	60	60	60

Fuente: Los autores, 2023.

Tabla 13 Porcentajes de casos en los que se detectó cada virus en el sistema POCT.

<i>Resultado de la prueba</i>	<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>	<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	<i>SARS-CoV-2</i>
<i>Positivo</i>	17%	2%	22%	13%
<i>Negativo</i>	83%	98%	78%	87%
<i>Total de muestras</i>	100%	100%	100%	100%

Fuente: Los autores, 2023.

Las Tablas 12 y 13 presentan los resultados de cada virus por porcentaje de casos, en el sistema POCT hubo más casos de virus detectados en comparación a PCR. Existió 10 casos de la Influenza tipo A, 4 casos más que en RT-qPCR, que corresponden a un valor de 17%, y 13 casos del VRS, 1 más que en RT-qPCR, con un valor respectivo de 22%. Para los virus de la Influenza B y SARS-CoV-2 los valores detectados mediante el sistema POCT fueron iguales que con la prueba RT-qPCR con valores de 13% y 2% respectivamente.

Tabla 14 Porcentajes de resultados del Sistema POCT y RT-qPCR.

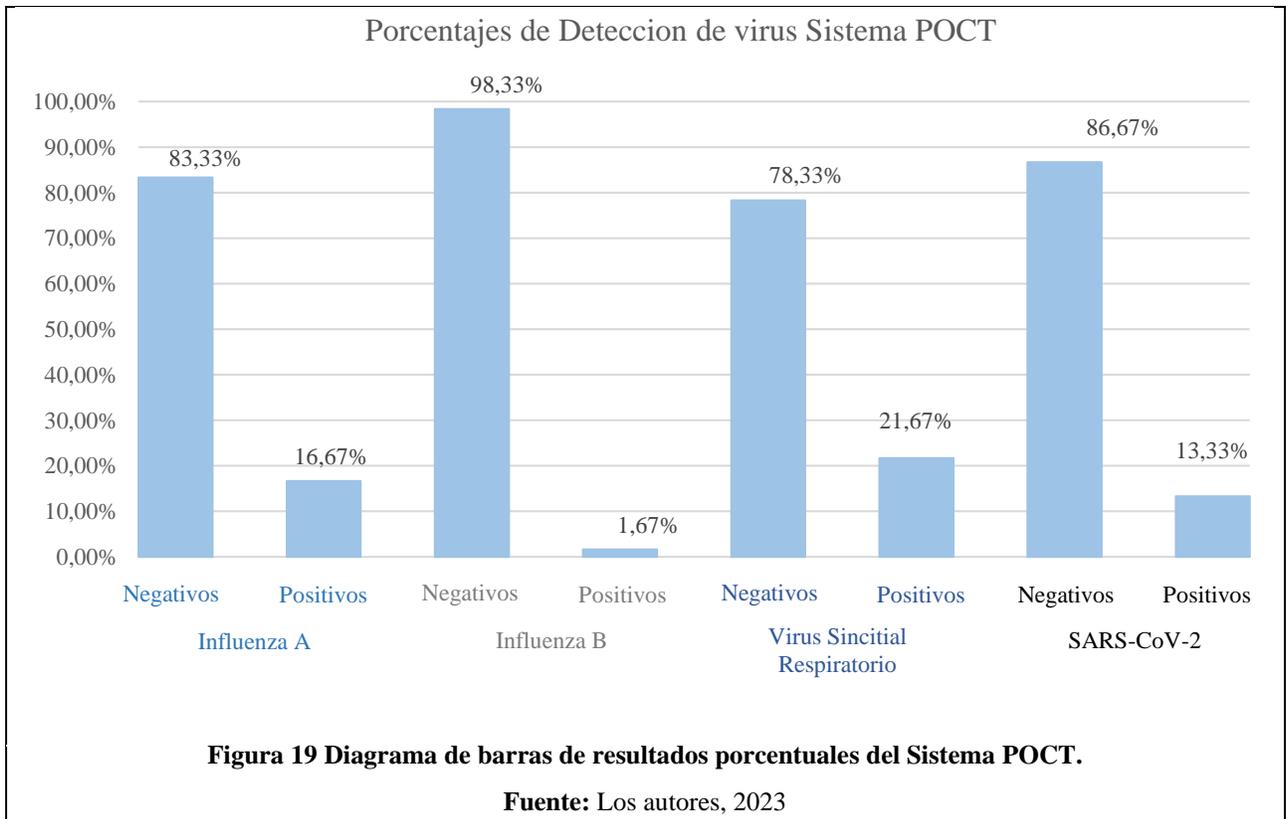
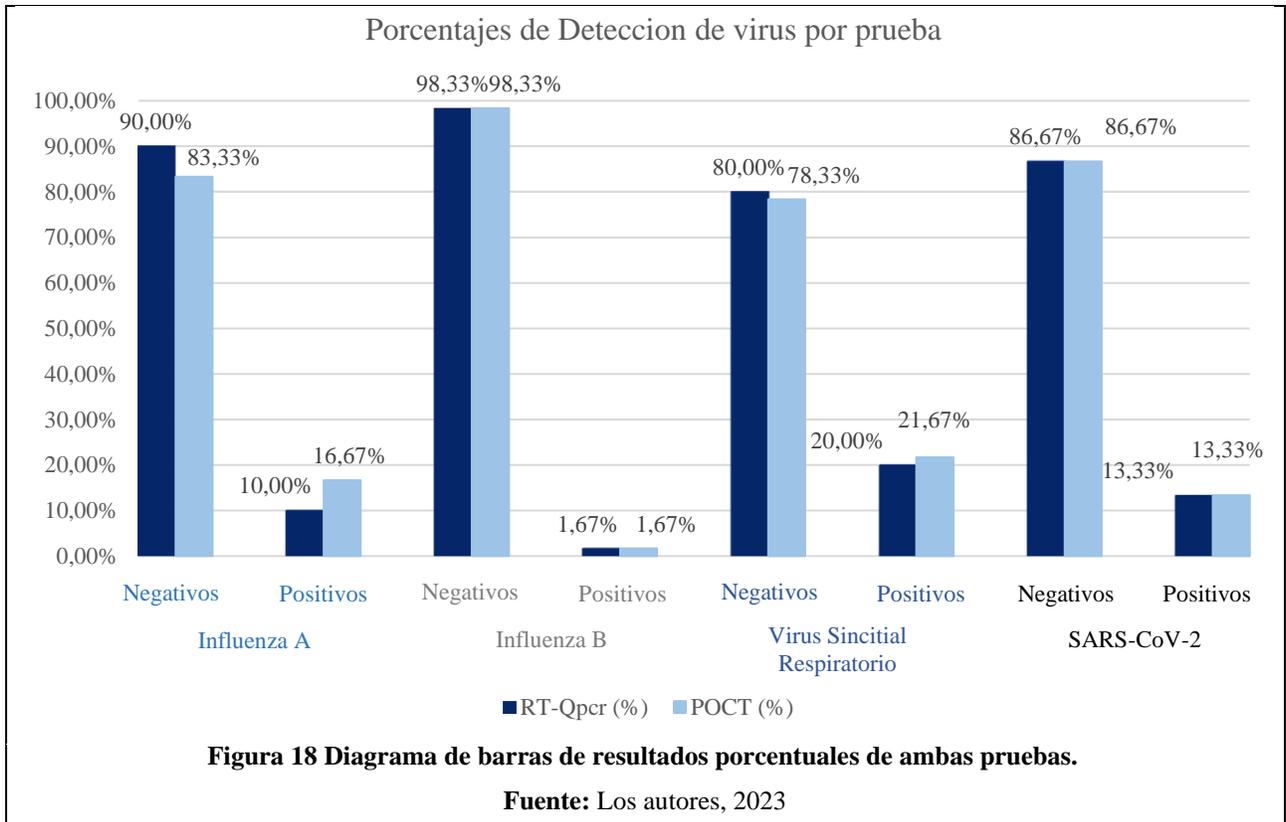
		<i>RT-qPCR (%)</i>	<i>POCT (%)</i>
<i>SARS-CoV-2</i>	Negativos	86,67%	86,67%
	Positivos	13,33%	13,33%
<i>Influenza A</i>	Negativos	90,00%	83,33%
	Positivos	10,00%	16,67%
<i>Influenza B</i>	Negativos	98,33%	98,33%
	Positivos	1,67%	1,67%
<i>Virus Sincitial Respiratorio</i>	Negativos	80,00%	78,33%
	Positivos	20,00%	21,67%

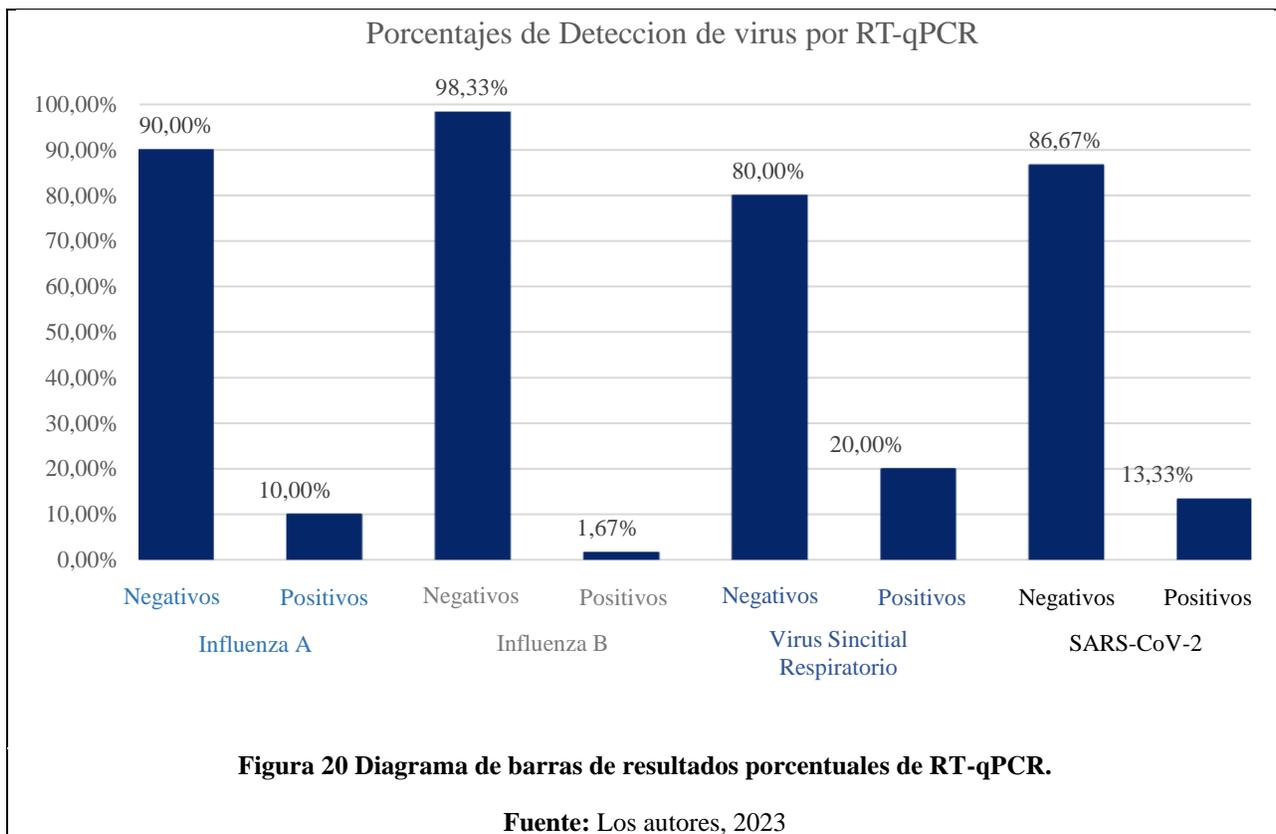
Fuente: Los autores, 2023.

La tabla 14 recopila los valores en porcentajes de ambas pruebas, por virus de detección sobre los 60 pacientes sometidos a estudio; en la figura 18 se puede visualizar la variación de porcentajes por virus mediante barras, donde se obtuvieron los siguientes resultados:

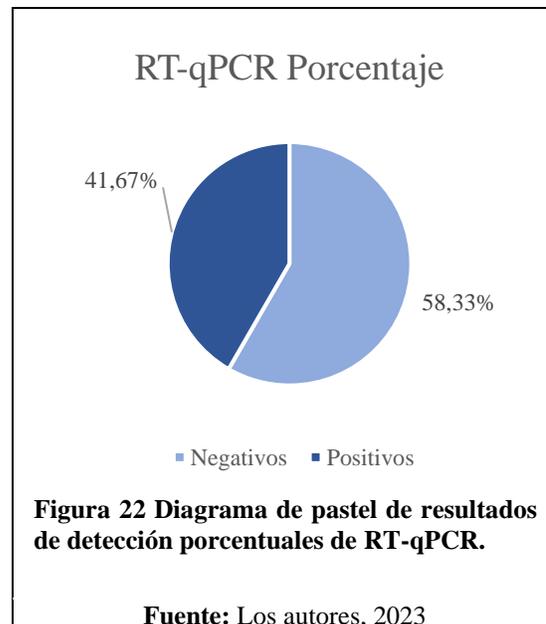
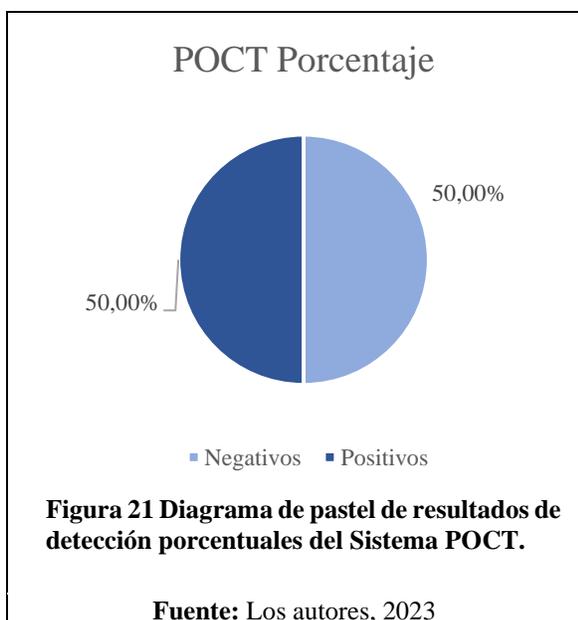
- Para SARS-CoV-2 los porcentajes fueron iguales 86,67% negativos - 13,33% positivos.
- Para Influenza B valores de 98,33% negativos - 1,67% positivos obteniendo los mismos resultados.
- Para Influenza A corresponden a 90% negativos - 10% positivos para la prueba de RT-PCR y valores de 83,33% negativos - 16,67% positivos para el sistema POCT.
- Para VRS corresponden a 80% negativos - 20% positivos para la prueba de RT-qPCR y valores de 78,33% negativos - 21,67% positivos para el sistema POCT.

En un estudio de Carballal y colaboradores (2015) , realizaron la detección de positividad mediante la IF (inmunofluorescencia) y RT-PCR la cual fue del 75%, mientras que por PR-FilmArray alcanzó el 92% , estos resultados contrastan con el estudio actual, las diferencias en magnitud y porcentajes de positividad se debe a que el estudio analizó 315 muestras que abordaban 9 virus, mientras que en el Laboratorio de Genética y Molecular del Hospital se examinó 60 muestras y 4 virus, los mismos que se detallan en forma de grafico de barras en la figura 19 para el sistema POCT y figura 20 para la técnica RT-qPCR. Ambos estudios ofrecen hallazgos relevantes para las técnicas de detección molecular, como el sistema POCT.





Con la información recopilada en el estudio se consolidó los resultados de los cuatro virus sometidos a estudio en positivos y negativos, como se observa en la figura 21 para el sistema POCT y en la figura 22 para la RT-qPCR, se dividió los datos de acuerdo con la prueba aplicada obteniendo los siguientes porcentajes para RT-qPCR valores de 41,64% negativos - 58,33% positivos; por otro lado, para el sistema POCT valores de 50% para positivos y negativos.



Se investigaron en varias bases de datos análisis porcentuales realizados en virus que causan enfermedades respiratorias, se evidenció que existe una escasa información acerca de estudios realizados sobre un determinado grupo de personas donde el enfoque sea sobre la técnica de RT-qPCR y sistema POCT como prueba confirmatoria en casos vigentes sobre los virus de la Influenza A y B, virus sincitial respiratorio y SARS-COV-2, por lo cual los resultados obtenidos se compararon con el análisis del estudio realizado en un Hospital pediátrico (2009) en el cual se utilizaron 124 aspirados nasofaríngeos de 108 lactantes con afecciones respiratorias de vías bajas, se encontró que el 16,12% (20 muestras) dieron positivo al hMPV (metapneumovirus humano) mediante la IFD (inmunofluorescencia directa), el 21,77% (27 muestras) mediante el EIA (enzimoinmunoanálisis), y el 19,73% (15 muestras) mediante cultivo, finalmente las pruebas de detección de antígeno resultan valiosas para el diagnóstico de infecciones agudas por hMPV obtenidas de hospitales pediátricos sin acceso a técnicas de amplificación viral inmediatas, siendo importante notar que la IFD es más eficaz en un temprano padecimiento de la infección.

4.3 Análisis univariado evaluación detallada de las muestras individuales recopiladas por prueba

a) Sexo de los pacientes.

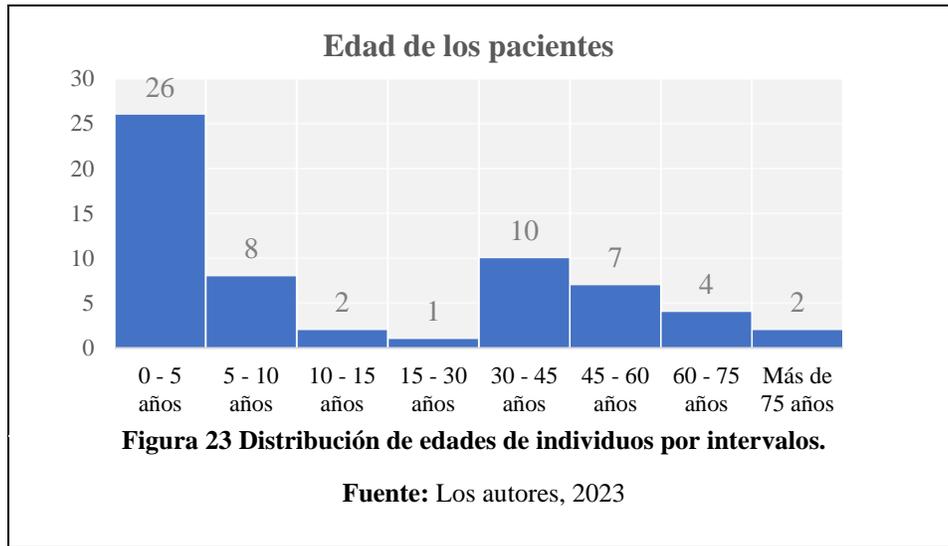
Tabla 15 Distribución de detectados por sexo.

	<i>Sexo</i>	<i>Cantidad</i>	<i>%</i>
<i>Positivos</i>	F	15	25%
	M	15	25%
<i>Negativos</i>	F	18	30%
	M	12	20%
<i>Total</i>		60	100%

Fuente: Los autores, 2023

En las 60 personas investigadas, 33 fueron mujeres y 27 hombres, en la tabla 15 se detalla el porcentaje de muestras positivas y negativas divididas por sexo, donde se representa con un 25% de detectados positivos en hombres y mujeres, concluyendo que la incidencia de positividad de infección no depende del género femenino o masculino del paciente, estos resultados se comparan con el estudio realizado por Mosquera y otros (2021) dónde mencionan que el Ministerio de Salud Pública de Ecuador, entre el 21 de febrero de 2020 y el 09 de julio de 2021, registró cifras de 467.073 pacientes de COVID-19 confirmados mediante RT-PCR, con 21.803 muertes de estas, el 64,78% eran hombres y el 35,22% mujeres. El análisis estadístico mostró que ser hombre era un factor de riesgo para morir por COVID-19, representado con un valor OR de 1,746; $p < 0,0001$. Esta tendencia se observó en el 80% de las provincias ecuatorianas, la disparidad entre sexos en el riesgo de muerte se evidenció especialmente en personas mayores de 20 años, siendo los hombres los más afectados en comparación con las mujeres. Ambos resultados presentan diferencias, sin embargo, hay que tomar en cuenta la cantidad de muestras y el año en el que se realizó el estudio, en el 2021 existió un rebrote de COVID-19 y la presencia de infectados fue elevado en comparación al 2023.

b) Edad de los pacientes.



El intervalo de los pacientes analizados va desde una niña de 2 meses de edad hasta un hombre de 91 años (el máximo). En la figura 23 se puede visualizar la distribución de los pacientes sometidos a estudio por intervalos dónde se observa qué la menor cantidad de pacientes se encuentra en la edad de 15 a 30 años y la mayor cantidad de pacientes se encuentran en el intervalo de 0 a 5 años, en este intervalo se encuentra la mayor cantidad de pacientes positivos como se detalla en la tabla 16.

La susceptibilidad, manifestación y severidad de muchas infecciones virales pueden variar significativamente entre diferentes grupos etarios, los sistemas inmunológicos de jóvenes y ancianos pueden responder de manera distinta a un virus, influenciando tanto en la eficacia de posibles tratamientos como en la mortalidad asociada, además, entender la relación entre la edad y la respuesta viral puede guiar estrategias de vacunación, identificando a poblaciones prioritarias, así mismo, permite diseñar intervenciones preventivas más efectivas y adaptadas a las necesidades específicas de cada grupo de edad, por ello la importancia de realizarlo en el estudio (Martín Peinador, Jiménez Alés, Suárez Rodriguez, & Berghezan Suarez, 2016).

Tabla 16 Distribución de Edades por prueba.

<i>Edad en años</i>	<i>RT-qPCR</i>				<i>POCT</i>			
	<i>Positivos</i>	<i>%</i>	<i>Negativos</i>	<i>%</i>	<i>Positivos</i>	<i>%</i>	<i>Negativos</i>	<i>%</i>
0-5	16	27%	10	17%	18	30%	8	13%
5-10	2	3%	6	10%	3	5%	5	8%
10-15	1	2%	1	2%	1	2%	1	2%
25-30	1	2%	0	0%	1	2%	0	0%
30-35	0	0%	4	7%	0	0%	4	7%
35-40	1	2%	2	3%	2	3%	1	2%
40-45	2	3%	1	2%	2	3%	1	2%
45-50	0	0%	2	3%	0	0%	2	3%
50-55	2	3%	1	2%	2	3%	1	2%
55-60	0	0%	2	3%	0	0%	2	3%
60-65	0	0%	2	3%	0	0%	2	3%
70-75	0	0%	1	2%	0	0%	1	2%
85-90	0	0%	1	2%	0	0%	1	2%
90-95	0	0%	2	3%	1	2%	1	2%
	25	42%	35	58%	30	50%	30	50%

Fuente: Los autores, 2023

De acuerdo con la información detallada anteriormente, se presentó una alta incidencia de positividad de 27% y 30% para la prueba de RT-qPCR y sistema POCT respectivamente en el intervalo de niños de hasta 5 años. El siguiente grupo con mayor incidencia fue en pacientes de 5 a 10 años representando un 8% de positividad para ambas pruebas. El análisis comparativo de resultados es recomendable hacerlo con investigaciones realizadas con la misma estación y meses dónde se tomaron las muestras para que los resultados puedan tener relación entre sí, debido a la falta de investigaciones en este ámbito, los datos obtenidos se compararon con la investigación realizada por Herrera y otros (2022) se encontró que la gravedad de la COVID-19 aumentaba con la edad, siendo especialmente notable en pacientes mayores, el umbral crítico se estableció en 71,5 años, a partir de los 70 años, se notó un aumento en comorbilidades, alteraciones en pruebas de laboratorio, síntomas más severos, más tiempo en el hospital y un mayor número de muertes, la

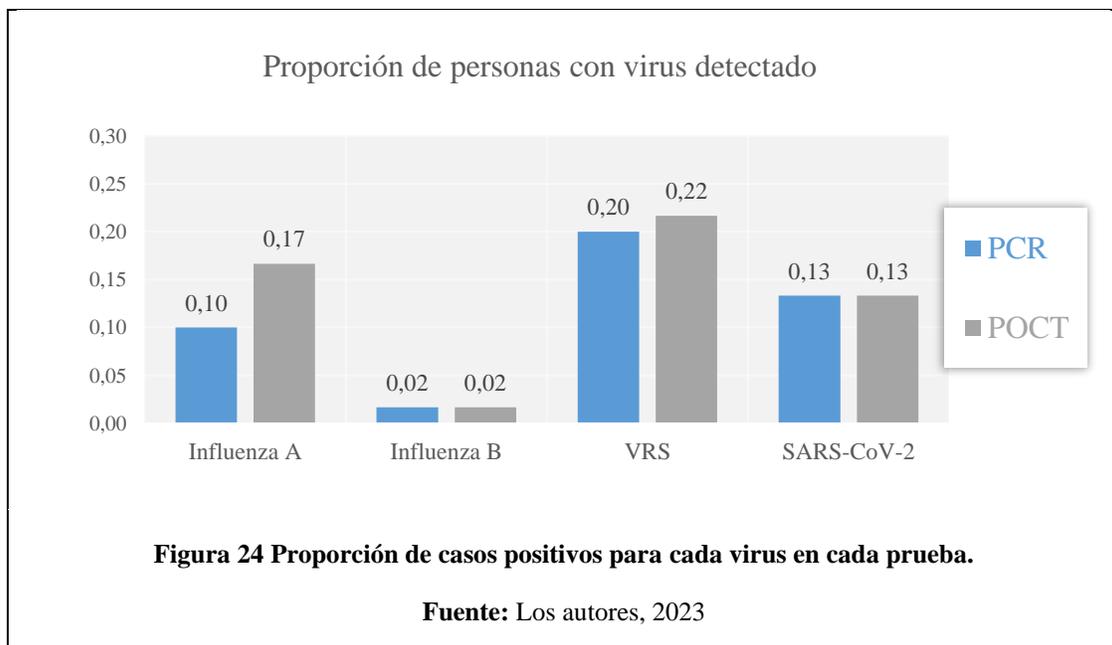
edad se identifica como un factor determinante en la severidad de la enfermedad, particularmente a partir de los 70 años, donde varios factores, sumados a la avanzada edad, afectan negativamente el desenlace de la enfermedad. Estos datos tienen una baja concordancia con nuestros resultados obtenidos debido a que durante el período en que se recopilaron las muestras, observamos una afluencia predominante de pacientes en el rango de edad de 0 a 10 años en el Hospital Teodoro Maldonado Carbo.

Independencia de variables

No se halló relaciones bivariadas entre las variables Sexo, Edad y las de los virus. Por lo tanto, no fue necesario realizar pruebas de independencia entre variables.

4.4 Análisis comparativo de los resultados de las pruebas PCR y POCT

A continuación, se muestran las proporciones correspondientes únicamente a los resultados positivos de cada virus, es esencial destacar que estas proporciones no equivalen a 1, esto se debe a que no reflejan la relación del virus respecto al conjunto total de los pacientes sometidos a estudio. En la figura 24 se visualiza la eficacia de cada prueba para identificar un virus específico, sin tener en cuenta la posible detección de otros virus en la misma muestra.



Se determina que ambas pruebas detectaron positivamente el virus SARS-CoV-2 en la misma proporción, lo mismo se presentó para el virus de Influenza B. En el caso del virus de Influenza A la proporción de muestras detectadas positivas para RT-qPCR fue 0,10 y 0,17 para el sistema POCT evidenciando que esta última técnica detectó en mayor proporción los casos positivos a comparación de RT-qPCR. Con respecto a la detección del SARS-CoV-2, causante del COVID-19, varios estudios han enfatizado la relevancia de las pruebas rápidas (POCT), un artículo del Grupo ECZA de la Facultad de Ciencias de la Salud Bogotá, en 2020, resalta el desarrollo de métodos rápidos de laboratorio que reducen el tiempo de diagnóstico y los riesgos de contagio, estas técnicas incluyen ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) y pruebas de inmunocromatográfica con partículas de oro coloidal (Zhu, y otros, 2020).

4.5 Especificidad de las pruebas

La especificidad asegura que nuestros hallazgos reflejen de manera precisa y fiable la capacidad de la prueba para identificar correctamente a los individuos sanos y, por ende, minimizar la probabilidad de obtener falsos positivos. Este indicador es el parámetro principal del presente estudio, acorde a la investigación realizada por Bravo et al. (2015) y Rendón et al. (2020) dónde llevaron a cabo análisis con el objetivo principal de establecer bases sólidas para la comprensión y estudios centrados en la precisión diagnóstica. Los atributos de sensibilidad y especificidad, fundamentales en este contexto, son características intrínsecas de la prueba diagnóstica en cuestión y determinan su aplicabilidad en decisiones clínicas para pacientes específicos. Es vital reconocer que, dependiendo del grupo de pacientes al que se apliquen, estos atributos pueden estar sujetos a ciertos sesgos, lo cual podría influir en los resultados de estudios relacionados, se detalla los cálculos empleados en el anexo 8 para la prueba RT-qPCR y sistema POCT.

A partir del análisis de los resultados de los datos según el sexo, edad y porcentaje de incidencia se puede determinar la especificidad de cada prueba detallada a continuación:

RT-qPCR.

Tabla 17 Especificidad RT-qPCR.

		Especificidad (Asumiendo POCT como dato real)	
		RT-qPCR	
		POCT	
Resultado detecta virus		Positivo	Negativo
RT- qPCR	Positivo	25	0
	Negativo	5	30
	Total general	30	30

Fuente: Los autores, 2023

Tomando el diagnóstico de POCT como dato real, la especificidad de PCR es $30/30 = 100\%$. La tabla 17 presenta datos del sistema POCT divididos entre pacientes categorizados como "Positivos" y "Negativos", dispuestos verticalmente en columnas y horizontalmente, se muestran los resultados de "Positivo" y "Negativo" obtenidos a través de la RT-qPCR en donde el sistema POCT se considera como la "prueba de oro" o estándar de referencia. Para determinar la especificidad de la RT-qPCR, se segmentó el número de verdaderos negativos (pacientes sanos que dieron negativo en la prueba) con el total de pacientes sanos, de esta comparación. En la investigación realizada por Busquets y otros (2018) destacaron la importancia de detectar y cuantificar con precisión el material genético viral en la salud pública e investigación médica y subrayaron la alta sensibilidad y especificidad de la RT-PCR en tiempo real para detectar virus gripales en muestras respiratorias, señalando su capacidad para identificar incluso cargas virales bajas y casos asintomáticos.

POCT.

Tabla 18 Especificidad sistema POCT.

		Especificidad		POCT
		(Asumiendo RT-qPCR como dato real)		
		RT-qPCR		
		Resultado detecta virus		
			Positivo	Negativo
POCT	Positivo		25	5
	Negativo		0	30
	Total general		25	35

Fuente: Los autores, 2023

Tomando el diagnóstico de RT-qPCR como dato real, la especificidad de POCT es $30/35 = 85,7\%$. La tabla 18 presenta datos de la RT-qPCR divididos entre pacientes categorizados como "Positivos" y "Negativos", dispuestos verticalmente en columnas y horizontalmente, se muestran los resultados de "Positivo" y "Negativo" obtenidos a través del sistema POCT en donde la RT-qPCR se considera como la "prueba de oro" o estándar de referencia. Para determinar la especificidad del sistema POCT, se segmentó el número de verdaderos negativos (pacientes sanos que dieron negativo en la prueba) con el total de pacientes sanos de esta comparación.

Las técnicas moleculares se destacan por su alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de virus respiratorios, permiten no sólo una detección temprana de infecciones, sino también la identificación de nuevas variantes y facilitan decisiones clínicas informadas, un estudio de Duarte y colaboradores (2014) compararon pruebas serológicas, como Elisa, con pruebas moleculares, como la PCR, sensibilidad y especificidad se observaron diferencias significativas entre estas pruebas, ChagaTest ELISA sobresalió en la detección de *T. cruzi* debido a su alta especificidad, indicando una menor probabilidad de resultados falsos positivos al identificar pacientes sanos, en este enfoque de validación diagnóstica a las pruebas moleculares del Sistema POCT y la RT-qPCR, se puede inferir que ambos métodos tienen una alta confiabilidad en la detección de virus, sus valores de especificidad, oscilan entre 80-100%, resultados que se comparan con los obtenidos en este estudio, para RT-qPCR una especificidad sobresaliente del 100%, por otro lado, la

especificidad del sistema POCT alcanzó un valor de 85,7%, resaltando su capacidad para identificar correctamente microorganismos patógenos, minimizando las posibilidades de errores.

La literatura científica cuenta con escasas investigaciones centradas en el sistema POCT como instrumento de diagnóstico molecular, esto realza la importancia de nuestros hallazgos, que destacan la capacidad del sistema POCT para ofrecer resultados rápidos y precisos, estas pruebas son cruciales, especialmente en entornos con recursos escasos o remotos, facilitando una detección temprana de enfermedades infecciosas y monitorización longitudinal, la agilidad del POCT es fundamental en estudios poblacionales y epidemiológicos, permitiendo una respuesta médica más rápida y eficaz.

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones:

- Las muestras de hisopados nasofaríngeos recolectadas en la zona mucosa donde se replican los virus, permitieron maximizar la cantidad de partículas virales lo cual ayudó de manera significativa a la detección tanto positiva como negativa de los virus respiratorios para las pruebas de RT-qPCR y sistema POCT, obteniendo así resultados precisos y eficaces para un óptimo pronóstico de la enfermedad.
- Analizar la historia clínica de cada paciente y considerar factores como sexo y edad es fundamental para entender la susceptibilidad ante ciertas enfermedades, las diferencias biológicas entre géneros pueden influenciar la manifestación de síntomas y el desarrollo de enfermedades, por otra parte, la edad puede determinar la predisposición hacia determinadas afecciones.
- La especificidad de ambas pruebas analizadas arrojó resultados con alto impacto al Ecuador, teóricamente las pruebas eran específicas, con el presente estudio validamos que las técnicas alcanzaron un alto porcentaje de especificidad, el Sistema POCT tiene un valor de 85,7% y es importante que la prueba RT-qPCR alcanzó una especificidad del 100%, atribuido a su capacidad de contar con un cebador específico para cada virus que detecta.
- A través de este estudio, hemos alcanzado nuestro principal objetivo que es validar la especificidad de los métodos de diagnóstico molecular para virus respiratorios. Así, proporcionamos a los médicos especialistas una herramienta eficaz y precisa para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades relacionadas con virus respiratorios.

Recomendaciones:

- Antes de manipular muestras nasofaríngeas, es crucial preparar y limpiar adecuadamente el área de trabajo puesto que, durante el proceso de PCR, es vital manejar los reactivos con precaución para evitar su degradación durante la homogenización.
- Es fundamental procesar las muestras dentro de una cabina de bioseguridad, cumpliendo estrictamente las directrices del laboratorio y al manipularlas se requiere emplear guantes limpios, en particular al manejar ampollas de Sample Buffer y viales de hidratación.
- Se propone llevar a cabo investigaciones sobre diferentes virus que afectan a variados grupos de edad, con el objetivo de identificar patrones de susceptibilidad y manifestaciones clínicas asociadas con la edad.
- Se sugiere desarrollar metodologías analíticas que sean más sensibles y que tengan la capacidad de producir resultados cuantitativos, estos valores numéricos facilitarán los análisis estadísticos y serán significativos para futuras evaluaciones.

6. Bibliografía

- Agindotan. (2020). Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*.
- Alarcón, A., Muñoz, E., Pascual, E., Pintos, I., & Ramos, A. (2018). Human infection with avian influenza virus. *Elsevier*, 3291-3297. doi:<https://doi.org/10.1016/j.med.2018.04.019>
- Alcalá, M., & Morales, E. (2017). Diagnóstico situacional de la implementación del POCT en un centro de alta complejidad de la ciudad de Cali, Colombia - año 2017. *Repositorio Universidad Católica de Manizales.*, 1-59. Retrieved from Repositorio UCM: <https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/1903>
- Álvarez, H., & Pérez, E. (2009). Utilidad Clínica de la tabla 2x2. *Revista de Evidencia e Investigación Clínica*, 22-27. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2009/eo091c.pdf>
- Angarita, M., Díaz , A., & Torres, M. (2017). Tecnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 796 - 807. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012&lng=es&tlng=es.
- Arandia-Guzmán, J., & Antezana-Llaveta, G. (2020). ARS-CoV-2: Estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gac. Médica Boliv.*, 43:170–178.
- Aspa, J., & Naranjo, O. (2010). Viriasis respiratorias. *Elsevier*, 367-374. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-298-1.50045-7>.
- Ballmann, E. (2021). Genotipificación del virus respiratorio sincitial tipo en muestras nasofaríngeas en pacientes pediátricos .
- Barrera, G., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P., Guzmán, C., & Villamizar, L. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24-31. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Bartlett, J. (2008). Is activity against "atypical" pathogens necessary in the treatment protocols for community-acquired pneumonia? Issues with combination therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, S232-S236. doi:<https://doi.org/10.1086/591409>
- Bartlett, J., & Stirling, A. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Human Press*, 3-6. doi:<https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Basu, A., & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA. *Journal of Nucleic Acids*, 16. doi:10.4061/2010/201367
- Beneduce. (2023). Development of PCR-based molecular tools. pp. 8,11.

- Bernal, L. J., & Castellanos, J. (2015). Aislamiento de metapneumovirus humano (HMPV) a partir de muestras clínicas. *Revista Salud Bosque*, 9-14. doi:<https://doi.org/10.18270/rsb.v5i1.178>
- BioFire®. (2022). Manual BioFire® Respiratory Panel 2.1 plus. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/137583/download>
- Bionovabolivia. (2023). *Bionovabolivia* . Retrieved from Bionovabolivia : <https://bionovabolivia.com/producto/panel-multiplex-sars-cov-2-gen-e-gen-n-gen-rdrp-rt-pcr/>
- Bio-Rad. (2023). *Bio-Rad Laboratories, Inc.* Retrieved from Bio-Rad Laboratories, Inc: <https://www.bio-rad.com/>
- Bravo, S., & Cruz, J. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su interpretación. *Revista Chilena de Radiología*, 158-164. doi:10.4067/s0717-93082015000400007
- Busquets, M., Morales, C., Norte, C., & Reina, J. (2018). Utilidad del valor Ct en las infecciones respiratorias agudas causadas por el virus respiratorio sincitial A y B y los virus gripales A (H1N1)pdm09, A (H3N2) y B. *Elsevier*, 332-335. Retrieved from <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-utilidad-del-valor-ct-infecciones-S0213005X17301416>
- Calicó, I., Lowak, M., Bas, A., Betbesé, M., Fuentes, F., & Loaiza, N. (2009). Estudio comparativo de inmunofluorescencia directa, enzimoimmunoanálisis y cultivo para el diagnóstico de las infecciones por metapneumovirus humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 322-325. doi:10.1128/CVI.00750-12
- Carballal, G., Marcone, D., Ricarte, C., & Echavarría. (2015). Diagnóstico de virus respiratorios utilizando un sistema automatizado de PCR múltiples (FilmArray) y su comparación con métodos convencionales. *Revista Argentina de Microbiología*, 29-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.003>
- Catalá, R., & Palacios, R. (2020). Un modelo didáctico para comprender la estructura y mecanismos de acción de los virus y su relación con el desarrollo de nuevas vacunas. *Educación química*, 45-59. doi:<https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2020.3.75824>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2022). Datos clave sobre la influenza. *Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias*, 1.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2022). Tipos de virus de influenza. *Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias*, 68-84. Retrieved from <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- CLSI., C. a. (2023). Selection Criteria for Point-Of- Care- Testing Devices. pp. POCT09-A. Vol.30.Nº8. 2010.

- Cuadra, T., Guadrón, A., Cruz, R. d., & Vásquez, E. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 31-39. doi:<https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
- Domachowske, J. (2021). The future of respiratory syncytial virus disease prevention and treatment. In *Infect Dis Ther* 10(Suppl 1):47–60, 2021. doi: 10.1007/s40121-020-00383-6.
- Donis, J. (2012). Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances en Biomedicina*, 73-81. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331328015005>
- Duarte, L. F., Flórez, O., Rincón, G., & González, C. I. (2014). Comparación de siete pruebas diagnósticas para detectar infección por *Trypanosoma cruzi* en. *Colombia Médica*, 61-66.
- Esler, M., & Esler, D. (2022). Can angiotensin receptor-blocking drugs perhaps be harmful in the COVID-19 pandemic? *Journal of hypertension*, 781-782. doi:<https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002450>
- Esposito, M., Gleeny, A., Iheozor, Z., & Philippa, M. (2017). Treating periodontal disease for preventing adverse birth outcomes in pregnant women. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD005297. doi:<https://doi.org/10.1002/14651858.CD005297.pub3>
- Farfán, M. (2015). Biología Molecular Aplicada al Diagnostico Clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 788-793. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.007>
- García Lechuz, J., Sánchez Romero, M. I., González López, J., & Orta Mira, N. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Elsevier*, 127-134. doi:10.1016/j.eimc.2017.12.002
- Garibyan, & Avashia. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J invest Dermatol*. doi:<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gastelo, R., Maguiña, C., & Tequen, A. (2020). El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid-19. *Revista Medica Herediana*, 125-131. doi:<https://dx.doi.org/10.20453/rmh.v31i2.3776>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S., Baric, R., De Groot, R., Drosten, C., Gulyaeva, A., . . . otros, y. (2019). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 536-544. doi:<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gregg, M. B. (2008). *Field Epidemiology*. New York: Oxford University Press.
- Gualerzi. (2020). Point-of-Care Diagnostic Tests for Detecting SARS-CoV-2 Antibodies: A Systematic Review and Meta-Analysis of Real-World Data. p. 1515. .
- Herrera Cartaya, C., Lage Dávila, A., Betancourt Cervantes, J., Barreto Fiu, E., & Sánchez Valdés, L. (2022). La edad como variable asociada a la gravedad en pacientes con la COVID-19. *Revista Cubana de Medicina Militar*, e1766. Retrieved from

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572022000100004&lng=es&tlng=es.

- Hilleman, R. (2020). Realities and enigmas of human viral Influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20:3068-3087.
- Johkoh, T., Honda, O., Mihara, N., Kozuka, T., Tomiyama, N., Hamada, M., . . . Sato, N. (2001). Pitfalls in the interpretation of multidetector-row helical CT images at window width and level setting for lung parenchyma. *National Library of Medicine*, 181-184.
- Kilbourne, E. D. (2006). Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, 9-14. doi:doi: 10.3201/eid1201.051254
- Kuiken T, H. E. (2021). Host species barriers to Influenza Virus Infections.
- Labbox. (2023). *LABBOX LABWARE*. Retrieved from LABBOX LABWARE: <https://esp.labbox.com/>
- Marimón, J. M.-M. (2017). Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias. . In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (pp. 35(2), 108–115). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.007>.
- Martín Peinador, Y., Jiménez Alés, R., Suárez Rodríguez, A., & Berghezan Suarez, A. (2016). Niño con Infecciones de Repetición. *Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria*, 1-27. Retrieved from <https://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido/documentos-del-gpi>
- Merchán, K., Vera, K., & Villafuerte, J. (2021). Vigilancia de virus respiratorios en Ecuador. 7(3), 563–578. doi:<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23857/dc.v7i3.2011>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2022). In *Ecuador registra un incremento infecciones respiratorias* (pp. <https://www.salud.gob.ec/ecuador-registra-un-incremento-infecciones-respiratorias/#:~:text=En%20el%202022%2C%20los%20casos,COVID%2D19%20a%20esca>).
- Miranda, U., Romero Ruiz, E., Amorín Uscata, S., Serrano Segura, B., Briceño Espinoza, K., & Cárdenas-Bustamante, F. (2021). Estandarización y validación de un Western Blot para el diagnóstico del virus de inmunodeficiencia humana. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(4), 696-703. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-05312021000400696
- Morales Angulo, C., González Zubizarreta, R., Martín Toca, G., Ramírez Bonilla, A., Gozalo Margüello, M., & Rodríguez Fernández, A. (2020). Toma de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de COVID-19. *Revista ORL*, 389-394. doi:<https://dx.doi.org/14201/orl.23079>
- Moreno, N., & Agudelo, P. (2010). Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(4):548-56. Retrieved from

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342010000400009&script=sci_abstract

- Mosquera, J., Muñoz, N., Pedreñe, A., Robalino, J., & Tene, D. (2021). El sexo como factor de riesgo de la mortalidad por COVID-19. Caso Ecuador. *Kasmera*, e49235672. doi:<https://doi.org/10.5281/zenodo.5175260>
- Moss, P. (2022). History and development of molecular biology. *Molecular Hematology*. 3rd ed. Wiley Blackwell.
- Mounts, A., De La Rocque, S., Fitzner, J., Garcia, E., Thomas, H., & otros, y. (2017). The early response to a novel coronavirus in the Middle East. *EMHJ - Eastern Mediterranean Health Journal*, S19-S25. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/118442>
- Nair, H. (2021). Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza. In s. r. meta-analysis. PubMed 22078723.
- Nguyen-Kim, H., Beckmann, C., Redondo, M., Ziliox, J., Vallet, V., Berger-Sturm, K. O., & Alberi Auber, L. (2022). COVID salivary diagnostics: A comparative technical study. *Journal of medical virology*, 4277-4286. doi:10.1002/jmv.27883
- OMS. (2019). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. p. 10.3390/diseases4030026.
- OMS. (2020). *Nuevo Coronavirus*. Retrieved from <https://www.paho.org/es/temas/coronavirus>
- OPS. (2019). coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmisión. .
- OPS. (2020). Taller de Vigilancia Epidemiológica para el Control de las Enfermedades. Programa Ampliado de Inmunizaciones. Glosario de términos. *Organización Panamericana de la Salud.*, 1-12. Retrieved from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52878>
- OPS. (2021). La carga de las enfermedades respiratorias crónicas en la Región de las Américas. *Organización Panamericana de la Salud*. Retrieved from [https://www.paho.org/es/enlace/carga-enfermedades-respiratorias-cronicas#:~:text=En%20la%20Regi%C3%B3n%20de%20las%20Am%C3%A9ricas%20en%20el%202019%2C%20las,50%25\)%20defunciones%20en%20mujres](https://www.paho.org/es/enlace/carga-enfermedades-respiratorias-cronicas#:~:text=En%20la%20Regi%C3%B3n%20de%20las%20Am%C3%A9ricas%20en%20el%202019%2C%20las,50%25)%20defunciones%20en%20mujres)
- OPS. (2023, agosto 18). *Organización Panamericana de la Salud*. Retrieved from Organización Panamericana de la Salud.: <https://www.paho.org/es/informe-situacion-influenza>
- Peiris JS, Y. K. (2021). The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 349(25):2431-41, 2003. doi: 10.1056/NEJMra032498. PMID: 14681510.
- Pereyra, N., Perez, A., Messick, J., Cane, F., & Guglielmone, A. (2011). Estimación de la sensibilidad y especificidad de dos pruebas diagnósticas para la detección de *Mycoplasma suis* en Argentina utilizando un modelo bayesiano. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 117-125. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200004>

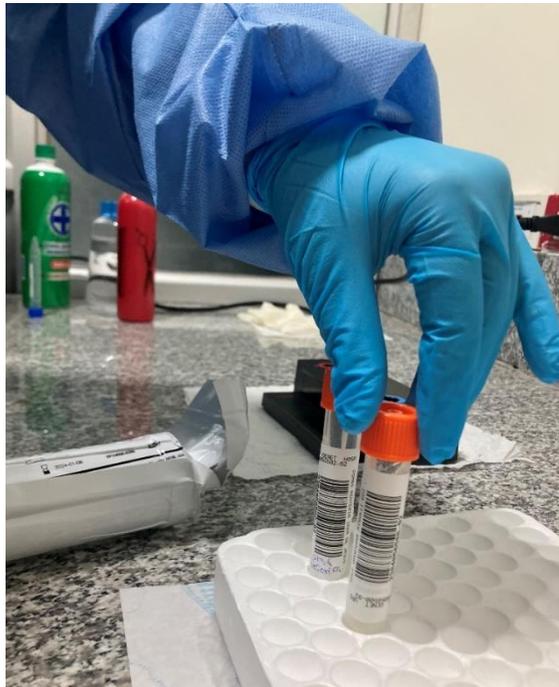
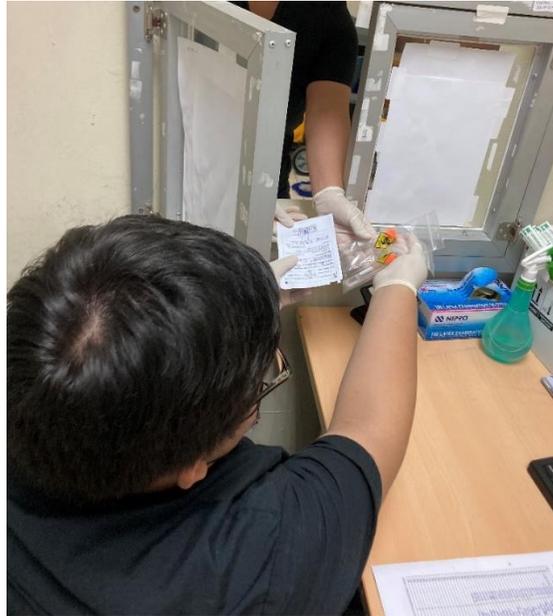
- Pértegas, S., & Pita, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.*, 10: 120-124.
- Ponce, M. (2009). La Influen H1NI en México, diagnóstico, tratamiento y prevención. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 7-19. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2009/vre091-2b.pdf>
- Rendón, M. E., Valenzuela, M., & Villasís, M. Á. (2020). Sesgos en los estudios de pruebas de diagnóstico: implicación en la estimación de la sensibilidad y especificidad. *Revista alergia México*, 165-173. doi:<https://doi.org/10.29262/ram.v67i2.771>
- Rocha, J. C., Passalia, F. J., Takahashi, M. B., Maserati, M. P., Alves, M. F., de Almeida, T. G., . . . Nogueira, M. F. (2017). Automatized image processing of bovine blastocysts produced in vitro for quantitative variable determination. 4:170192. doi:<https://doi.org/10.1038/sdata.2017.192>
- Rodríguez González, M., G Arreola Ávila, J., Ávila Rodríguez, V., García González, F. J., Quezada Rivera, J., Mota Ituarte, M., & La Rosa, A. B. (2023). Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue. *Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 29(1).
- Rojas, N., Lope, P., Huaranga, M., Marques, P., Palacios, R., Balbuena, J., . . . Padilla, C. (2000). Validación y evaluación de una prueba de RT-PCR en tiempo real in house para la detección de SARS-CoV-2 usando un gen específico RdRp y control endógeno GAPDH. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 597-602. doi:<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.384.7596>
- Salomon, R., & Webster, R. (2009). The influenza virus enigma. *Cell*, 136: 402-410. doi:10.1016/j.cell.2009.01.029
- SCMI. (2020). Guía para la toma de muestra respiratorias en pacientes con sospecha de infección por coronavirus (COVID-19). *Sociedad Chilena de Medicina Intensiva*, 1-16. Retrieved from https://www.medicina-intensiva.cl/site/covid/guias/guia_toma_muestras_respiratorias_pacientes_con_sospecha_de_COVID_19.pdf
- Seegene Inc. (2020). Manual Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay. *Seegene*, 1. Retrieved from https://www.seegene.com/assays/allplex_sars_cov_2_flua_flub_rsv_assay#
- Shrestha, L. (2022, Junio 18). *Microbenotes*. Retrieved from <https://microbenotes.com/respiratory-syncytial-virus-rsv/>
- Sui, J., Hwang, W., Perez, S., Wei, G., Aird, D., Zhen, L.-m., . . . Bankston, L. (2019). Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 6: 265-273. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nsmb.1566>

- Sullender, W. (2000). Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clinical Microbiology Reviews*, 1-15. doi:10.1128/cmr.13.1.1-15.2000
- Tamay de Dios, & Velasquillo. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *J Invest Dermatol.*, 70-78.
- TANBead®. (2022). Manual TANBead Nucleic Acid Extraction Kit. Retrieved from https://www.tanbead.com/en/product/page/Viral_NA_665
- Wang, E. (2022). Association of respiratory viral infections with pulmonary deterioration. PubMed 6504106.
- Wu, Z., & McGoogan, J. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. 1239-1242. doi:<https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Zhu, N. Z., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., . . . Team, & C. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 727-733. doi:<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

7. Apéndice/Anexos

Anexo 1 Recepción y manejo de muestras de hisopados nasofaríngeos.

Ingreso al área de recepción de muestras para posterior análisis.



Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 2 Sistema POCT equipo para diagnóstico molecular.

Sistema POCT, BioFireTorch®.



Fuente: Los autores, 2023.

Placa de reacción y cartucho empleado en el sistema POCT.



Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 3 Procesamiento del Sistema POCT.

Proceso de preparación de cartucho para Sistema POCT.



Fuente: Los autores, 2023.

Carga de la mezcla de muestra.



Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 4 Lectura y análisis del cartucho del Sistema POCT.

Ingreso del código de barras del cartucho para procesamiento de la prueba.



Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 5 Pre-PCR, materiales y equipos de extracción de ARN purificado.

Cabina de flujo laminar para extracción de ARN y preparación de la PCR.



Fuente: Los autores, 2023.

Reactivos y muestras para la extracción de ARN.



Fuente: Los autores, 2023.

Extracción de ARN, colocación de compuestos de lisis celular.



Fuente: Los autores, 2023.

Equipo Maelstrom™ 9610, para extracción de ARN.



Fuente: Los autores, 2023.

Extracción de ARN, colocación de placa en equipo Maelstrom™ 9610.



Fuente: Los autores, 2023.

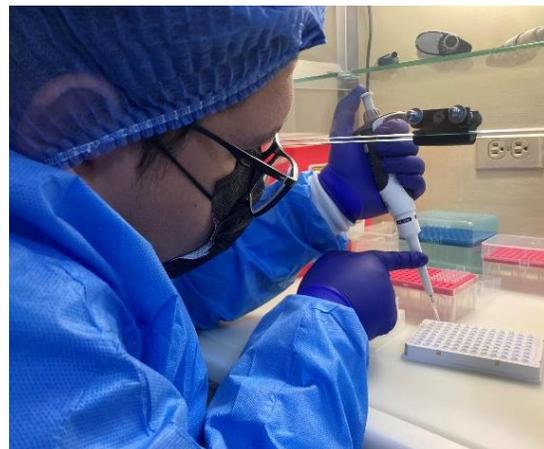
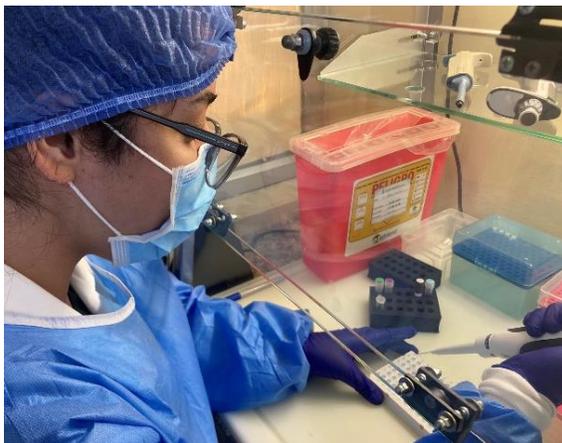
Anexo 6 RT-qPCR, materiales y equipos para detección de amplicones.

Termociclador utilizado en la PCR para identificación de fluorescencia.



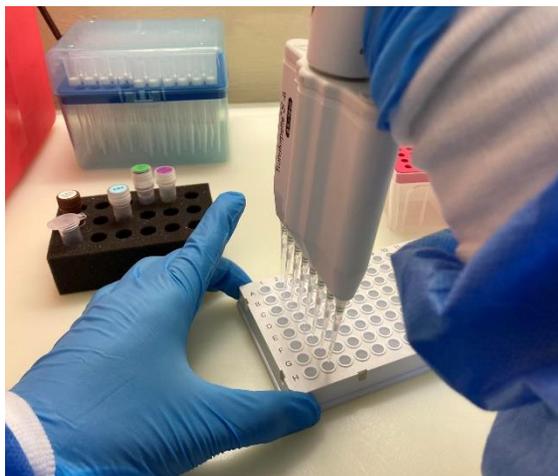
Fuente: Los autores, 2023.

RT-qPCR, preparación de master mix en placa multipocillo Hard-Shell.



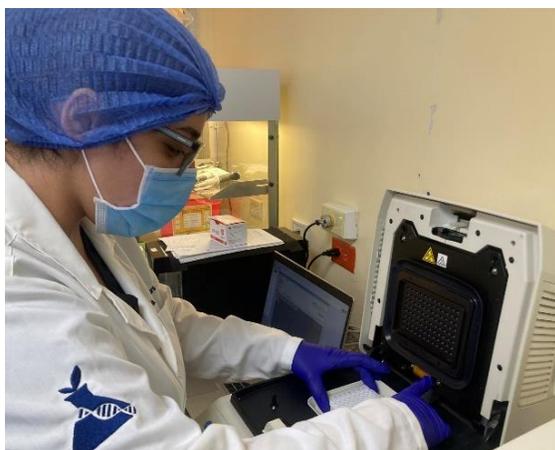
Fuente: Los autores, 2023.

Carga de master mix en placa multipocillo Hard-Shell.



Fuente: Los autores, 2023.

Ingreso de placa en el Termociclador.



Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 7 Configuración predeterminada para el equipo de PCR.

Parámetros de PCR.		
<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	50°C	20:00m
2	95°C	15:00m
3	95°C	0:10m
4	60°C	0:40m
5	72°C	0:20m
6	Ejecutar desde 3	2 repeticiones
7	95°C	0:10m
8	60°C	0:15m
	+Lectura	
9	72°C	0:10 m
	+Lectura	
10	Ejecutar desde 7	41 repeticiones
	<i>Finalización</i>	

Fuente: Los autores, 2023.

Anexo 8 Cálculo de la especificidad para cada prueba.

Ecuación de la especificidad RT-qPCR.

$$\textit{Especificidad} = \frac{D}{B + D}$$

$$\textit{Especificidad} = \frac{D}{\textit{sanos}}$$

$$\textit{Especificidad} = \frac{30}{30} = 1 = 100\%$$

Fuente: Los autores, 2023.

Ecuación de la especificidad sistema POCT.

$$\textit{Especificidad} = \frac{D}{B + D}$$

$$\textit{Especificidad} = \frac{D}{\textit{sanos}}$$

$$\textit{Especificidad} = \frac{30}{35} = 0,85714 = 85,7\%$$

Fuente: Los autores, 2023.